



**CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE
MINAS GERAIS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE QUÍMICA TECNOLÓGICA**

**ISOFLAVONAS: CARACTERÍSTICAS GERAIS E
PROPRIEDADES NUTRACÊUTICAS**

Cíntia Yoko Kobayashi

**Belo Horizonte-MG
2011**



**CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE
MINAS GERAIS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE QUÍMICA TECNOLÓGICA**

**ISOFLAVONAS: CARACTERÍSTICAS GERAIS E
PROPRIEDADES NUTRACÊUTICAS**

Cíntia Yoko Kobayashi

Monografia apresentada ao Curso de
Bacharelado em Química Tecnológica do
CEFET-MG, como parte das exigências da
disciplina Trabalho de Conclusão de Curso

Orientador: Prof. Dr. Cleverson F. Garcia

Co-orientadora: Prof^a Dra. Maria A. V.
Teixeira

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Cleverson Fernando Garcia (orientador)

Prof. Dr. Ildefonso Binatti

Prof^a. Dra. Adriana Akemi Okuma

**Belo Horizonte-MG
2011**

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Cleverton Fernando Garcia, por sua extrema dedicação e auxílio durante todo o período de realização desta monografia.

Obrigada por todo o aprendizado adquirido neste período, assim como em suas aulas de Química e Bioquímica dos Alimentos e na Iniciação Científica.

Agradeço aos professores Adriana Akemi Okuma e Ildfonso Binatti, por formarem uma excelente e competente Banca Avaliadora. Obrigada pela disposição para participarem como avaliadores de minha defesa e pelo grande aprendizado.

Agradeço aos meus queridos pais e aos meus grandes amigos, por todo o apoio, carinho e incentivo.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATP – Adenosina trifosfato

CCD – Cromatografia de Camada Delgada

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CoA – Coenzima A

DAD – Detector de feixe de diodos

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FDA - Food and Drug Administration

HDL – Lipoproteína de Alta Densidade

LDL – Lipoproteínas de Baixa Densidade

ODS - Octadecilssilano

RDC – Resolução de Diretoria Colegiada

TFA – Ácido trifluoroacético

UV – Detector de Ultravioleta

LISTA DE FIGURAS E FLUXOGRAMAS

	Pag.
Figura 1 – Estrutura básica de flavonóides.....	3
Figura 2 – a) Estrutura básica de chalconas; b) Licochalcona C e c) Asebogenin.....	4
Figura 3 – Exemplos de flavona e de flavonol. (a) Esqueleto básico de flavonas, (b) flavona apigenina e (c) flavonol miricetina.....	4
Figura 4 – a) Esqueleto básico de flavanonas, (b) 4',7-dimetoxinarigenina e (c) eriodictiol.....	5
Figura 5 – Estrutura química da antocianidina cianidina.....	5
Figura 6 – Esqueleto básico de isoflavonas.....	5
Figura 7 – Exemplos de padrões de isoflavonas. (a) Aglicona, (b) sistema conjugados acetilglicosídeo e (c) sistema conjugado malonilglicosídeo.....	6
Figura 8 – Isoflavonas de soja. (a) Daidzeína, (b) gliciteína, (c) genisteína, (d) daidzina, (e) glicitina, (f) genistina, (g) 6''-O-acetila daidzina, (h) 6''-O-acetila glicitina, (i) 6''-O-acetila genistina, (j) 6''-O-malonila daidzina, (k) 6''-O-malonila glicitina e (l) 6''-O-malonila genistina.....	7
Figura 9 – Isoflavonas do gênero <i>Pterodon</i>	7
Figura 10 – Isoflavonas de <i>Laburnum anagyroides</i>	8
Figura 11 – Isoflavonas de <i>Erythrina indica</i>	9
Figura 12 – Isoflavonas de <i>Erythrina saclexii</i>	9
Figura 13 – Isoflavonas do gênero <i>Milletia</i>	10
Figura 14 – Representação das diferentes partes de um grão vegetal.	11
Figura 15 – Conversão da fenilalanina em <i>p</i> -coumarato.....	12
Figura 16 – Conversão de <i>p</i> -coumarato em uma chalcona.....	13
Figura 17 – Conversão da chalcona em uma isoflavona.....	13
Figura 18 – a) Representação da ativação <i>o-p</i> de um anel aromático por um grupo hidroxila. b) Híbrido de ressonância do fenol representando a densidade de carga negativa nas posições <i>o-p</i>	15
Figura 19 – Representação da capacidade antioxidante de compostos fenólicos <i>o</i> -diidroxilados.....	15

Figura 20 - Cromatogramas antes e após hidrólise de 3 amostras de cápsulas de isoflavonas comerciais (CAP02, CAP06 e CAP09). Identificação dos picos: 1 e 2 - glicosídeos; 3 - daidzeína; 4 - gliciteína e 5 – genisteína.....	18
Figura 21 – Estrutura química do equol.....	22
Figura 22 – Comparação estrutural entre o hormônio feminino (a) 17-β-estradiol e as isoflavonas (b) genisteína e (c) daidzeína.....	25

RESUMO

ISOFLAVONAS: CARACTERÍSTICAS GERAIS E PROPRIEDADES NUTRACÊUTICAS

KOBAYASHI, C. Y.; GARCIA, C. F.; TEIXEIRA, M. A. V.

As isoflavonas são metabólitos secundários de grande evidência devido ao seu consumo frequente estar associado à redução da incidência de algumas doenças. Desta forma, objetivou-se no presente trabalho realizar uma revisão bibliográfica sobre as características das isoflavonas, elaboração de produtos à base de soja e sobre alguns aspectos de sua atividade nutracêutica. As isoflavonas correspondem a flavonóides cujo esqueleto carbônico apresenta o anel B ligado ao carbono 3. Sua distribuição na natureza é vinculada majoritariamente às plantas da Família Leguminosae/Fabaceae, onde podem ocorrer na forma de agliconas, glicosídeos simples, glicosídeos conjugados com malonila ou acetila, etc. Por ser uma matéria-prima de grande oferta, a soja se destaca como fonte de isoflavonas, sendo a daidzina, genistina e glicitina conjugados os metabólitos majoritários. Suas propriedades químicas são variadas, destacando-se a acidez dos derivados fenólicos, solubilidade, a presença comum de grupos orientadores *orto-para* eletrofílicos e a capacidade antioxidante de derivados fenólicos. Sua quantificação é realizada geralmente através de CLAE, empregando-se fase estacionária reversa, fase móvel polar com detecção por UV ou DAD e eluição gradiente ou isocrática. O estudo das isoflavonas sempre foi motivado por atividades nutracêuticas como a capacidade estrogênica, redução da incidência de osteoporose, fogachos, doenças cardíacas, diabetes, entre outras, que motivam o comércio de produtos derivados de soja como farinha, farelo, proteína texturizada, proteína isolada, leite, tofu, missô e o tempeh. Entretanto, devido às peculiaridades dos processamentos das sementes de soja para elaborar tais produtos, pode-se verificar que a farinha de soja, o extrato de gérmen de soja e a farinha desengordurada apresentam altas quantidades de isoflavonas, enquanto que o leite, a farinha torrada e o óleo apresentam baixas quantidades ou, até mesmo, não contêm. Salienta-se que o estudo das isoflavonas e o processamento de fontes naturais para a elaboração de produtos nutracêuticos devem estar acompanhados do conhecimento da legislação correspondente, a RDC nº 48, de 16/03/2004 (ANVISA). Esta resolução determina que as isoflavonas são consideradas medicamentos fitoterápicos, com obrigatoriedade de registro. Alusões à prevenção, tratamento e cura de doenças só podem ser usadas após avaliação e aprovação da ANVISA por meio da RDC nº 18, 30/04/1999. Assim, pode-se concluir que a revisão bibliográfica sobre isoflavonas possibilitou agregar novos conhecimentos na área de biossíntese, propriedades químicas, análises, atividade nutracêutica e legislação, enriquecendo a formação no contexto da Química Bio-orgânica.

Palavras-chave: isoflavonas, Fabaceae, nutracêutico.

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. DESENVOLVIMENTO.....	3
2.1 Flavonóides.....	3
2.2 Isoflavonas.....	5
2.2.1 Biossíntese.....	10
2.2.2 Propriedades químicas.....	13
2.2.2.1 <i>Solubilidade</i>	14
2.2.2.2 <i>Acidez</i>	14
2.2.2.3 <i>Perfil das reações de substituição eletrofílica</i>	14
2.2.2.4 <i>Atividade antioxidante</i>	15
2.2.3 Técnicas de quantificação.....	16
2.2.4 Processamentos e produtos à base de soja.....	19
2.2.5 Absorção e eliminação.....	22
2.2.6 Biodisponibilidade.....	23
2.2.7 Atividades nutracêuticas.....	24
2.2.7.1 <i>Atividade fitoestrógena</i>	24
2.2.7.2 <i>Redução da incidência de doenças cardiovasculares</i>	26
2.2.7.3 <i>Redução da incidência da osteoporose</i>	27
2.2.8 Legislação.....	28
3. CONCLUSÃO.....	30
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31
5. ANEXOS.....	37

1. INTRODUÇÃO

As isoflavonas são flavonóides cujo anel B é ligado diretamente ao carbono 3 no anel, diferente da maioria dos flavonóides onde a ligação se encontra no carbono 2. São encontradas principalmente em plantas da Família Leguminosae (ou Fabaceae), onde espécies conhecidas como a soja (*Glycine max* L.), a lentilha (*Lens esculenta* Moench) e o grão de bico (*Cicer arietinum*) estão alocadas taxonomicamente (PIMENTEL *et al.*, 2005).

Tendo em vista sua grande oferta, a soja é empregada como a fonte natural mais comum de isoflavonas, sendo encontradas principalmente no gérmen da semente (ANVISA, 2011). O teor de isoflavonas nas plantas pode variar dependendo de fatores como: genética do grão, condições do solo, clima (tanto na época do cultivo quanto da colheita) e o tipo de processamento empregado nas matérias-primas à base de soja (LEE *et al.*, 2003 *apud* BARBOSA *et al.*, 2006).

O mecanismo de biossíntese das isoflavonas é misto, pois parte do esqueleto é oriundo da via do acetato e parte da via do chiquimato. Isoflavonas simples como a genisteína são biossintetizadas a partir de aminoácidos aromáticos como a fenilalanina ou a tirosina (via do chiquimato) e policetídeos derivados da AcetilSCoA (via do acetato) (LIU *et al.* 2007).

Entre as variadas propriedades químicas das isoflavonas, a solubilidade, a acidez, a capacidade antioxidante e o perfil das substituições eletrofílicas nos anéis benzênicos se mostram interessantes. Tal importância está relacionada às análises de caracterização e indiretamente às suas propriedades nutracêuticas.

A quantificação das isoflavonas é realizada frequentemente por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), sendo empregadas fase estacionária de baixa polaridade (fase reversa) e fase móvel polar, além de detectores de ultravioleta (UV) ou de feixes de diodo (DAD) (WANG *et al.*, 2002 *apud* CÉSAR *et al.*, 2007; CIOLA, 1998; ÁVILLA *et al.*, 2007).

Atualmente, a indústria de alimentos disponibiliza vários produtos à base de soja que, dependendo do seu processamento, podem conter diferentes concentrações de isoflavonas, destacando-se: farinha, farelo, tempeh,

missô, molho, tofu, óleo, proteína texturizada e os isolados protéicos. De modo geral, produtos que não envolvem descartes durante o processamento, aquecimentos intensos e extrações com solventes de polaridade inadequada mantêm o teor de agliconas, glicosídeos comuns e derivados das sementes de soja.

O consumo de produtos ricos em isoflavonas pode trazer benefícios à saúde humana, entre eles a redução da incidência de doenças cardiovasculares, de fogachos, de osteoporose, além de atuarem como fitoestrógenos, minimizando a redução de hormônios femininos como o estrogênio durante a menopausa (PIMENTEL *et al.*, 2005). Entretanto, o comércio de extratos de isoflavonas de soja ou a divulgação da atividade nutracêutica em rótulos de alimentos à base de soja não podem ser exercidos sem a aprovação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (ANVISA, 2011).

Assim, objetiva-se no presente trabalho realizar uma revisão bibliográfica evidenciando as características gerais das isoflavonas, processamento de produtos à base de soja, bem como alguns aspectos de sua atividade nutracêutica.

2. DESENVOLVIMENTO

2.1 Flavonóides

Flavonóides são metabólitos secundários que podem ser encontrados em frutas, sementes, raízes e flores. Muitos são responsáveis pela coloração das flores, gemas ou folhas no outono. Entre suas diversas funções na natureza está a atração de polinizadores ou animais consumidores de frutas, promovendo a dispersão das sementes das plantas (GONZÁLEZ-GALLEGO *et al.*, 2007). Outra função interessante é sua participação no crescimento, desenvolvimento e defesa dos vegetais contra o ataque de patógenos (DIXON e HARRISON, 1990 *apud* DORNAS *et al.*, 2007).

Quimicamente, flavonóides são compostos polifenólicos biossintetizados a partir das vias do chiquimato e do acetato (MANN, 1987).

Pode-se representar, de forma genérica, um flavonóide através do perfil evidenciado na Figura 1. Sua estrutura pode ser didaticamente dividida em 3 partes: os anéis A, B e C, presentes na maioria das classes.

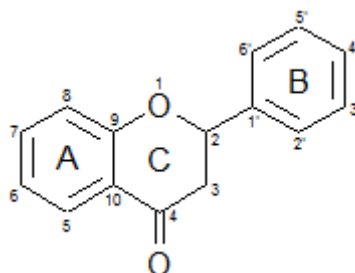


Figura 1 – Estrutura básica de flavonóides.
Fonte: MANN (1987)

Existem diferentes classes de flavonóides, tais como chalconas, flavonas, flavonóis, flavanonas, antocianidinas, isoflavonas, flavanonóis, auronas, catequinas, alguns tipos de taninos condensados e neoflavonóides, entretanto suas descrições detalhadas fogem aos objetivos do presente trabalho. Desta forma, como meio de apresentação dos flavonóides, selecionou-se algumas classes comuns ou de importância singular e, na sequência, as isoflavonas passam a ser apresentadas.

As chalconas são os precursores das demais classes de flavonóides, possuindo como estrutura básica o esqueleto 1,3-difenilpropano. A Figura 2 (p. 4) evidencia alguns exemplos específicos de chalconas, bem como a representação de seu esqueleto básico.

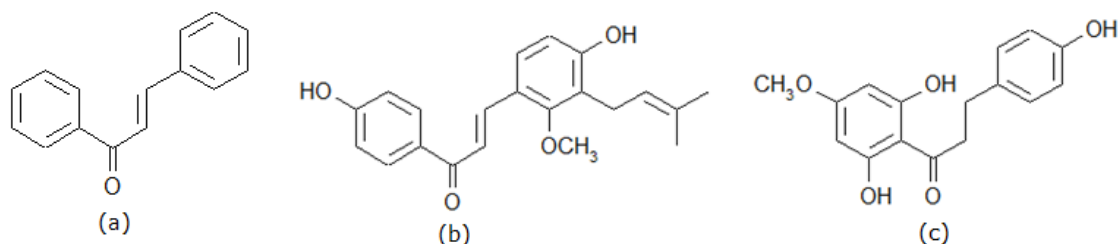


Figura 2 – a) Estrutura básica de chalconas; b) Licochalcona C e c) Asebogenin.

Fonte: NOWAKOWSKA (2007)

As flavonas são estruturas derivadas do esqueleto básico da 2-fenilcromona, sendo similares aos flavonóis, os quais apresentam uma hidroxila extra na posição C3. Tal similaridade estrutural (Figura 3) está relacionada diretamente com sua semelhança reacional (ZUANAZZI e MONTANHA, 2002). As flavonas mais encontradas nas plantas são a apigenina e luteolina, nas formas livres ou conjugadas. Já os flavonóis mais comuns em plantas são o canferol, quercetina e miricetina encontrados, por exemplo, no chá preto (FENNEMA, 1992).

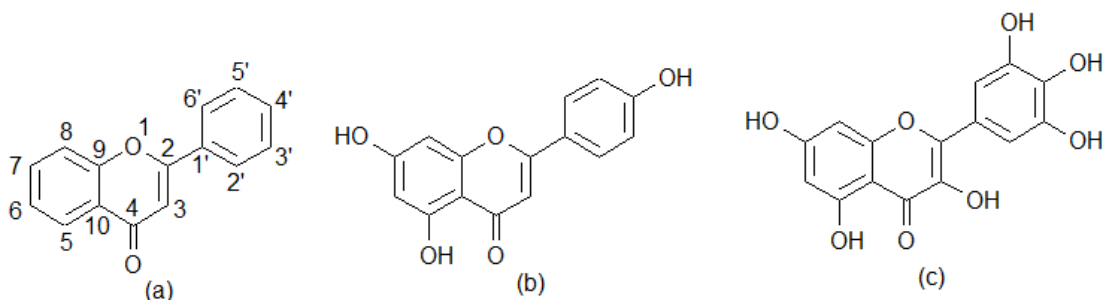


Figura 3 – Exemplos de flavona e de flavonol. (a) Esqueleto básico de flavonas, (b) flavona apigenina e (c) flavonol miricetina.

Fonte: COUTINHO *et al.* (2009)

Flavanonas são flavonóides similares às flavonas, porém não apresentam a insaturação entre os carbonos 2 e 3 (Figura 4, p. 5). A ausência da insaturação torna o carbono 2 um estereocentro, possibilitando a existência de isômeros espaciais. São muito comuns na natureza, sendo metabólitos secundários majoritários, por exemplo, do flavedo de plantas cítricas como a laranja pêra (*Citrus sinensis* L. Osbeck, variedade Pêra).

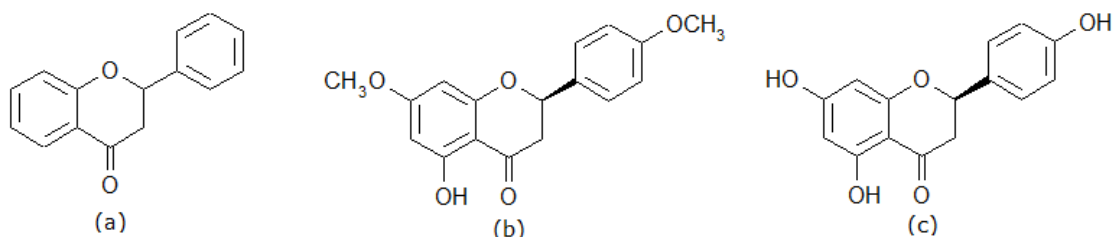


Figura 4 – a) Esqueleto básico de flavanonas, (b) 4',7-dimetoxinarigenina e (c) eriodictiol.

Fonte: SILVA *et al.* (2010)

Por fim, as antocianidinas (Figura 5) são flavonóides de grande importância principalmente na indústria de alimentos, onde são empregadas como pigmentos e antioxidantes naturais. Em meio biológico são encontrados na forma glicosilada (antocianinas), onde podem contribuir significativamente na coloração de frutas, hortaliças, flores, folhas e raízes de plantas (MACHEIX *et al.*, 1990).

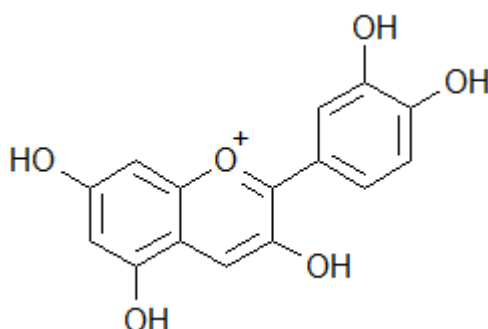


Figura 5 – Estrutura química da antocianidina cianidina.

Fonte: MARÇO *et al.* (2008)

2.2 Isoflavonas

As isoflavonas são flavonóides cujo anel B é ligado diretamente ao carbono 3 no anel (Figura 6), diferente da maioria dos flavonóides onde a ligação se encontra no carbono 2. Como se pode supor, tal comportamento é responsável pelo prefixo "iso" de sua nomenclatura.

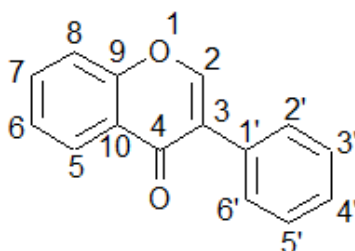


Figura 6 – Esqueleto básico de isoflavonas.

Fonte: PIMENTEL *et al.* (2005)

As isoflavonas são encontradas principalmente em plantas da Família Leguminosae (ou Fabaceae), onde espécies conhecidas como soja (*Glycine max L.*), lentilha (*Lens esculenta Moench*) e grão de bico (*Cicer arietinum*) se encontram. Mesmo derivados de soja como o farelo e alimentos típicos da culinária japonesa como tofu (coagulado protéico), missô (pasta) e tempeh (produto fermentado) mantêm quantidades apreciáveis de isoflavonas (PIMENTEL *et al.*, 2005).

Segundo Pimentel *et al.* (2005), a soja apresenta quatro padrões de isoflavonas: agliconas, glicosídeos, conjugados acetilglicosídeos e malonilglicosídeos, substâncias que se mantêm associadas às moléculas de proteínas em meio biológico.

As agliconas são isoflavonas livres, sem associação com moléculas de açúcares. Os glicosídeos são associações entre isoflavonas e açúcares, podendo estar também esterificados com acetato ou com malonato (Figura 7).

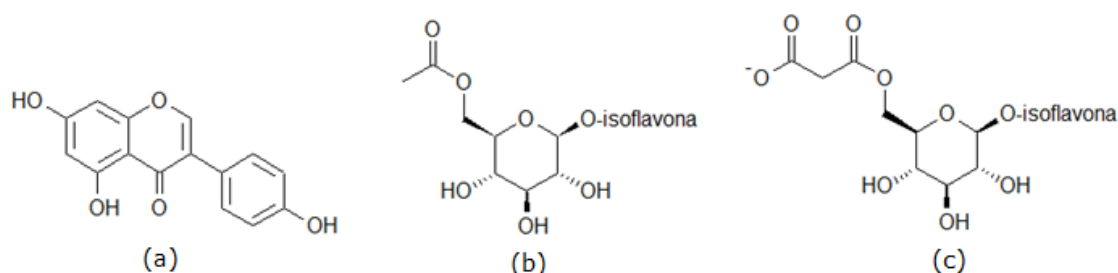


Figura 7 – Exemplos de padrões de isoflavonas. (a) Aglicona, (b) sistema conjugados acetilglicosídeo e (c) sistema conjugado malonilglicosídeo.

Fonte: DOERGE *et al.* (2000)

Apesar da quantidade de trabalhos publicados sobre isoflavonas de soja, sua variedade é baixa. Ávila *et al.* (2007), ao estudarem sementes de soja produzidas em diferentes condições de campo, observaram a existência de 3 agliconas (daidzeína, gliciteína e genisteína) e de 3 malonilglicosídeos (malonila daidzina, malonila glicitina e malonila genistina). César *et al.* (2007) relatam que cápsulas comerciais de soja podem apresentar as agliconas daidzeína, gliciteína e genisteína, os glicosídeos daidzina, glicitina e genistina e as 3 acetila e malonila correspondentes, sendo todas as esterificações localizadas na hidroxila do carbono 6'' da O-β-D-glicopirranose (Figura 8, p. 7).

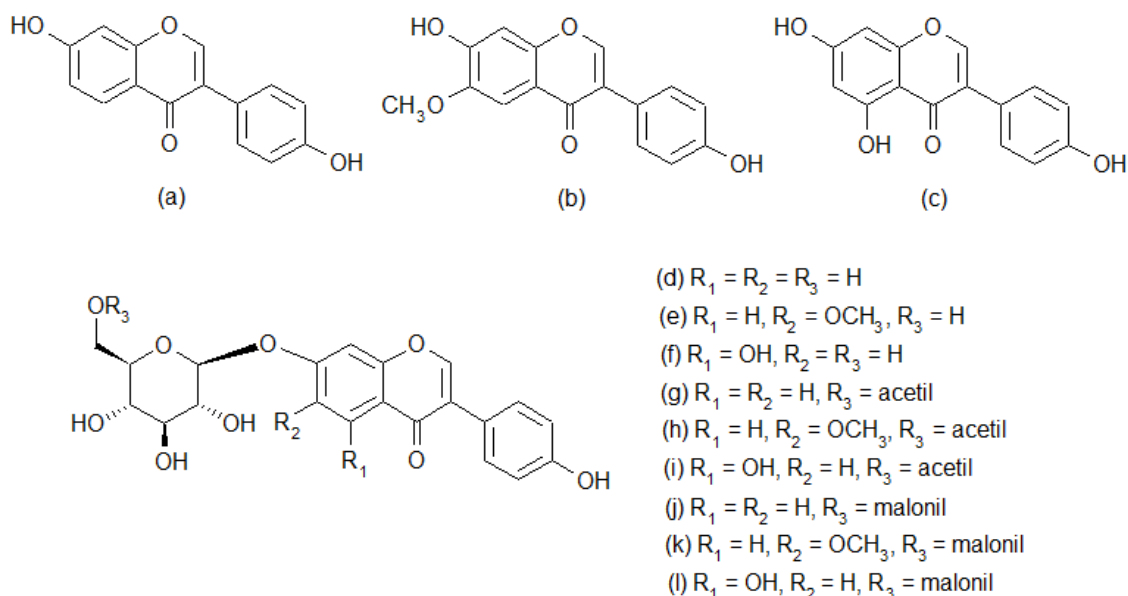


Figura 8 – Isoflavonas de soja. (a) Daidzeína, (b) gliciteína, (c) genisteína, (d) daidzina, (e) glicitina, (f) genistina, (g) 6''-O-acetila daidzina, (h) 6''-O-acetila glicitina, (i) 6''-O-acetila genistina, (j) 6''-O-malonila daidzina, (k) 6''-O-malonila glicitina e (l) 6''-O-malonila genistina.

Fonte: LUI *et al.* (2003)

Plantas do gênero *Pterodon* (Família Leguminosae/Fabaceae), conhecidas popularmente como “sucupiras brancas”, também são potenciais fontes de isoflavonas. Em um estudo de revisão bibliográfica sobre as espécies *Pterodon apparicioi*, *Pterodon polygalaeiflorus* e *Pterodon pubescens*, HANSEN *et al.* (2010) relatam a existência de várias isoflavonas, muitas delas metoxiladas (Figura 9).

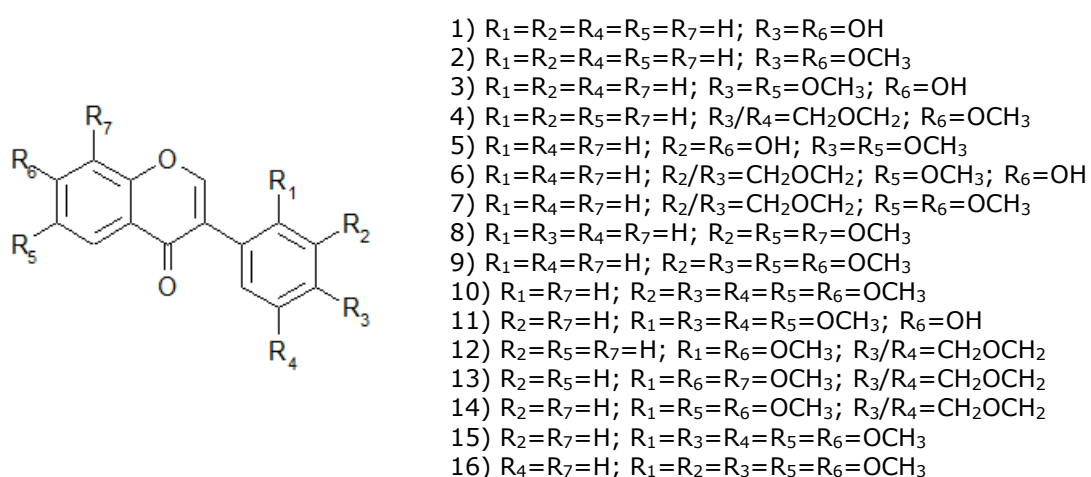
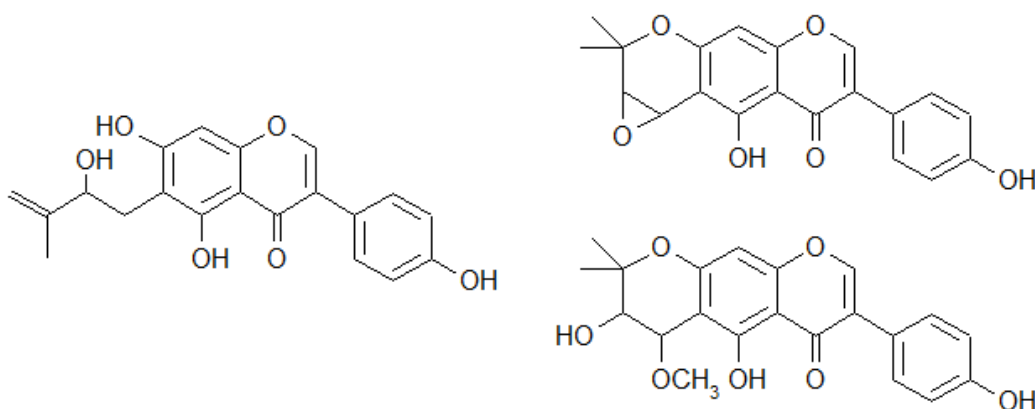


Figura 9 – Isoflavonas do gênero *Pterodon*.

Fonte: HANSEN *et al.* (2010)

Sato *et al.* (1995), ao estudarem os metabólitos secundários das vagens de *Laburnum anagyroides*, verificaram a presença de isoflavonas comuns como a genisteína, além das 3 isoflavonas isoprênicas monossubstituídas, evidenciadas na Figura 10.

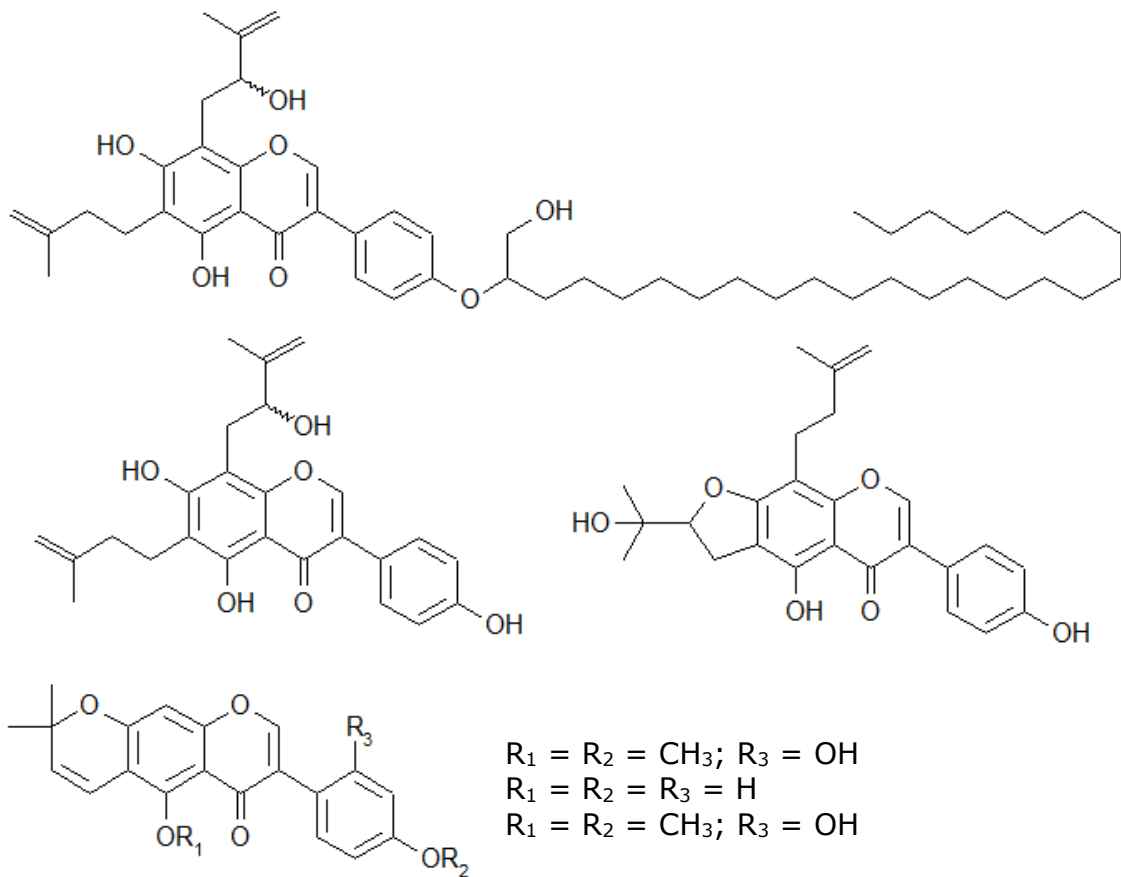


**Figura 10 – Isoflavonas de *Laburnum anagyroides*.
Fonte: SATO *et al.* (1995)**

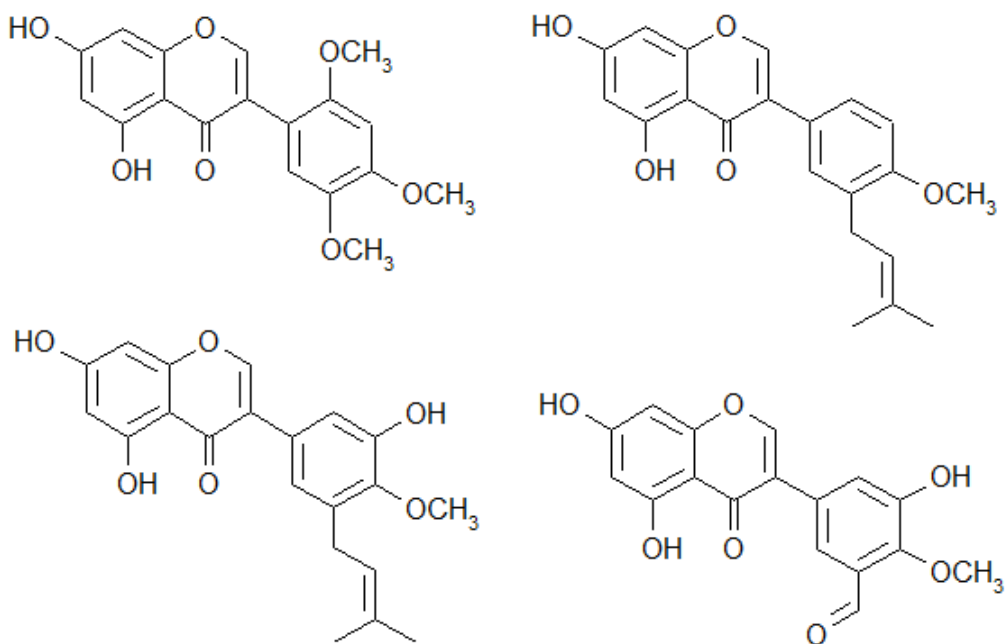
O estudo do extrato polar da casca do caule de *Erythrina indica*, realizado por Nkengfack *et al.* (2001) evidenciou isoflavonas isoprênicas dissustituídas, além de isoflavonas comuns hidroxiladas e metoxiladas (Figura 11, p. 9).

Outra espécie do gênero *Erythrina*, a *E. saculeuxii*, não apresentou as isoflavonas isoprênicas dissustituídas supracitadas, sendo o padrão monossustituído mais freqüente (Figura 12, p. 9) (YENESEW *et al.*, 1998). Da mesma forma que o estudo de Nkengfack *et al.* (2001), as isoflavonas foram obtidas a partir da casca do caule da planta.

Por fim, o gênero *Milletia* também se mostra como uma fonte interessante de isoflavonas, apresentando derivados metilenodióxi, pirano angulares e monoterpênicos (Figura 13, p. 10). A literatura apresenta ainda outros perfis menos comuns não representados no presente trabalho.



**Figura 11 – Isoflavonas de *Erythrina indica*.
Fonte: NKENGFACK *et al.* (2001)**



**Figura 12 – Isoflavonas de *Erythrina saclexii*.
Fonte: YENESEW *et al.* (1998)**

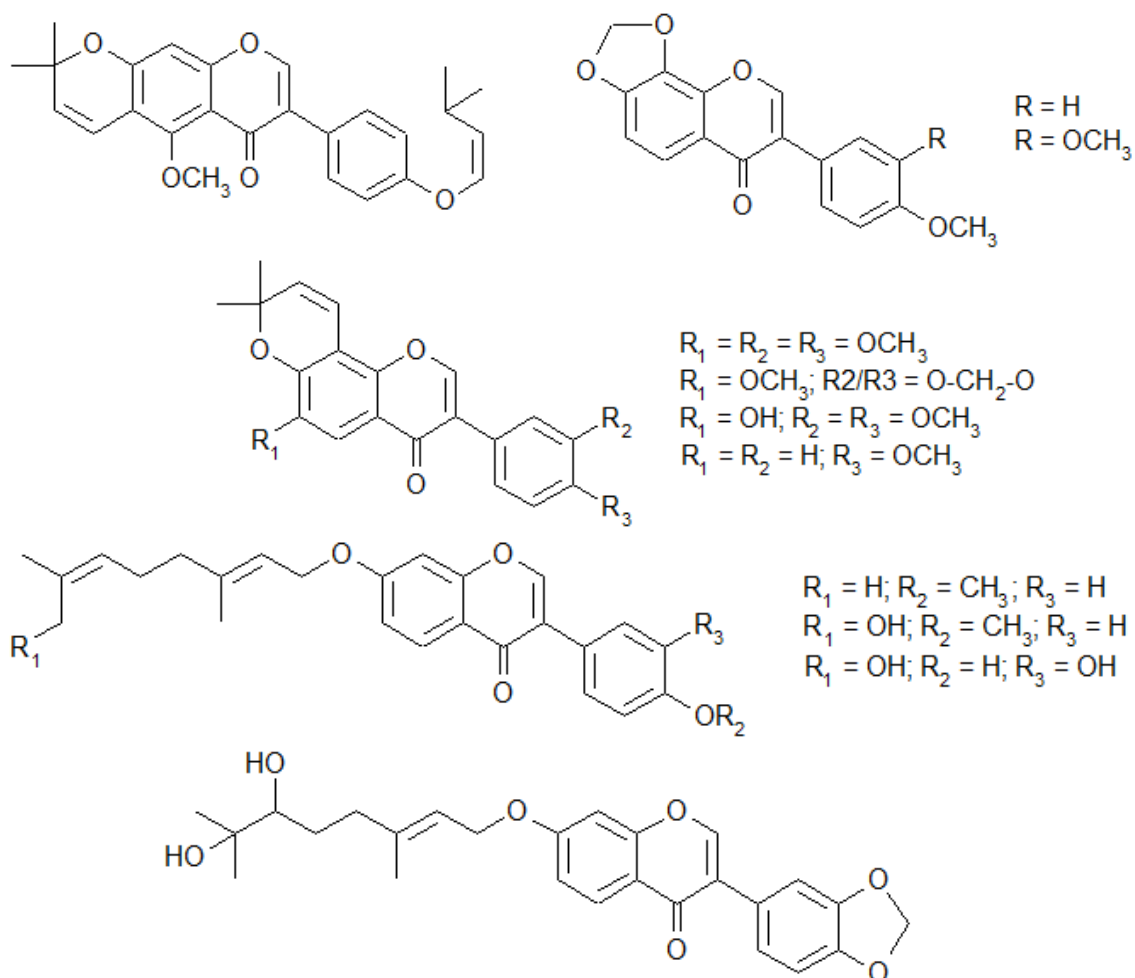


Figura 13 – Isoflavonas do gênero *Millettia*.

Fonte: ASOMANING *et al.* (1995); YENESEW *et al.* (1996); WANDA *et al.* (2006)

2.2.1 Biossíntese

Estudos realizados com variedades de soja mostram que a biossíntese das isoflavonas ocorre por volta de 35 dias após o florescimento da planta. Em torno de 50 dias já é constatado um acúmulo significativo de genistina e malonila genistina e, durante todo o período de maturação das sementes, o acúmulo de daidzina e malonila daidzina (CARRÃO-PANIZZI *et al.*, 1999).

Considerando apenas a morfologia das sementes de soja, sua distribuição ocorre em todas as partes, sendo majoritária no gérmen – o embrião da semente – e ausente na casca (Figura 14) (ANVISA, 2011).

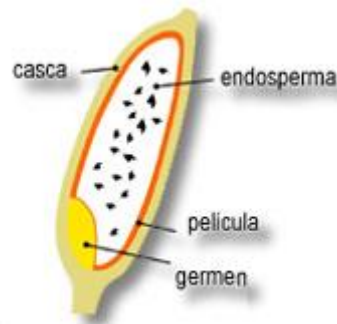


Figura 14 – Representação das diferentes partes de um grão vegetal.

Fonte: EMPÓRIO (2011)

O teor de isoflavonas nas plantas pode variar dependendo de fatores como: genética do grão, condições do solo, clima (tanto na época do cultivo quanto da colheita) e o tipo de processamento empregado no preparo de alimento à base de soja (LEE *et al.*, 2003 *apud* BARBOSA *et al.*, 2006).

Seu mecanismo de biossíntese é misto, pois parte do esqueleto é oriundo da via do acetato e parte da via do chiquimato. Para evidenciar a biossíntese das isoflavonas, será usada como modelo a molécula de genisteína e como base os conhecimentos de LIU *et al.* (2007) e Mann (1987).

Inicialmente, através de uma sequência de reações enzimáticas, o ácido chiquímico é convertido em aminoácidos aromáticos como a fenilalanina e a tirosina. Tal sequência foi omitida no presente trabalho, pois buscou-se priorizar a estruturação das isoflavonas através da interação do ácido cinâmico (via do chiquimato) com o tricetídeo da via do acetato.

Uma vez formada, a fenilalanina perde seu grupo amino através da ação catalítica da enzima fenilalanina amônia liase. Ao sofrer desaminação, o carbono continua estereogênico, porém agora em um padrão de isomeria geométrica *TRANS* (maior estabilidade). O produto da reação é o cinamato que, na sequência, é oxidado por meio da enzima ácido cinâmico 4-hidroxilase na posição *para* no anel, provavelmente por apresentar menor efeito estereoquímico (Figura 15, p. 12).

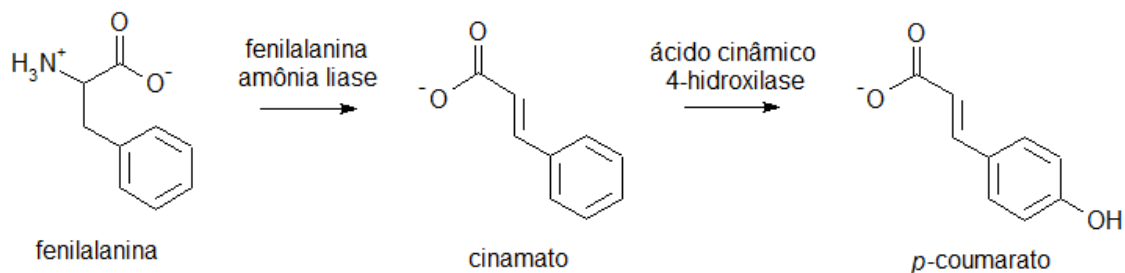


Figura 15 – Conversão da fenilalanina em p -coumarato.

Fonte: LIU *et al.* (2007) (Adaptado)

O p -coumarato é, então, convertido em p -coumaroil CoA devido à reação de substituição nucleofílica com uma coenzima A, processo catalisado pela enzima 4-coumarato CoA ligase e que demanda ATP para ocorrer. Em seguida, enzimas chalcona sintases catalisam a reação onde o p -coumaroil CoA reage com o tricetídeo formado a partir de 3 moléculas de malonila CoA, oriundas da via do acetato. Cada malonila CoA reage com o outro, através de substituições nucleofílicas cujos nucleófilos correspondem aos carbonos α , relativamente básicos. Os grupos carboxilatos correspondem aos grupos abandonadores. O mesmo sistema enzimático de chalcona sintases ainda catalisa a isomeria tautomérica do p -coumaroil substituído formando uma chalcona. Para tanto, os grupos carbonilas são convertidos em enóis. Como os 6 carbonos do tricetídeo formam um ciclo, os enóis geram um anel aromático (Figura 16, p. 13).

A chalcona formada é, então, transformada em uma flavanona por meio da reação de uma das hidroxilas fenólicas na insaturação da cadeia lateral proveniente do coumarato. Tal processo é catalisado pela enzima chalcona isomerase. Por fim, a flavanona é convertida em uma isoflavona através da ação de enzimas isoflavona sintases. Para tanto, a ligação entre os carbonos 2 e 3 é oxidada, formando uma ligação dupla (flavona) e o anel B migra do carbono 2 para o carbono 3, via processo radicalar (Figura 17, p. 13).

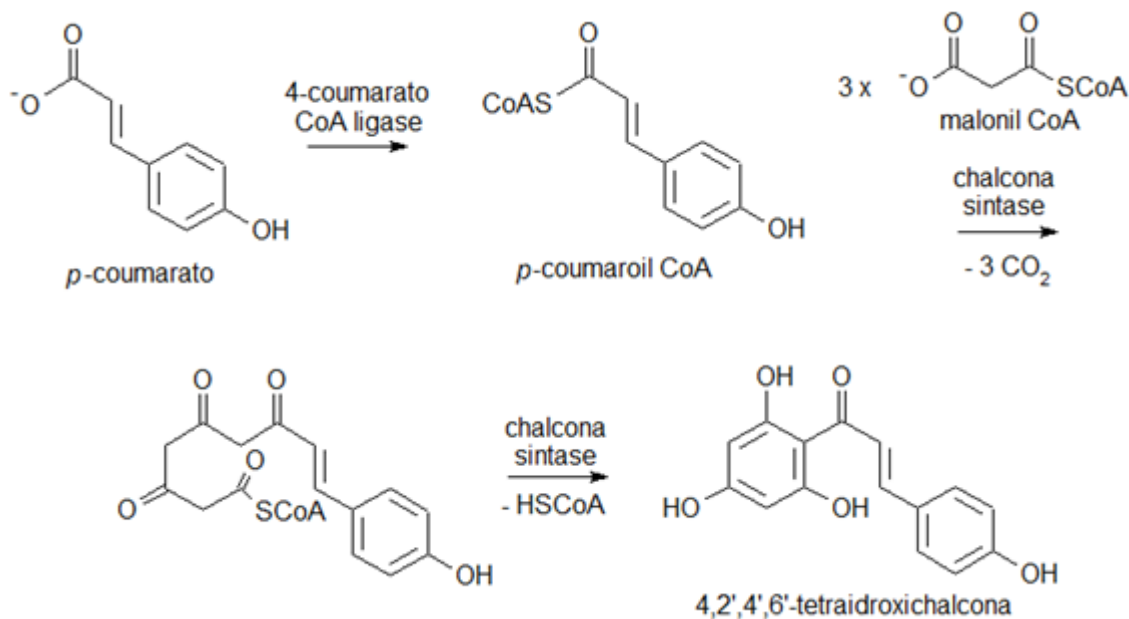


Figura 16 – Conversão de p-coumarato em uma chalcona.
Fonte: Adaptado de LIU *et al.* (2007)

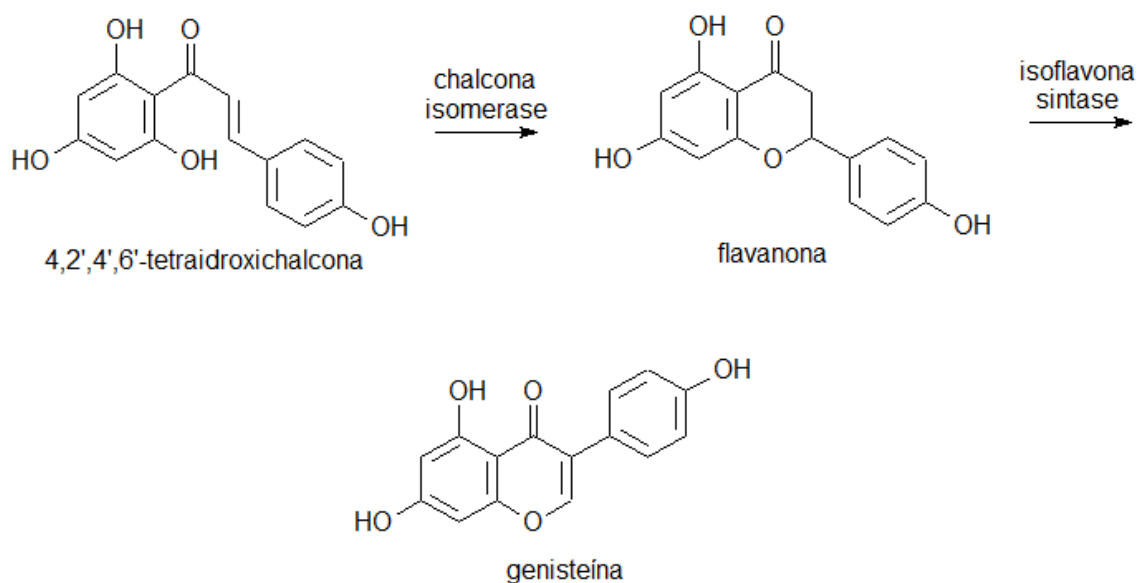


Figura 17 – Conversão da chalcona em uma isoflavona.
Fonte: Adaptado de LIU *et al.* (2007)

2.2.2 Propriedades Químicas

Entre as variadas propriedades químicas das isoflavonas, a solubilidade, a acidez, a capacidade antioxidante e o perfil das substituições eletrofílicas nos anéis benzênicos se mostram interessantes. Tal importância está relacionada às análises de caracterização e indiretamente às suas propriedades nutracêuticas.

2.2.2.1 Solubilidade

Ao se tratar da solubilidade, verifica-se que solventes polares como água e etanol facilmente realizam ligações de hidrogênio com as hidroxilas dos açúcares dos glicosídeos de isoflavonas, tornando-os solúveis. As agliconas fenólicas, por sua vez, são solúveis em solventes de média polaridade como o éter etílico e parcialmente solúveis em solventes de alta polaridade como a água (EVANS, 1996 *apud* YANO, 2006).

Isoflavonas isoprênicas ou metoxiladas tendem a apresentar menor polaridade, podendo se solubilizar em solventes menos polares que o éter etílico.

2.2.2.2 Acidez

A acidez de isoflavonas aumenta com a presença de hidroxilas fenólicas em sua estrutura. Segundo Morrison e Boyd (1992), os fenóis são compostos relativamente ácidos, capazes de formar ânions fenolato espontaneamente. Além disso, os compostos fenólicos apresentam pK_a baixo o suficiente para reagir com bases inorgânicas formando ânions fenolato.

Análises de Cromatografia de Camada Delgada (CCD) e de CLAE geralmente são realizadas com fases móveis formadas em parte por ácidos. Seu emprego tem como princípio minimizar a presença dos ânions fenolato de isoflavonas, tornando as manchas e os picos de CCD e de CLAE, respectivamente, menos largos e, com isso, favorecendo sua separação.

2.2.2.3 Perfil das reações de substituição eletrofílica

Como observado no item 2.2, as isoflavonas apresentam dois anéis benzênicos: A e B. Além disso, a biossíntese de isoflavonas comuns gera esqueletos com hidroxilas no anel A (carbonos 5 e 7) e no anel B (carbono 4') e servem como base para as isoflavonas terpênicas, metoxiladas, metilenodióxi, entre outras.

Segundo Morrison e Boyd (1992), cada hidroxila fenólica é capaz de favorecer cineticamente as reações de substituição eletrofílica nas posições *orto* e *para* do anel (ativação *orto-para*). Esse efeito ocorre, pois um dos pares de elétrons não-ligantes do oxigênio fenólico é usado para formar uma ligação π com o carbono adjacente, forçando os elétrons π vizinhos entrarem em ressonância e, em média, apresentarem alta densidade de

carga negativa nas posições citadas. Como consequência, os carbonos com alta densidade de carga negativa são mais propensos a reagir com os eletrófilos disponíveis (Figura 18).

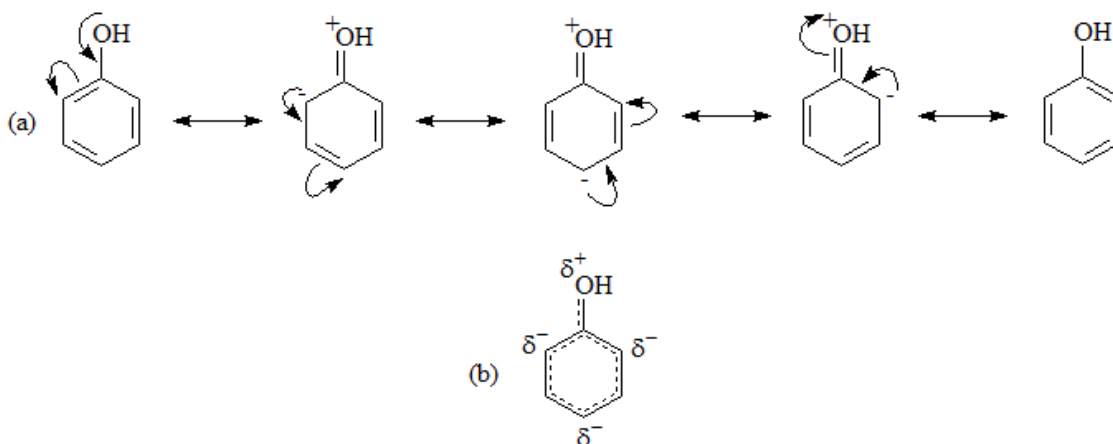


Figura 18 – a) Representação da ativação *o-p* de um anel aromático por um grupo hidroxila. b) Híbrido de ressonância do fenol representando a densidade de carga negativa nas posições *o-p*.
Fonte: MORRISON e BOYD (2005) (Adaptado)

2.2.2.4 Atividade antioxidante

A capacidade antioxidante das isoflavonas é vinculada à presença de hidroxilas em sua estrutura química. Corroborando com tal afirmação, NAIM *et al.* (1976) *apud* BARBOSA *et al.* (2006) reportaram que a capacidade antioxidante das isoflavonas decresce com a glicosilação ou a substituição do grupo hidroxila pelo grupo metoxila.

Segundo COOK *et al.* (1996) *apud* BARBOSA *et al.* (2006), as isoflavonas podem inibir a peroxidação lipídica *in vitro* por ação de seqüestro de radicais livres ou por atuar como agentes quelantes de metais.

Além disso, as isoflavonas *o-* ou *p*-diidroxiladas podem atuar de forma similar aos fenóis diidroxilados correspondentes, formando derivados de quinonas após uma oxirredução (atividade antioxidante) (Figura 19).

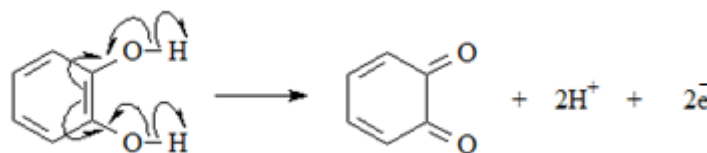


Figura 19 – Representação da capacidade antioxidante de compostos fenólicos *o*-diidroxilados.
Fonte: ARAÚJO (2011) (Adaptado)

2.2.3 Técnicas de Quantificação

As isoflavonas são analisadas e quantificadas através do emprego de técnicas como a CLAE (WANG *et al.*, 2002 *apud* CÉSAR *et al.*, 2007).

O preparo das amostras é geralmente realizado através da secagem, pulverização, remoção do material de baixa polaridade e extração das isoflavonas, processo este que leva em conta a alta polaridade dos glicosídeos majoritários.

Ávila *et al.* (2007) realizaram a moagem de sementes de soja em moinho de facas a 17000 rpm por 60 segundos. A extração dos constituintes de baixa polaridade foi realizada com hexano, com agitação constante por 24 horas, à temperatura ambiente. A extração das isoflavonas foi realizada com etanol:água (70:30) e ácido acético 0,1% (v/v) por uma hora com agitação a cada 15 minutos. Por fim, a mistura foi centrifugada e o sobrenadante coletado para análise.

Genovese *et al.* (2006), para extrair as isoflavonas de suplementos nutricionais, pulverizou as amostras em gral e realizou a extração com agitação mecânica por duas horas a 40°C com metanol 80% (v/v). Os extratos foram filtrados utilizando-se papel de filtro Whatman nº 6 para balão volumétrico, onde tiveram seu volume completado com água destilada para 250 mL, para posterior aplicação em colunas de extração em fase sólida de poliamida. Após a passagem das amostras, as colunas foram lavadas com 20 mL de água destilada e a eluição das isoflavonas foi feita com 50 mL de metanol:amônia (99,5:0,5). Os eluatos foram submetidos a rotaevaporação e a amostra final foi dissolvida com metanol grau CLAE.

CARRÃO-PANIZZI *et al.* (1999) empregaram sementes de soja como matéria-prima de isoflavonas. Tais sementes foram secas em estufa de circulação de ar forçada a 50°C por 3 dias e, em seguida, moídas em moinho. A extração dos materiais de baixa polaridade foi realizada com hexano durante uma noite. A matéria seca foi então extraída por uma noite com dimetilssulfóxido:metanol (1:1) a 50°C. Os extratos líquidos, obtidos por filtração, foram submetidos à centrifugação a 20,8 g por 15 min a 5°C, gerando a amostra final.

Por sua vez, a análise cromatográfica das isoflavonas emprega geralmente fase estacionária reversa e fase móvel polar, proporcionando aos glicosídeos

uma eluição mais rápida que as agliconas. A eluição da fase móvel pode ser isocrática ou gradiente, tornando possível a quantificação em diferentes bombas cromatográficas. Tendo em vista a presença de anéis benzênicos e o custo menos elevado, os detectores empregados com mais frequência são o de ultravioleta (UV) e o de arranjo de foto diodos (DAD).

Como relatado no item 2.2.2.2, as isoflavonas com hidroxilas fenólicas podem formar fenolatos. Para evitar tal reação, as fases móveis empregadas geralmente são compostas em parte por ácidos como o ácido acético ou o ácido trifluoroacético. Como consequência, as isoflavonas se mantêm com o perfil fenólico, os picos cromatográficos ficam mais estreitos e a resolução de separação se torna maior.

A quantificação de isoflavonas realizada por Ávila *et al.* (2007) empregou coluna de fase reversa ODS C₁₈ e eluição gradiente (A: metanol com 0,025% de TFA e B: água destilada deionizada ultra pura contendo 0,025% de TFA). A eluição começou com 20% de A e, com gradiente linear, após 40 minutos seguiu até 100% de A. O fluxo da fase móvel foi igual a 1 mL/min e a detecção foi realizada por meio de um detector DAD (260 nm).

Por sua vez, César *et al.* (2007) quantificou isoflavonas em cápsulas comerciais empregando coluna de fase reversa Lichrospher e eluição isocrática com a seguinte fase móvel: metanol:água 52:48 com ácido acético 0,1% (v/v). Empregou-se um fluxo de 1 mL/min, temperatura igual a 30°C e detecção a 254 nm via DAD.

Pereira *et al.* (2002) quantificaram isoflavonas e equol em amostras de melão de soja, no plasma e em urina empregando coluna de fase reversa Hypersil ODS com fluxo da fase móvel igual a 0,8 mL/min. Utilizou-se gradiente linear composto por ácido acético em água 10:90 (A) e metanol:acetonitrila:diclorometano (10:5:1) (B). O gradiente iniciou com 5% de B, mantido por 5 min, e passou para 45% de B em 5 min. Em seguida, a porcentagem de B foi alterada para 70% em 6 min e, por fim, mantido por 3 min. As isoflavonas foram identificadas a 262 nm e o equol a 280 nm, além do espectro completo de UV, através de um DAD.

Outra peculiaridade das análises quantitativas é a hidrólise ao final do preparo das amostras, procedimento usado para se conhecer as isoflavonas presentes na forma de glicosídeos quando não há padrões analíticos destes.

César *et al.* (2007) realizou o processo hidrolítico da seguinte forma: pesou-se quantidade do extrato seco ou do pó das cápsulas equivalente a 20 mg de isoflavonas totais e transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL. Foram adicionados 80 mL de HCl etanólico 3,0 mol/L, mantendo o sistema em um banho de ultrassom, por 5 minutos, seguido de aquecimento em banho de vapor, por 40 minutos. Após resfriamento, completou-se o volume com o mesmo solvente e filtrou-se. Por fim, a amostra final foi preparada a partir de uma diluição com a própria fase móvel.

A Figura 20 evidencia a comparação dos cromatogramas de 3 amostras de cápsulas de isoflavonas, onde se nota diferentes perfis antes e após a hidrólise. Em todas as amostras os picos 1 e/ou 2 desaparecem após a reação de hidrólise ao mesmo tempo em que a área de um ou mais picos das agliconas aumenta. Tal comportamento prova que os picos 1 e 2 correspondem a glicosídeos e que os picos 3, 4 e 5 correspondem a agliconas. Ao final, a concentração total pós-hidrólise de cada aglicona foi determinada com o emprego de padrões analíticos correspondentes.

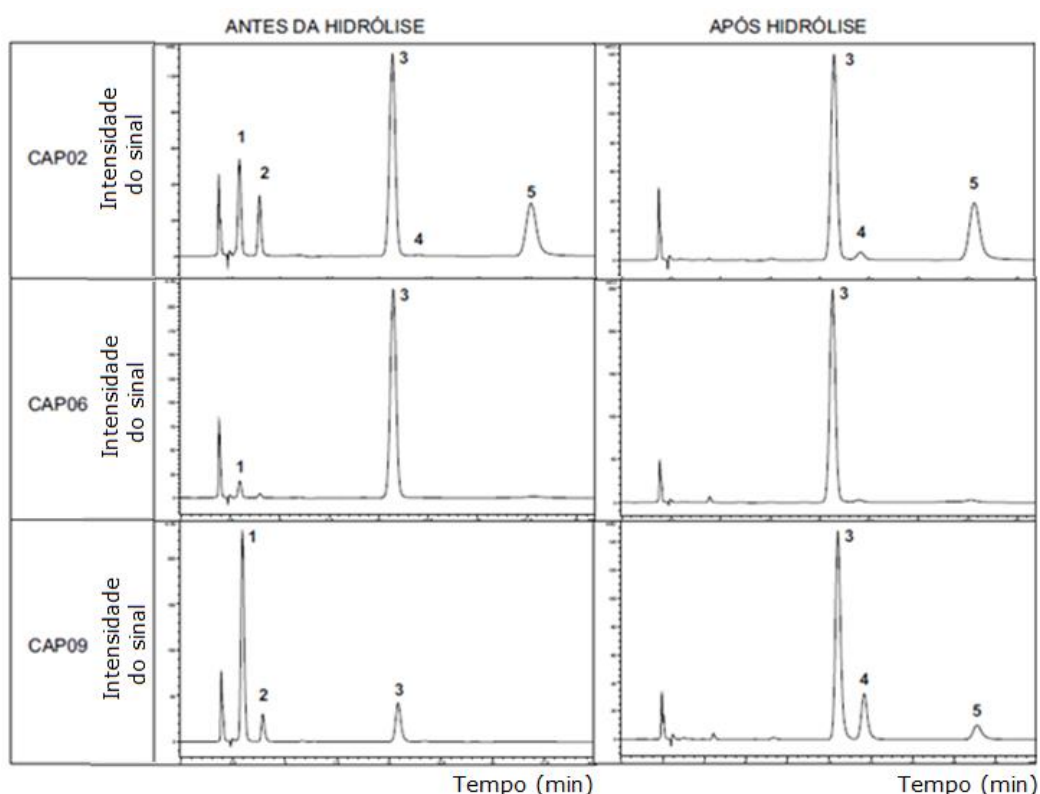


Figura 20 - Cromatogramas antes e após hidrólise de 3 amostras de cápsulas de isoflavonas comerciais (CAP02, CAP06 e CAP09). Identificação dos picos: 1 e 2 - glicosídeos; 3 - daidzeína; 4 - gliciteína e 5 - genisteína.

Fonte: CÉSAR *et al.* (2007) (Adaptado)

2.2.4 Processamentos e produtos à base de soja

As matérias-primas que contêm isoflavonas, como a soja, podem ser processadas com o objetivo de disponibilizar produtos comerciais variados como a farinha integral, farinha desengordurada, isolado protéico de soja, proteína texturizada, suplemento à base de gérmen de soja, tofu, missô, tempeh, etc. Dependendo do processamento, o teor de isoflavonas pode se manter inalterado, ser reduzido ou, até mesmo, tender a zero.

Barbosa *et al.* (2006), após determinarem o teor total de isoflavonas em diferentes produtos de soja, perceberam que o suplemento à base de gérmen de soja é o produto comercial de maior teor (711 ± 5 mg/100 g). Tal característica se justifica devido ao fato das sementes acumularem mais isoflavonas no gérmen (ANVISA, 2011). Ao retirar o endosperma e a casca, otimiza-se o processo de extração.

O teor total de isoflavonas em farinha de soja também foi maior do que nas sementes, sendo os valores apresentados a seguir: sementes (110 ± 2 mg/100 g), farinha de soja integral (191 ± 6 mg/100 g) e farinha de soja desengordurada comercial (200 ± 1 mg/100 g) (BARBOSA *et al.*, 2006). O maior teor nas farinhas é justificado pelo processo de secagem das sementes, onde o teor de isoflavonas é mantido, porém a massa da matriz é reduzida pela perda de água. Entre as farinhas, a desengordurada apresenta maior teor, pois sua massa não apresenta a matéria lipídica, extraída com solventes de baixa polaridade. Como consequência, o teor se torna maior.

Barbosa *et al.* (2006) ainda analisaram amostras de isolado protéico de soja (124 ± 1 mg/100 g) e de proteína texturizada (95 ± 1 mg/100 g). Ao considerar que as isoflavonas de soja se encontram associadas às proteínas (PIMENTEL *et al.*, 2005), torna-se claro a proximidade entre os valores nas amostras de sementes de soja e de isolado protéico. Somado a isso, vale salientar que os isolados protéicos de soja podem ser produzidos a partir da farinha de soja desengordurada (LUI *et al.*, 2003), possibilitando uma maior extração de proteínas, e de isoflavonas, para uma mesma massa de matéria-prima. Por outro lado, como a proteína texturizada corresponde a um extrato protéico não puro, o teor de isoflavonas tende a ser menor, como evidenciado pelos resultados de Barbosa *et al.* (2006).

LUI *et al.* (2003) produziu isolados protéicos de soja submetendo farinha de soja desengordurada a uma extração à quente (55°C) em pH 9,0. Os resíduos centrifugados foram descartados e a suspensão foi acidificada (pH 4,5). Por fim, o precipitado formado foi centrifugado e liofilizado, tornando-se o isolado protéico de soja. A proteína texturizada de soja ou extrato protéico foi obtida de duas formas: a) precipitação ácida e b) precipitação alcoólica. De modo geral, porções de farinha de soja desengordurada foram acondicionadas em meio ácido ou em meio hidroalcoólico sob agitação à temperatura ambiente. O precipitado formado foi centrifugado e liofilizado junto ao resíduo da matriz, formando a proteína texturizada (LUI *et al.*, 2003).

GOÉS-FAVONI *et al.* (2004) analisaram alguns produtos comerciais à base de soja com relação ao teor de isoflavonas. Os referidos autores também observaram que farinhas de soja desengorduradas (168 mg/100 g) apresentam maiores teores de isoflavonas do que farinhas de soja integrais (96 e 138 mg/100 g). Somado a isso, compararam esses produtos com farinhas de soja torradas (65 e 78 mg/100 g) e verificaram que a torra reduz significativamente o teor de isoflavonas, provavelmente através de sua degradação térmica. Outro comportamento interessante é a distribuição dos tipos de isoflavonas, sendo majoritária a presença de glicosídeos conjugados, seguida dos glicosídeos comuns e, por fim, das agliconas.

As amostras de proteína texturizada de soja também apresentaram uma variação considerável, entre 68 a 112 mg/100 g. Entretanto, o teor de glicosídeos conjugados nem sempre foi maior do que o de glicosídeos comuns, indicando possivelmente influência do processamento ácido, responsável por hidrolisar parte dos glicosídeos conjugados com grupos malonila ou acetila. Como o teor de agliconas se manteve relativamente baixo (4,6 a 8,2 mg/100 g), descarta-se sua formação a partir da hidrólise ácida da ligação entre o açúcar e a isoflavona.

Por sua vez, ROSSI *et al.* (2004) elaboraram um iogurte à base de soja e, interessados na influência do processamento, quantificaram as isoflavonas em cada etapa de fabricação. A matéria-prima apresentou teor igual a $66,60 \pm 3,30$ mg/100 g. Após o descascamento das sementes, o teor de isoflavonas manteve-se estatisticamente inalterado. Em seguida, as

sementes descascadas foram cozidas e a água de cozimento descartada. O teor de isoflavonas na pasta pós-cozimento foi igual a $44,08 \pm 1,38$ mg/100 g, identificando uma perda devido à solubilização de parte dos glicosídeos na água. O passo seguinte foi a formação do leite de soja através da extração do conteúdo protéico em meio de NaHCO_3 , aromatizantes, água e açúcar. A diluição da pasta cozida gerou uma redução significativa no teor de isoflavonas, passando a $7,05 \pm 0,73$ mg/100 g. Por fim, o último fator de redução foi a diluição do meio necessário à fermentação do leite de soja, tornando a concentração igual a $5,10 \pm 0,22$ mg/100g, valor que estatisticamente não foi alterado até a formação do iogurte de soja.

Assim, o trabalho de ROSSI *et al.* (2004) deixa claro que, dependendo das etapas de processamento, o teor de isoflavonas pode reduzir sistematicamente. O iogurte de soja, por exemplo, apresentou teor de isoflavonas 12,7 vezes menor que a matéria-prima correspondente.

O óleo de soja é um produto que não contém isoflavonas, apesar de ser derivado de uma matéria-prima rica em tais substâncias. De acordo com EMBRAPA (2011), sua produção inicia com a pré-limpeza, passando pela moagem e, na sequência, pelo cozimento a vapor. Esta etapa não dilui sistematicamente o teor de isoflavonas e não as perde por extração em água. Após o cozimento, as sementes são laminadas e submetidas à extração com hexano para a obtenção do óleo. Como o hexano é um solvente de baixa polaridade, não se mostra útil à extração de isoflavonas, mantendo-as na pasta de sementes de soja. A fase hexânica dará origem ao óleo de soja após a destilação e ao processo de degomagem, enquanto que a pasta de sementes de soja, rica em isoflavonas, é direcionada à produção de, por exemplo, farelo de soja.

Como último exemplo de produto, cita-se o molho de soja. Segundo NAKAMURA *et al.* (2000) *apud* ROSSI *et al.* (2004), o molho de soja apresenta baixos teores de isoflavonas. Ao considerar seu processo de fabricação, nota-se que as etapas de fermentação e descarte da pasta de soja pós-prensagem são responsáveis pela diluição do meio e pela perda de parte das isoflavonas, respectivamente.

Assim, após avaliar os comportamentos supracitados, percebe-se que o processamento de matérias-primas ricas em isoflavonas deve levar em

conta 3 características principais para evitar sua perda: a) emprego de solventes inadequados à sua extração ou que extraíam as isoflavonas para o material de descarte; b) diluição da matéria-prima e c) aquecimento intenso.

2.2.5 Absorção e eliminação

Segundo Esteves e Monteiro (2001), há uma considerável variabilidade na eficiência digestiva das isoflavonas. Somente as agliconas ou seus derivados metabólicos são absorvidos pela barreira epitelial do intestino, processo que ocorre passivamente via micelas. Os glicosídeos, por sua vez, devem ser hidrolisados pela microbiota intestinal para, então, serem absorvidos.

As enzimas que catalisam a hidrólise dos glicosídeos são denominadas glicosidases (PIMENTEL *et al.*, 2005).

Uma vez que os glicosídeos são hidrolisados, cerca de um terço das agliconas são absorvidas em sua forma original. A quantidade restante é metabolizada por bactérias e, então, absorvida. A daidzeína, por exemplo, é convertida parcialmente no metabólito denominado equol (Figura 21) (NACHTIGALL *et al.*, 2001 *apud* CLAPAUCH *et al.*, 2002).

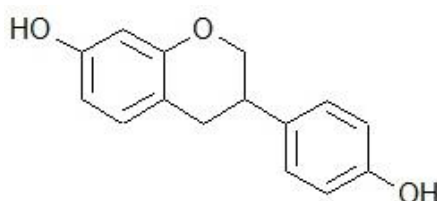


Figura 21 – Estrutura química do equol.
Fonte: WU *et al.* (2003)

Após a absorção, as agliconas são incorporadas nos quilomícrons, responsáveis por transportá-las ao sistema linfático e, na sequência, ao sistema circulatório.

Os quilomícrons distribuem as isoflavonas em todos os tecidos extra-hepáticos, onde irão exercer seus efeitos metabólicos. Na sequência, a retomada das isoflavonas do sangue é realizada por quilomícrons remanescentes, responsáveis por direcioná-las ao fígado (ESTEVES e MONTEIRO, 2001).

Quando o fígado libera as isoflavonas na bile, parte é reabsorvida pela circulação entero-hepática e parte é excretada nas fezes (ANDERSON e

GARNER, 1997 *apud* ESTEVES e MONTEIRO, 2001). Salienta-se que a eliminação urinária também é representativa, correspondendo entre 10 a 30% do teor de isoflavonas consumidas (SETCHELL *apud* ESTEVES e MONTEIRO, 2001).

2.2.6 Biodisponibilidade

Segundo Pimentel *et al.* (2005), o fator determinante na eficácia das isoflavonas no organismo é sua biodisponibilidade, isto é, seu acesso ao campo de ação no organismo. Como observado no item 2.2.5, somente as agliconas das isoflavonas são absorvidas pelo organismo, portanto sua biodisponibilidade depende de uma microbiota intestinal saudável.

Pereira *et al.* (2002) verificaram que a genisteína e genistina são menos biodisponíveis que a daidzeína e daidzina, pois, independente do teor dos compostos citados na ração, as concentrações de daidzeína e daidzina foram mais elevadas no plasma e na urina dos coelhos. Uma provável justificativa pode ser encontrada no trabalho de Xu *et al.* (1995) *apud* Pereira *et al.* (2002), onde verificou-se que a daidzeína é mais resistente ao metabolismo bacteriano da microbiota intestinal de seres humanos.

A biodisponibilidade das isoflavonas pode depender também de sua interação com outros componentes da dieta. Estudos compararam a excreção urinária de isoflavonas em mulheres alimentadas com diversos tipos de produtos derivados da soja, como tofu, tempeh e grãos de soja. Observou-se que as taxas de isoflavonas na urina eram similares embora os alimentos tivessem composições químicas diferentes. Por outro lado, pesquisas envolvendo homens que ingeriram tempeh ou grãos de soja mostraram que as isoflavonas do tempeh tiveram absorção duas vezes maior quando comparadas às isoflavonas do grão. Neste caso, foi proposto que a diferença de teores se deveu à maior incidência de agliconas no produto fermentado, no caso, o tempeh (PIMENTEL *et al.*, 2005). Pascual-Teresa (2006) endossa tal justificativa ao afirmar que processos fermentativos com enzimas glicosidases podem resultar no aumento dos níveis de agliconas oriundas de alimentos comerciais à base de soja.

Outro fator vinculado à biodisponibilidade de isoflavonas é a possível necessidade de vincular-se a outras substâncias presentes nas matérias-

primas alimentícias. Por exemplo, o estudo desenvolvido por Pereira *et al.* (2002) obteve maiores concentrações plasmáticas de isoflavonas em consumidores de ração comercial à base de soja do que em consumidores de ração experimental enriquecida com isoflavonas purificadas.

A administração de antibióticos também pode dificultar o metabolismo de isoflavonas pela microbiota intestinal ou, em casos extremos, impedir sua ocorrência (PIMENTEL *et al.*, 2005).

Por fim, fatores como o tipo de dieta, a sensibilidade individual, o perfil genético, a fase da vida e o processamento industrial também são responsáveis por alterações na biodisponibilidade de isoflavonas (ANVISA, 2011).

2.2.7 Atividades nutracêuticas

A aquisição de conhecimentos decorrentes das pesquisas com isoflavonas tem revelado grande potencialidade no auxílio à prevenção e tratamento de doenças crônicas, tais como alguns tipos de câncer (mama, próstata e cólon), doenças cardiovasculares, diabetes, osteoporose e problemas vasomotores, que ocorrem ou se intensificam principalmente na fase da menopausa e pós-menopausa das mulheres. Como consequência, tem-se observado uma maior procura por alimentos à base de soja, bem como suplementos contendo extratos secos de isoflavonas (ESTEVES e MONTEIRO, 2001).

Ao considerar o conjunto de benefícios supracitados, procurou-se descrever no presente trabalho como as isoflavonas auxiliam a prevenção das doenças a seguir.

2.2.7.1 Atividade fitoestrógena

O hipoestrogenismo ocorre naturalmente em mulheres em período de menopausa e pode ser responsável por distúrbios como sintomas vasomotores, doenças cardiovasculares, osteoporose, alterações urogenitais, distúrbios cognitivos, ondas de calor (fogachos), insônia, transpiração intensa, dor de cabeça e depressão. Como forma de minimizar os efeitos negativos do hipoestrogenismo, tornou-se bastante difundido nas últimas décadas o uso de estrógenos e progestógenos (FERREIRA *et al.*,

1999 *apud* WOLFF *et al.*, 2006). Entretanto, a presente prática pode ocasionar efeitos adversos como mastalgias (dor nos seios), sangramentos uterinos irregulares e aumento do risco relativo para neoplasias de mama (COLDITZ *et al.*, 1998 *apud* WOLFF *et al.*, 2006). Como conseqüência, observa-se certo receio ao tratamento hormonal em parte das mulheres e a busca por terapias alternativas como o uso de fitoestrógenos (WOLFF, L. P. G. *et al.*, 2006).

As isoflavonas genisteína e daidzeína são consideradas moduladores seletivos dos receptores estrogênicos, possuindo, como se pode presumir, afinidade com os receptores de estrogênio. Tal característica é conseqüência da similaridade estrutural do esqueleto das referidas isoflavonas com o hormônio feminino 17- β -estradiol (Figura 22) (MORAES *et al.*, 2009).

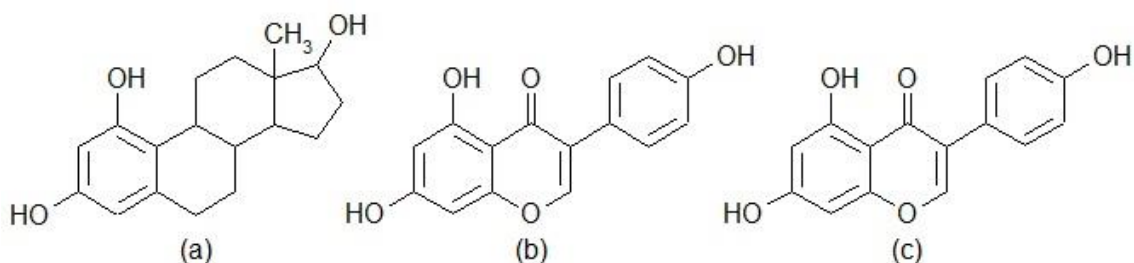


Figura 22 – Comparação estrutural entre o hormônio feminino (a) 17- β -estradiol e as isoflavonas (b) genisteína e (c) daidzeína. Fonte: MORAES *et al.* (2009)

Estudos mostram que a atividade estrogênica de isoflavonas é menor que a atividade do hormônio 17- β -estradiol, entretanto, consumidores regulares de alimentos como a soja podem manter em seu organismo concentrações até mil vezes maiores de isoflavonas comparadas à do 17- β -estradiol. Tal condição é suficiente para a existência do efeito fisiológico hormonal (MORAES *et al.*, 2009).

Além disso, as isoflavonas podem bloquear os receptores estrogênicos do tecido uterino e mamário quando os níveis de hormônios estrogênicos são muito altos, como no caso das mulheres em idade pré-menopausa. Tal comportamento é denominado atividade antiestrogênica (MORAES *et al.*, 2009).

Ao considerar os distúrbios vasomotores, as isoflavonas podem agir nos centros termorreguladores do hipotálamo, atenuando os sintomas negativos (HAN *et al.*, 2002).

Pimentel *et al.* (2005) relatam alguns estudos realizados com mulheres pós-menopausa para avaliar os efeitos das isoflavonas sobre as ondas de calor e na citologia vaginal. Como resultado, observou-se que o consumo de uma dieta rica em isoflavonas por 12 semanas reduziu os fogachos em 54% e os problemas de ressecamento vaginal em 60%.

Nahás *et al.* (2003) realizaram um estudo clínico similar com 50 mulheres em menopausa, divididas em dois grupos de 25 mulheres, sendo um grupo tratado com isoflavonas (4 cápsulas/dia de 500 mg de gérmen de soja, divididas em duas tomadas, durante seis meses) e outro com placebo. Ao final do estudo, observou-se desaparecimento completo dos fogachos em 44% das usuárias de isoflavona, melhora parcial em 36% e nenhuma alteração em 20% das mulheres, evidenciando a potencialidade das isoflavonas.

2.2.7.2 Redução da incidência de doenças cardiovasculares

Segundo Bonduki *et al.* (2001), no estado do hipoestrogenismo é comum a alteração do metabolismo de lipoproteínas e alterações na pressão arterial, aumentando o risco de doenças cardiovasculares como o infarto, aterosclerose e o derrame cerebral. A principal causa dessas enfermidades é a obstrução do fluxo de sangue nos vasos sanguíneos devido à formação de placas de gordura que, à medida que aumentam seu volume, dificultam o fluxo sanguíneo, podendo chegar a obstruí-lo completamente. Um dos principais fatores que contribuem para a ocorrência destas enfermidades é o nível elevado de colesterol no sangue, um dos principais constituintes das placas de ateroma (placas de gorduras formadas nas artérias) (GRUNDY, 1983 *apud* WOLFF *et al.*, 2006).

De modo geral, o colesterol é transportado através da corrente sanguínea pelas lipoproteínas. As lipoproteínas de baixa densidade (LDL) transportam o colesterol para as células dos tecidos extraepáticos (inclusive paredes arteriais). Por sua vez, as lipoproteínas de alta densidade (HDL) transportam o colesterol das artérias para o fígado, onde é metabolizado.

Em 1999, a Food and Drug Administration (FDA) formalizou a atividade funcional de produtos como a proteína de soja. Estimativas revelam que a ingestão diária de 25g de proteína de soja, como parte de uma dieta com baixo teor de gordura saturada e colesterol, pode reduzir os níveis das LDL

em aproximadamente 10%, contribuindo com a redução da incidência de doenças cardiovasculares. Tal característica é relacionada à presença de isoflavonas nos extratos de proteínas de soja (MORAES *et al.*, 2009).

Isoflavonas como a genisteína apresentam comportamento similar ao estradiol, ligando-se aos receptores de estrogênio, e assim contribuindo na regulação do metabolismo das lipoproteínas (POTTER *et al.*, (1998) *apud* ESTEVES e MONTEIRO, 2001).

Bonilla (2004) relata, ainda, que as isoflavonas podem reduzir a incidência de doenças cardiovasculares através da inibição do fator ativador de plaquetas, da inibição da formação de trombina e de sua atividade antioxidante (inibição da formação de radicais livres, peróxido de hidrogênio e ânions superóxidos). Potter *et al.* (1998) *apud* Esteves e Monteiro (2001) complementam tais potencialidades ao afirmar que as isoflavonas poderiam agir bloqueando a proliferação de células musculares lisas nas paredes das artérias.

Estudos sobre a elasticidade dos vasos sanguíneos foram realizados por Nestel *et al.* (1997) *apud* Esteves e Monteiro (2001), onde se pôde observar um significativo aumento da elasticidade em mulheres em menopausa cujo tempo de exposição às isoflavonas foi semelhante às convencionais terapias de reposição hormonal.

Por fim, salienta-se que a literatura se mostra cautelosa quando o consumo de isoflavonas é realizado em uma dieta pobre em gorduras saturadas e em colesterol, pois os benefícios poderiam ser originados por ambas as causas, dificultando a quantificação da influência específica das isoflavonas (HUFF *et al.*, (1977) *apud* ESTEVES e MONTEIRO, 2001).

2.2.7.3 Redução da incidência da osteoporose

A osteoporose é uma enfermidade crônica que ocorre quando a taxa de degradação óssea dos osteoclastos excede à sua formação. É considerada um problema de preocupação mundial e atinge principalmente mulheres em idade pós-menopausa. Estima-se que 33% das mulheres brancas com mais de 65 anos sofram de osteoporose e que as fraturas correspondentes possam levar à perda da independência, invalidez e até à morte (MORAES *et al.*, 2009).

A perda da massa óssea nas mulheres ocorre mais rapidamente nos 10 primeiros anos após o fim dos ciclos menstruais ou da retirada cirúrgica dos ovários. A deficiência hormonal causa um desbalanceamento entre a reabsorção e a formação óssea, acelerando a perda de massa (MORAES *et al.*, 2009).

Segundo estudos epidemiológicos, a incidência de osteoporose pós-menopausa é menor na Ásia quando comparada aos países ocidentais, sendo o consumo de produtos de soja, ricos em isoflavonas, pelas mulheres asiáticas um dos fatores principais (POTTER *et al.*, 1998 *apud* ESTEVES e MONTEIRO, 2001).

Corroborando com os dados supracitados, estudos com animais têm mostrado que extratos enriquecidos com isoflavonas levam ao aumento da massa óssea (ANDERSON *et al.*, 1997 *apud* ESTEVES e MONTEIRO, 2001).

POTTER *et al.* (1998), observou um aumento significativo na densidade óssea em indivíduos tratados por um período de 6 meses com preparações à base de soja enriquecidas com isoflavonas. Outro estudo realizado com 66 mulheres, durante 6 meses, mostrou que uma dieta com 90 mg de isoflavonas aumentou significativamente a densidade mineral óssea da região lombar quando comparada ao grupo controle e ao grupo que consumia 56 gramas de isoflavonas (PIMENTEL *et al.*, 2005).

Um dos possíveis mecanismos de ação das isoflavonas contra a osteoporose sugere que os osteoblastos e os osteoclastos são as células alvo para a ação da genisteína e da daidzeína. Estudos em cultura de células semelhantes a osteoblastos sugerem que a genisteína combina com receptores de estrógenos e auxilia na fixação de cálcio pelo mesmo mecanismo que o hormônio endógeno (ESTEVES e MONTEIRO, 2001).

Ainda assim, segundo MORAES *et al.*, (2009), estudos complementares devem ser realizados para definir de forma conclusiva a necessidade das proteínas de soja junto às isoflavonas na redução da osteoporose.

2.2.8 Legislação

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2011), dado o perfil de uso e indicações terapêuticas, as isoflavonas são consideradas medicamentos, com obrigatoriedade de registro e regulamentadas pela

legislação brasileira de medicamentos fitoterápicos: Resolução RDC nº 48, de 16 de março de 2004, disponibilizada no Anexo 1.

Produtos alimentícios que naturalmente contêm isoflavonas, como os derivados de soja não devem apresentar alegações medicamentosas e/ou terapêuticas que façam alusão à prevenção, tratamento e cura de doenças. Tais alegações só são permitidas após avaliação e aprovação da ANVISA por meio do Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e/ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos, Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999, disponibilizada no Anexo 2.

Além disso, não são permitidas as designações "suplemento alimentar", "suplemento nutricional", "complemento alimentar" ou "complemento nutricional". Como consequência, todos os "suplementos alimentares à base de isoflavonas" comercializados no Brasil não são devidamente regulamentados.

Ainda segundo a ANVISA (2011), as evidências científicas existentes até o momento sobre os efeitos das isoflavonas permitem reconhecer como certo o uso para o alívio das ondas de calor associadas à menopausa ("fogachos") e como meio auxiliar na redução dos níveis de colesterol, desde que prescrito por profissional habilitado, tendo em vista que a quantidade e o período de utilização estão diretamente relacionados com a condição de saúde do indivíduo e as restrições aos grupos populacionais específicos. As demais atividades nutracêuticas (redução da incidência de câncer, osteoporose, reposição hormonal, redução do risco de doenças cardiovasculares, etc.) ainda não apresentam um conjunto de estudos suficiente para justificar sua regulamentação.

3. CONCLUSÕES

A elaboração da revisão bibliográfica permitiu uma visão ampla sobre as características das isoflavonas, bem como sua relação com algumas de suas atividades nutracêuticas e as exigências que a legislação determina.

De forma mais específica, pôde-se perceber que: a) o conhecimento da distribuição quimiotaxonômica permite ao químico empregar variadas fontes de isoflavonas em seus trabalhos; b) a compreensão da biossíntese auxilia o químico a prever esqueletos clássicos quando é necessário caracterizar isoflavonas; c) o conhecimento das propriedades químicas mencionadas é fundamental para entender parte das perdas de isoflavonas durante os processos industriais, o emprego de ácidos nas fases móveis das análises de CLAE e o perfil biossintético voltado às substituições eletrofílicas; d) o emprego frequente de CLAE na quantificação de isoflavonas apresenta características peculiares, que exigem estrutura física e conhecimentos analíticos do químico; e) o entendimento das características de absorção e eliminação de isoflavonas evidencia que seu consumo frequente não é o único fator associado à eficácia das atividades nutracêuticas; f) parte das atividades nutracêuticas está associada à atividade estrogênica das isoflavonas, graças à sua similaridade estrutural; g) o conhecimento da legislação correspondente é fundamental para a rotulação e comércio de produtos alimentícios à base de soja e para os extratos de isoflavonas, estes considerados medicamentos fitoterápicos e h) o conjunto de informações enriqueceu a formação no contexto da Química Bio-orgânica.

Além disso, pôde-se verificar que o conteúdo da presente monografia possibilita futuros trabalhos enfocando características específicas das isoflavonas, tais como o estudo do processamento de mais produtos comerciais à base de soja e/ou das atividades nutracêuticas relacionadas às isoflavonas.

Por fim, é importante ressaltar que o conhecimento descrito contribuiu para a complementação da formação acadêmica clássica, tendo como base o conteúdo de disciplinas como Química Bio-orgânica, Química Orgânica Fundamental, Química Orgânica e Química Analítica Instrumental II.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, J. J. B.; GARNER, S. C. Phytoestrogens and human function. **Nutrition Today**. v. 32, n. 6, p. 232-239, 1997 *apud* ESTEVES, E. A.; MONTEIRO, J. B. R. Efeitos benéficos das isoflavonas de soja em doenças crônicas. **Revista de Nutrição**. v. 14, n.1, p. 43-52, 2001.

ANVISA. **Medicamentos Fitoterápicos – Isoflavonas**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/faqdinamica/index.asp?Secao=Usuario&usersec oes=36&userassunto=136>>. Acesso em: 07 set. 2011.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos**. 5ª ed. Viçosa: Editora da UFV, 2011.

ASOMANING, W. A.; AMOACO, C.; OPPONG, I. V.; PHILLIPS, W. R. et al. Pyrano- and dihydrofurano-isoflavones from *Milletia thonningii*. **Phytochemistry**. v. 39, n. 5, p. 1215-1218, 1995.

ÁVILA, M. R.; BRACCINI, A. L.; SCAPIM, C. A.; MANDARINO, J. M. G.; ALBRECHT, L. P.; VIDIGAL FILHO, P. S. Componentes do rendimento, teores de isoflavonas, proteínas, óleo e qualidade de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**. v. 29, n. 3, p. 111-127, 2007.

BARBOSA, A. C. L.; HASSIMOTTO, N. M. A.; LAJOTO, F. M.; GENOVESE, M. I. Teores de isoflavonas e capacidade antioxidante da soja e produtos derivados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 26, n. 4, 921-926, out.-dez, 2006.

BONDUKI, C. E.; HAIDAR, M. A.; LIMA, G. R. de; BARACAT, E. C. Terapia de reposição hormonal em mulheres na pós-menopausa. **Psiquiatria na Prática Médica. Órgão Oficial do Centro de Estudos -Departamento de Psiquiatria – UNIFESP**. v. 34, n. 1, 2001. Disponível em: <http://www.unifesp.br/dpsiq/polbr/ppm/atu3_05.htm>. Acesso em: 05 jul. 2011.

BONILLA, C. A., Isoflavonas en ginecologia, terapia no convencional. **Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología**, v.55, n. 3, p. 209-217, 2004.

CARRÃO-PANIZZI, M. C.; BELÉIA, A. D. P.; KITAMURA, K.; OLIVEIRA, M. C. N. Effects of genetics and environment on isoflavone content of soybean from different regions of Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 34, n. 10, p. 1787-1795, 1999.

CÉSAR, I. C.; BRAGA, F. C.; VIANNA-SOARES, C. D.; NUNAN, E. A.; BARBOSA, T. A. F.; MOREIRA-CAMPOS, L. M. Determinação de daidzeína, genisteína e gliciteína em cápsulas de isoflavonas por cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 17, n. 4, p. 616-625, 2007.

CIOLA, R. **Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho: HPLC**. 1ª ed. São Paulo: Edgard Blücher, 1998.

COLDITZ, G.A. Relationship between estrogen levels: use of hormone replacement therapy and breast cancer. **Journal of the National Cancer Institute**. v. 90, p. 814-823, 1998 *apud* WOLFF, L. P. G.; MARTINS, M. R.; BEDONE, A. J.; MONTEIRO, I. M. U. Avaliação do endométrio em menopausadas após uso de isoflavonas. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v. 52, n. 6, p. 419-423, 2006.

COOK, N. S.; SAMMAN, S. Flavonoids - chemistry, metabolism, cardioprotective effect and dietary sources. **Journal of Nutritional Biochemistry**. v. 7, n. 2, p. 66-76, 1996 *apud* BARBOSA, A. C. L.; HASSIMOTTO, N. M. A.; LAJOTO, F. M.; GENOVESE, M. I. Capacidade antioxidante de isoflavonas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 26, n. 4, 921-926, 2006.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonóides: potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual da Química**. v. 1, n. 3, p. 241-245, 2009. Disponível em: <http://www.uff.br/RVQ/index.php/rvq/article/view/51/99>. Acesso em: 01/09/2011.

DIXON, R. A.; HARRISON, M. J. Activation, structure, and organization of genes involved in microbial defense in plants. **Advances in Genetics**. v. 28, p. 165-234, 1990 *apud* DORNAS, W. C.; OLIVEIRA, T. T.; RODRIGUES-DAS-DORES, R. G.; SANTOS, A. F.; NAGEM, T. J. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêutica Básica e Aplicada**. v. 28, n. 3, p. 241-249, 2007.

DOERGE, D. R.; CHANG, H. C.; CHURCHWELL, M. I.; HOLDER, C. L. Analysis of Soy Isoflavone Conjugation In Vitro and in Human Blood Using Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. **Drug Metabolism & Disposition**. v. 28, n. 3, p. 298-307, 2000. Disponível em: <<http://dmd.aspetjournals.org/content/28/3/298.full>>. Acesso em: 01 set. 2011.

EMBRAPA. Disponível em: <<http://www.aboissa.com.br/informativos/espec/soya/processosdasoja.pdf>>. Acesso em: 01 set. 2011.

EMPÓRIO GRÃOS DA TERRA. Disponível em: <<http://www.emporiograosdaterra.com.br/Produtos.html>>. Acesso em: 01 set. 2011.

ESTEVES, E. A.; MONTEIRO, J. B. R. **Efeitos benéficos das isoflavonas de soja em doenças crônicas**. Revista de Nutrição. v. 14, n.1, p. 43-52, 2001.

EVANS, W. C. **Trease and Evan's Pharmacognosy**. Toronto: WB Saunders Company Ltd, 1996 *apud* YANO, H. M. **Determinação de isoflavonas em formulações farmacêuticas**. 2006. 154p. Tese (Doutorado em Fármaco e Medicamentos) - Universidade de São Paulo, São Paulo.

FENNEMA, O. R. **Química de los alimentos**. 2ª ed. Zaragoza: Acribia, 1992.

FERREIRA, J. A. S.; WEHBA, S.; FERNANDES, C. E. **Climatério feminino: fisiopatologia, diagnóstico e tratamento**. 1ª ed. São Paulo: Lemos Editorial, 1999 *apud* WOLFF, L. P. G.; MARTINS, M. R.; BEDONE, A. J.; MONTEIRO, I. M. U. Avaliação do endométrio em menopausadas após uso de isoflavonas. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v. 52, n. 6, p. 419-423, 2006.

GENOVESE, M. I.; PINTO, M. S.; BARBOSA, A. C. L.; LAJOLO, F. M. Avaliação do teor de isoflavonas de "suplementos nutricionais à base de soja". **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 39, n. 2, abr./jun., 2006.

GOÉS-FAVONI, S. P. de.; BELÉIA, A. D. P.; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; MANDARINO, J. M. G. Isoflavonas em produtos comerciais de soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 24, n. 4, p. 582-586, 2004.

GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; SÁNCHEZ-CAMPOS, S.; TUÑÓN, M. J. Propiedades antiinflamatorias de los flavonoides de la dieta. **Nutrición Hospitalaria**. v. 22, n. 3, p. 287-293, 2007.

GRUNDY, S. M. Absorption and metabolism of dietary cholesterol. **Annual Review of Nutrition**. v. 3, p. 71-96, 1983 *apud* WOLFF, L. P. G.; MARTINS, M. R.; BEDONE, A. J.; MONTEIRO, I. M. U. Avaliação do endométrio em menopausadas após uso de isoflavonas. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v. 52, n. 6, p. 419-423, 2006.

HAN, K. H.; JÚNIOR, J. M. S.; HAIDAR, M. A.; GIRÃO, M. J. B. C.; NUNES, M. G.; LIMA, J. R. de.; BARACAT, E. C. Efeitos dos Fitoestrogênios sobre Alguns Parâmetros Clínicos e Laboratoriais no Climatério. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**. v. 24, n. 8, p. 547-552, 2002.

HANSEN, D.; HARAGUSHI, M.; ALONSO, A. Pharmaceutical properties of 'sucupira' (*Pterodon ssp.*). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 46, n. 4, Oct/Dec, 2010.

HUFF, M.W.; HAMILTON, R.M.G.; CARROL, K.K. Plasma cholesterol levels in rabbits fed low fat, cholesterol-free, semipurified diets: effects of dietary proteins, protein hydrolysates and amino acid mixtures. **Atherosclerosis, Limerick**. v.28, p.186-195, 1977 *apud* ESTEVES, E. A.; MONTEIRO, J. B. R. Efeitos benéficos das isoflavonas de soja em doenças crônicas. **Revista de Nutrição**. v. 14, n.1, p. 43-52, 2001.

LEE, S. J. et al. Effects of year, site, genotype and their interactions on various soybean isoflavones. **Field Crops Research**. v. 81, n. 2/3, p. 181-192, 2003 *apud* BARBOSA, A. C. L.; HASSIMOTTO, F. M. J.; LAJOTO, F. M.; GENOVESE, M. I. Teores de isoflavonas e capacidade antioxidante da soja e produtos derivados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 26, n. 4, Out./Dec., 2006.

LUI, M. C. Y.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; SCAMPARINI, A. R. P.; PARK, Y. K. Isoflavonas em isolados e concentrados protéicos de soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 23, suppl. 0, p. 206-212, Dec. 2003.

MACHEIX, J. J.; FLEURIT, A.; BILLOT, J. **Fruit Phenolics**. Boca Raton: CRC Press, 1990 *apud* LIMA, V. L. A. G.; PINHEIRO, I. O.; NASCIMENTO, M. S.; GOMES, P. B.; GUERRA, N. B. Identificação de antocianidinas em acerolas do Banco Ativo de Germoplasma da Universidade Federal Rural de Pernambuco. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 26, n. 4, Out/Dez, 2006.

MANN, J. **Secondary metabolism. Oxford Chemistry Series**. 2nd ed. New York: Clarendon Press, 1987.

MARÇO, P. H.; POPPI, R. J.; SCARMINIO, I. S. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. **Química Nova**. v. 31, n. 5, p. 1218-1223, 2008.

MORRISON, R. T.; BOYD, R. N. **Química Orgânica**. 14^a ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2005.

NACHTIGALL, L. Isoflavones in the management of menopause. **Journal of the British Menopause Society**. v. 7, p. 8-12, 2001 *apud* CLAPAUCH, R.; MEIRELLES, R. M. R.; JULIÃO, M. A. S. G.; LOUREIRO, C. K. C.; GIARODOLI, P. B.; PINHEIRO, S. A.; HARRIGAN, A. R.; SPRITZER, P. M.; PARDINI, D. P.; WEISS, R. V.; ATHAYDE, A.; RUSSO, L. A.; PÓVOA, L. C. Fitoestrogênios: posicionamento do Departamento de Endocrinologia Feminina da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM). **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**. v. 46, n. 6, p. 679-695, 2002.

NAHÁS, E. A. P.; NETO, J. H.; LUCA, L. A. de.; TRAIMAN, P.; PONTES, A.; DALBEN, I. Efeitos da isoflavona sobre os sintomas climatéricos e o perfil lipídico na mulher em menopausa. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**. v. 25, n. 5, p. 337-343, 2003.

NAIM, M. *et al.* Antioxidative and antihemolytic activities of soybean isoflavones. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 24, n. 6, p. 1174-1177, 1976 *apud* BARBOSA, A. C. L.; HASSIMOTTO, N. M. A.; LAJOTO, F. M.; GENOVESE, M. I. Capacidade antioxidante de isoflavonas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 26, n. 4, 921-926, 2006.

NAKAMURA *et al.* Determination of the levels of isoflavonoids in soybean and soy derived foods and estimation of isoflavonoids in the japanese daily intake. **Journal of Association of Official Analytical Chemists International**. v. 83, p. 635-650, 2000 *apud* ROSSI, E. A.; ROSIER, I.; DÂMASO, A. R.; CARLOS, I. Z.; VENDRAMINI, R. C.; ABDALLA, D. S. P.; TALARICO, V. H.; MINTO, D. F. Determinação das isoflavonas nas diversas etapas do processamento do iogurte de soja. **Alimentos e Nutrição**. v. 15, n. 2, p. 93-99, 2004.

NETO, A.; RADLER, F. **Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins**. 1^a ed. Rio de Janeiro: Interciências, 2003.

NESTEL, P. J.; YAMASHITA, T.; SASAHARA, T. Soy isoflavones improve systemic arterial compliance but not plasma lipids in menopausal and perimenopausal women. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular**

Biology. v. 17, n. 12, p. 3392-3398, 1997 *apud* ESTEVES, E. A.; MONTEIRO, J. B. R. Efeitos benéficos das isoflavonas de soja em doenças crônicas. **Revista de Nutrição**. v. 14, n.1, p. 43-52, 2001.

NKENGFAK, A. E.; AZEBAZE, A. G. B.; WAFFO, A. K.; FOMUM, Z. T. et al. Cytotoxic isoflavones from *Erythrina indica*. **Phytochemistry**. v. 58, p. 1113-1120, 2001.

NOWAKOWSKA, Z. A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 42, p. 125-137, 2007.

PASCUAL-TERESA, S. de.; HALLUND, J.; TALBOT, D.; SCHROOT, J.; WILLIAMS, C. R.; BUGEL, S.; CASSIDY, A. Absorption of isoflavones in humans: effects of food matrix and processing. **Journal of Nutritional Biochemistry**. v. 17, n. 4, p. 257-264, 2006.

PEREIRA, I. R. O.; DAMASCENO, N. R. T.; PREIRA, E. C.; TAVARES, L. C.; ABDALLA, D. S. P. Avaliação das concentrações plasmática e urinária de isoflavonas purificadas de soja. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 38, n. 3, p. 291-303, 2002.

PIMENTEL, C. V. M. B.; FRANCKI, V. M.; GOLLÜCKE, A. P. B. **Alimentos Funcionais – Introdução às principais substâncias bioativas em alimentos**. São Paulo: Varela, 2005.

POTTER, S.M.; BAUM, J.A.; TENG, H. Soy protein and isoflavones: Their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women. **American Journal of Clinical Nutrition**. v. 68, n. 6, p. 1375-1379, 1998 *apud* ESTEVES, E. A.; MONTEIRO, J. B. R. Efeitos benéficos das isoflavonas de soja em doenças crônicas. **Revista de Nutrição**. v. 14, n.1, p. 43-52, 2001.

ROSSI, E. A.; ROSIER, I.; DÂMASO, A. R.; CARLOS, I. Z.; VENDRAMINI, R. C.; ABDALLA, D. S. P.; TALARICO, V. H.; MINTO, D. F. Determinação das isoflavonas nas diversas etapas do processamento do iogurte de soja. **Alimentos e Nutrição**. v. 15, n. 2, p. 93-99, 2004.

SATO, H.; TAHARA, S.; INGHAM, J. L.; DZIEDZIC, S. Z. Isoflavones from pods of *Laburnum anagyroides*. **Phytochemistry**. v. 39, n. 3, p. 673-676, 1995.

SETCHELL, K. D. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. **American Journal Clinical of Nutrition**. v. 134, n. 6, p. 1333-1343, 1998 *apud* ESTEVES, E. A.; MONTEIRO, J. B. R. Efeitos benéficos das isoflavonas de soja em doenças crônicas. **Revista de Nutrição**. v. 14, n.1, p. 43-52, 2001.

SILVA, S. A. S.; AGRA, M. F.; TAVARES, J. F.; CUNHA, E. V. L.; BARBOSA FILHO, J. M.; SILVA, M. S. Flavanones from aerial parts of *Cordia globosa* (Jacq.) Kunth, Boraginaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 20, n. 5, Out/Nov, 2010. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-95X2010000500005&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 01/09/2011.

XU, X.; HARRIS, K. S.; WANG, H. J.; MURPHY, P. A.; HENDRICH, S. Bioavailability of soybean isoflavones depends upon gut microflora in women. **Journal of Nutrition**. v. 125, n. 9, p. 2307-2315, 1995 *apud* PEREIRA, I. R. O.; DAMASCENO, N. R. T.; PREIRA, E. C.; TAVARES, L. C.; ABDALLA, D. S. P. Avaliação das concentrações plasmática e urinária de isoflavonas purificadas de soja. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 38, n. 3, p. 291-303, 2002.

WANDA, G. J. M. K.; NJAMEN, D.; YANKEP, E.; FOTSING, M. T. *et al.* Estrogenic properties of isoflavones derived from *Millettia griffoniana*. **Phytomedicine**. v. 13, p.139-145, 2006.

WANG, C. C.; PRASAIN, J. K.; BARNES, S. Review of the methods used in the determination of phytoestrogens. **Journal of Chromatography B**. v. 777, n. 1, p. 3-28, 2002 *apud* CÉSAR, I. C.; BRAGA, F. C.; VIANNA-SOARES, C. D.; NUNAN, E. A.; BARBOSA, T. A. F.; MOREIRA-CAMPOS, L. M. Determinação de daidzeína, genisteína e gliciteína em cápsulas de isoflavonas por cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 17, n. 4, p. 616-625, 2007.

WU, Q.; WANG, M.; SIMON, J. E. Determination of isoflavones in red clover and related species by high-performance liquid chromatography combined with ultraviolet and mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**. v. 1016, p. 195-219, 2003.

YENESEW, A.; MIDIWO, J. O.; WATERMAN, P. G. Four isoflavones from seed pods of *Millettia dura*. **Phytochemistry**. v. 41, n. 3, p. 951-955, 1996.

YENESEW, A.; MIDIWO, J. O.; WATERMAN, P. G. Rotenoids, isoflavones and chalcones from the stem bark of *Millettia usaramensis* subspecies *usaramensis*. **Phytochemistry**. v. 47, n. 2, p. 295-300, 1998.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. **Flavonóides**. In: SIMÕES, C. M. O.; CHENKEL, E. P.; GORMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianoópolis: Editora da UFRGS, 2002.

5. ANEXOS

ANEXO 1 – RESOLUÇÃO Nº 48 DE 16 DE MARÇO DE 2004 - ANVISA

Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos.

REGULAMENTO TÉCNICO PARA MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS ABRANGÊNCIA

Este regulamento abrange medicamentos cujos princípios ativos são exclusivamente derivados de drogas vegetais. Não é objeto de registro ou cadastro planta medicinal ou suas partes, após processos de coleta, estabilização e secagem, podendo ser íntegra, rasurada, triturada ou pulverizada.

Definições:

- Droga vegetal - planta medicinal ou suas partes, após processos de coleta, estabilização e secagem, podendo ser íntegra, rasurada, triturada ou pulverizada.
- Derivado de droga vegetal - produtos de extração da matéria prima vegetal: extrato, tintura, óleo, cera, exsudato, suco, e outros.
- Fitoterápico - medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Sua eficácia e segurança é validada através de levantamentos etnofarmacológicos de utilização, documentações tecnocientíficas em publicações ou ensaios clínicos fase 3. Não se considera medicamento fitoterápico aquele que, na sua composição, inclua substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem as associações destas com extratos vegetais.
- Fórmula Fitoterápica - Relação quantitativa de todos os componentes de um medicamento fitoterápico.
- Formula Mestra ou Fórmula Padrão - documento ou grupo de documentos que especificam as matérias-primas e os materiais de embalagem com as suas quantidades, juntamente com a descrição dos procedimentos e precauções necessárias para a produção de determinada quantidade de produto terminado. Além disso, fornece instruções sobre o processamento, inclusive sobre os controles em processo.
- Marcador - componente ou classe de compostos químicos (ex: alcalóides, flavonóides, ácidos graxos, etc.) presente na matéria-prima vegetal, idealmente o próprio princípio ativo, e preferencialmente que tenha correlação com o efeito terapêutico, que é utilizado como referência no controle de qualidade da matéria-prima vegetal e dos medicamentos fitoterápicos.
- Matéria prima vegetal - planta medicinal fresca, droga vegetal ou derivado de droga vegetal.
- Medicamento - produto farmacêutico, tecnicamente obtido ou elaborado, com finalidade profilática, curativa, paliativa ou para fins de diagnósticos;
- Princípio ativo de medicamento fitoterápico - substância, ou classes químicas (ex: alcalóides, flavonóides, ácidos graxos, etc.), quimicamente

caracterizada, cuja ação farmacológica é conhecida e responsável, total ou parcialmente, pelos efeitos terapêuticos do medicamento fitoterápico.

Capítulo I - Medidas Antecedentes ao Registro de Fitoterápicos

1. Notificar a produção de lotes-piloto de acordo com o GUIA PARA A NOTIFICAÇÃO DE LOTES PILOTO DE MEDICAMENTOS, exceto para produtos importados.

Capítulo II - Do Registro

2. No ato do protocolo de pedido de registro o proponente deverá apresentar relatório contendo as seguintes informações técnicas;

a) Dados gerais:

A1. Bula, modelo de rótulo e embalagem, conforme a legislação vigente. A bula deve informar a parte utilizada da planta, a composição do medicamento, indicando a relação real, em peso ou volume, da matéria prima vegetal usada e a correspondência em marcadores e/ ou princípios ativos, quando conhecidos.

A2. Descrição do derivado desde que figure logo após ou abaixo da nomenclatura botânica (facultativo).

b) Prazo de validade: apresentar resultados do estudo de estabilidade acelerada de três lotes-piloto utilizados nos testes, acompanhados dos estudos de estabilidade de longa duração em andamento, ou estudos de estabilidade de longa duração já concluídos, todos de acordo com o GUIA PARA A REALIZAÇÃO DE ESTUDOS DE ESTABILIDADE DE MEDICAMENTOS;

c) Relatório completo de produção:

C1. Forma farmacêutica, descrição detalhada da fórmula completa com a nomenclatura botânica oficial completa (gênero, espécie, variedade, autor do binômio, família), mais os excipientes conforme a Denominação Comum Brasileira (DCB), Denominação Comum Internacional (DCI), ou a denominação citada no Chemical Abstract Service (CAS), respeitando esta ordem de prioridade;

C2. Descrição da quantidade de cada substância expressa no sistema internacional de unidades (SI) ou unidade padrão indicando sua função na fórmula;

C3. Tamanhos mínimos e máximos dos lotes industriais a serem produzidos;

C4. Descrição de todas as etapas do processo de produção contemplando os equipamentos utilizados;

C5. Metodologia de controle do processo produtivo;

C6. Descrição dos critérios de identificação do lote industrial.

d) Relatório de controle de qualidade:

D1) Informações referentes a droga vegetal:

d1.1. Relatório descritivo dos métodos de secagem, estabilização (quando empregada), e conservação utilizados, com seus devidos controles, quando cabível.

d1.2. Laudo de identificação próprio ou emitido por profissional habilitado, quando não existirem especificações farmacognósticas que permitam a confirmação da identidade botânica.

d1.3. Referência bibliográfica da Farmacopéia consultada e reconhecida pela ANVISA, de acordo com a legislação vigente. No caso de não se tratarem de compêndios oficiais reconhecidos pela ANVISA, descrição detalhada de todas as metodologias utilizadas no controle de qualidade, com métodos analíticos devidamente validados somente para matéria-prima ativa(s) vegetal(s) de acordo com o GUIA DE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E BIOANALÍTICOS, indicando a fonte bibliográfica ou de desenvolvimento. Neste último caso apresentar tradução quando o idioma não for inglês ou espanhol.

D2) Informações referentes ao derivado de droga vegetal:

d2.1. Nomenclatura botânica oficial, a nomenclatura farmacopeica e/ou tradicional,

d2.2. Parte da planta utilizada,

d2.3. Solventes, excipientes e/ou veículos utilizados na extração do derivado. Estas informações devem vir acompanhadas do laudo de análise do fornecedor.

d2.4. Testes de autenticidade (caracterização organoléptica, identificação macroscópica e microscópica);

d2.5. Testes de pureza e integridade, incluindo: cinzas, cinzas insolúveis em ácido clorídrico, umidade, pesquisa de matérias estranhas, pesquisa de contaminantes microbiológicos e de metais pesados. Em caso de utilização de métodos para eliminação de contaminantes, descrever o método e a pesquisa de eventuais alterações da matériaprima.

d2.6. Análise qualitativa e quantitativa dos princípios ativos e/ou marcadores, quando conhecidos, ou classes de compostos químicos característicos da espécie.

e) Controle de qualidade do produto acabado:

E1. Apresentar a descrição detalhada de todas as metodologias utilizadas no controle de qualidade, com os métodos analíticos devidamente validados para o medicamento, de acordo com o GUIA PARA VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E BIOANALÍTICOS, indicando a sua fonte bibliográfica ou de desenvolvimento.

E2. Resultado da prospecção (Screening) fitoquímica, ou perfil cromatográfico (Fingerprint) por cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE ou cromatografia gasosa - CG, quando cabível. Apresentar tradução quando o idioma não for inglês ou espanhol;

f) Especificações do material de embalagem primária.

g) Certificado de Boas Práticas de Fabricação e Controle (BPFC) emitido pela ANVISA, para a linha de produção na qual o produto classificado como medicamento fitoterápico será fabricado, ou ainda, cópia do protocolo de solicitação de inspeção para fins de emissão do certificado de BPFC. Este protocolo será válido desde que a linha de produção pretendida esteja satisfatória na última inspeção para fins de verificação do cumprimento de BPFC realizada.

5. A ANVISA poderá, a qualquer momento e a seu critério, exigir provas adicionais relativas à identidade e qualidade dos componentes, e da segurança e da eficácia de um medicamento, caso ocorram dúvidas ou ocorrências que dêem ensejo a avaliações complementares, mesmo após a concessão do registro.

h) Todo o material apresentado relativo ao produto, tais como os relatórios de produção e controle de qualidade, e as informações contidas em rótulos, bulas e embalagens, devem estar em idioma português, atendendo à legislação em vigor. Os documentos oficiais em idioma estrangeiro, usados para fins de registro, expedidos pelas autoridades sanitárias, deverão ser acompanhados de tradução juramentada na forma da lei.

8. A segurança de uso e a(s) indicação(ões) terapêutica(s) deverão ser validadas através de uma das três opções abaixo:

Capítulo III - DAS MEDIDAS DO PÓS - REGISTRO

1. As alterações de registro devem seguir os procedimentos especificados na GUIA PARA REALIZAÇÃO DE ALTERAÇÕES E INCLUSÕES PÓS-REGISTRO DE MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS.

2. A ANVISA poderá realizar análise de controle, em lotes comercializados, para fins de monitoração da qualidade e conformidade do medicamento com o registrado, em laboratórios oficiais.

3. Decorrido o prazo de validade declarado para o medicamento, a empresa deverá protocolar, na forma de complementação de informações ao processo, relatório de resultados e avaliação final do estudo de estabilidade de longa duração dos três lotes apresentados na submissão, de acordo com o cronograma previamente apresentado, assim como a declaração do prazo de validade e cuidados de conservação definitivos. A falta deste encaminhamento implicará em infração sanitária.

4. Todas as empresas, no primeiro semestre do ultimo ano do quinquênio de validade do registro já concedido, deverão

apresentar à ANVISA, os seguintes documentos para efeito de renovação:

a) Formulário de petição devidamente preenchido;

b) Via original do comprovante de recolhimento da taxa de fiscalização de vigilância sanitária ou de isenção, quando for o caso;

c) Certificado de Responsabilidade Técnica, atualizado, emitido pelo Conselho Regional de Farmácia.

d) Apresentar cópia de notas fiscais comprovando a comercialização do medicamento em um máximo de 3 (três) notas por forma farmacêutica. Poderá ser apresentada uma declaração referente às apresentações comerciais não comercializadas para as quais a empresa tenha interesse em manter o registro, desde que pelo menos uma apresentação daquela forma farmacêutica tenha sido comercializada. Os Laboratórios Oficiais, quando não houver a produção do medicamento no referido período, deverão apresentar a justificativa da não comercialização.

e) Certificado de Boas Práticas de Fabricação e Controle (BPFC) emitido pela ANVISA, para a linha de produção na qual o produto classificado como medicamento fitoterápico será fabricado, ou ainda, cópia do protocolo de solicitação de inspeção para fins de emissão do certificado de BPFC. Este

protocolo será válido desde que a linha de produção pretendida esteja satisfatória na última inspeção para fins de verificação do cumprimento de BPFC realizada.

f) Apresentar comprovante de um sistema de farmacovigilância na empresa para monitorização de falhas terapêuticas e efeitos colaterais indesejáveis, de acordo com legislação específica.

g) A última versão de bula impressa que acompanha o produto em suas embalagens comerciais.

h) Apresentar listagem que contemple todas as alterações e/ou inclusões pós-registro ocorridas durante o último período de validade do registro do produto, acompanhados de cópia do D.O.U., ou na ausência, cópia do(s) protocolo(s) da(s) petição(ões) correspondente(s).

i) Para produtos importados apresentar os respectivos laudos de três lotes importados nos últimos três anos do controle de qualidade físico-químico, químico, microbiológico e biológico, de acordo com a forma farmacêutica, realizado pelo importador no Brasil.

ANEXO 2 – RESOLUÇÃO Nº 18 DE 30 DE ABRIL DE 1999 - ANVISA

Art. 1º Aprovar o REGULAMENTO TÉCNICO QUE ESTABELECE AS DIRETRIZES BÁSICAS PARA ANÁLISE E COMPROVAÇÃO DE PROPRIEDADES FUNCIONAIS E OU DE SAÚDE ALEGADAS EM ROTULAGEM DE ALIMENTOS, constante do anexo desta Portaria.

Art. 2º O descumprimento aos termos desta Portaria constitui infração sanitária sujeita aos dispositivos da Lei nº 6.437, de 20 de agosto de 1977, e demais disposições aplicáveis.

Art. 3º Esta Portaria entra em vigor na data de sua publicação, revogando-se as disposições em contrário.

REGULAMENTO TÉCNICO QUE ESTABELECE AS DIRETRIZES BÁSICAS PARA ANÁLISE E COMPROVAÇÃO DE PROPRIEDADES FUNCIONAIS E OU DE SAÚDE ALEGADAS EM ROTULAGEM DE ALIMENTOS

1. ÂMBITO DE APLICAÇÃO.

O presente regulamento se aplica às alegações de propriedades funcionais e ou de saúde de alimentos e ingredientes para consumo humano, veiculadas nos rótulos de produtos elaborados, embalados e comercializados prontos para a oferta ao consumidor.

Este regulamento se aplica sem prejuízo das demais disposições das legislações de rotulagem de alimentos.

2. DEFINIÇÃO.

Para efeito deste regulamento, considera-se:

2.1. ALEGAÇÃO DE PROPRIEDADE FUNCIONAL: é aquela relativa ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano.

2.2. ALEGAÇÃO DE PROPRIEDADE DE SAÚDE: é aquela que afirma, sugere ou implica a existência de relação entre o alimento ou ingrediente com doença ou condição relacionada à saúde.

3. DIRETRIZES PARA UTILIZAÇÃO DA ALEGAÇÃO DE PROPRIEDADES FUNCIONAIS E OU DE SAÚDE.

3.1. A alegação de propriedades funcionais e ou de saúde é permitida em caráter opcional.

3.2. O alimento ou ingrediente que alegar propriedades funcionais ou de saúde pode, além de funções nutricionais básicas, quando se tratar de nutriente, produzir efeitos metabólicos e ou fisiológicos e ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica.

3.3. São permitidas alegações de função e ou conteúdo para nutrientes e não nutrientes, podendo ser aceitas aquelas que descrevem o papel fisiológico do nutriente ou não nutriente no crescimento, desenvolvimento e funções normais do organismo, mediante demonstração da eficácia. Para os nutrientes com funções plenamente reconhecidas pela comunidade científica

não será necessária a demonstração de eficácia ou análise da mesma para alegação funcional na rotulagem.

3.4. No caso de uma nova propriedade funcional, há necessidade de comprovação científica da alegação de propriedades funcionais e ou de saúde e da segurança de uso, segundo as Diretrizes Básicas para Avaliação de Risco e Segurança dos Alimentos.

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

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

3.1. FAO/WHO, Codex Alimentarius, CAC/GL 23-1997, Guidelines for the Use of Nutrition Claims.

3.2. FAO/WHO Codex Alimentarius, ALINORM 97/22, Appendix II.

3.3. FAO/WHO Codex Alimentarius, ALINORM 99/22, Appendix X.

4. COMPROVAÇÃO DA ALEGAÇÃO DE PROPRIEDADES FUNCIONAIS OU DE SAÚDE.

4.1. A comprovação da alegação de propriedades funcionais e ou de saúde de alimentos e ou de ingredientes, deve ser conduzida com base em:

consumo previsto ou recomendado pelo fabricante;

finalidade, condições de uso e valor nutricional, quando for o caso;

evidência(s) científica(s) descrita(s) no item 4.2..

4.2. Evidências científicas aplicáveis, conforme o caso, à comprovação da alegação de propriedade funcional e ou de saúde:

composição química com caracterização molecular, quando for o caso, e ou formulação do produto; ensaios bioquímicos; ensaios nutricionais e ou fisiológicos e ou toxicológicos em animais de experimentação; estudos epidemiológicos; ensaios clínicos; evidências abrangentes da literatura científica, organismos internacionais de saúde e legislação internacionalmente reconhecida sobre as propriedades e características do produto; comprovação de uso tradicional, observado na população, sem associação de danos à saúde.

4.3. Informações documentadas sobre aprovação de uso do alimento ou ingrediente em outros países, blocos econômicos, Codex Alimentarius e outros organismos internacionalmente reconhecidos.

5. DISPOSIÇÕES GERAIS.

Embora já se conheçam metodologias de avaliação de risco para comprovar a segurança de alimentos e ingredientes, podem ocorrer situações não previstas. Desta forma, a avaliação das alegações de propriedade funcional e ou de saúde deve ser gerenciada, caso a caso, por uma Comissão de Assessoramento Técnico-científica em Alimentos Funcionais e novos Alimentos instituída por portaria específica, com base em conhecimentos científicos atuais, levando-se em conta a natureza do material sob exame.