



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

HELOISA GABRIEL FALCÃO

**PRÉ-TRATAMENTO COM ULTRASSOM NA MACERAÇÃO
DA SOJA E OTIMIZAÇÃO MULTI-RESPOSTA DO TEOR DE
ISOFLAVONAS E COMPOSTOS FENÓLICOS E AVALIAÇÃO
DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E ATIVIDADE ANTI-
INFLAMATÓRIA**

HELOISA GABRIEL FALCÃO

**PRÉ-TRATAMENTO COM ULTRASSOM NA MACERAÇÃO
DA SOJA E OTIMIZAÇÃO MULTI-RESPOSTA DO TEOR DE
ISOFLAVONAS E COMPOSTOS FENÓLICOS E AVALIAÇÃO
DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E ATIVIDADE ANTI-
INFLAMATÓRIA**

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

Orientadora: Profa. Dra. Elza Iouko Ida

Co-orientadora: Dra. Louise Emy Kurozawa

Colaborador: Dr. Adriano Costa de Camargo

Londrina
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Falcão, Heloisa Gabriel.

PRÉ-TRATAMENTO COM ULTRASSOM NA MACERAÇÃO DA SOJA E OTIMIZAÇÃO MULTI-RESPOSTA DO TEOR DE ISOFLAVONAS E COMPOSTOS FENÓLICOS E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA / Heloisa Gabriel Falcão. - Londrina, 2019.
114 f. : il.

Orientador: Elza louko Ida.

Coorientador: Louise Emy Kurozawa.

Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2019.
Inclui bibliografia.

1. Atividade anti-inflamatória - Tese. 2. Beta-glicosidase - Tese. 3. Capacidade antioxidante - Tese. 4. Compostos Fenólicos - Tese. I. Ida, Elza louko. II. Kurozawa, Louise Emy. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. IV. Título.

HELOISA GABRIEL FALCÃO

**PRÉ-TRATAMENTO COM ULTRASSOM NA MACERAÇÃO DA SOJA
E OTIMIZAÇÃO MULTI-RESPOSTA DO TEOR DE ISOFLAVONAS E
COMPOSTOS FENÓLICOS E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE
ANTIOXIDANTE E ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA**

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

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Elza Iouko Ida
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Neusa Fátima Seibel
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR

Prof. Dr. Sandra Regina Georgetti
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dra. Mara Lucia Luiz Ribeiro
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dra. Sandra Helena Prudêncio
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 29 de março de 2019.

Dedico

À Deus,

*por ter aberto as portas e me sustentado
todos os dias.*

Aos meus familiares,

*pelo apoio, incentivo e por acreditarem em
mim e nos meus sonhos de concluir esta
etapa decisiva da minha vida.*

*Em especial ao meu filho João Vitor
Falcão Santos.*

AGRADECIMENTOS

À Prof^ª. Dr^ª. Elza Iouko Ida, pela orientação, compreensão, paciência, incentivo e ensinamentos. Exemplo de profissionalismo e comprometimento na formação dos seus orientandos.

À Prof^ª. Dr^ª. Louise Emy Kurozawa, pela co-orientação, conselhos e conhecimentos compartilhados. Exemplo de comprometimento profissional.

Ao Dr. Adriano Costa de Camargo, pela colaboração, valiosas contribuições e ponderações no desenvolvimento da pesquisa e da Tese.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/MEC) pela concessão de bolsa de estudo do Doutorado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos (DCTA) do Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Estadual de Londrina (UEL) pela oportunidade de realizar o Doutorado.

A todos os Professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos pelos ensinamentos.

Aos Técnicos Administrativos Alessandra Belitardo, Sandra Rezende e Patrícia Sambatti do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos pela atenção e apoio durante o desenvolvimento da Tese.

Aos Pós-Doutores Daniele Rodrigues, Denise da Fontoura Prates e Rafael Humberto de Carvalho e colegas Bruna Caroline Gerônimo, Cíntia Ladeira Handa, Marcela Fernanda Geton Guelfi e Mariah Benine Ramos Silva e integrantes do grupo de pesquisa denominado de Moléculas Alimentares coordenada pela orientadora, pela amizade e trabalho em equipe, convivência e companheirismo.

Aos colegas Ariana Justus, Rodolfo Campos Zanin e em especial, Bruna Yumi Yoshida do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, pela boa convivência, descontrações, força e discussões construtivas.

E a todos aqueles que acreditaram em mim e colaboraram por esta conquista.

Se enxerguei longe é porque me apoiei em ombros de gigantes (Isaac Newton).

FALCÃO, Heloisa Gabriel. **Pré-tratamento com ultrassom na maceração da soja e otimização multi-resposta do teor de isoflavonas e compostos fenólicos e avaliação da capacidade antioxidante e atividade anti-inflamatória.** 2019. 114 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

O ultrassom pode ser aplicado na maceração da soja para conversão de isoflavonas conjugadas em suas correspondentes agliconas que são amplamente investigadas devido a sua atividade biológica e efeitos benéficos à saúde humana. A maceração da soja é uma etapa muito importante para os processadores na elaboração de vários produtos. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do pré-tratamento com ultrassom na maceração da soja e otimizar as multi-respostas da atividade de β -glicosidases, conversão de isoflavonas em agliconas, teor de compostos fenólicos totais, e avaliação das propriedades físicas e da capacidade antioxidante e atividade anti-inflamatória. O pré-tratamento com ultrassom na maceração da soja sob diferentes condições apresentou diferentes efeitos linear, quadrático e de interação sobre a atividade de β -glicosidases, teor de daidzina, malonildaidzina, daidzeína, genistina, genisteína, glycitina e malonilglycitina. A temperatura e intensidade de ultrassom foram significativos no aumento do teor das isoflavonas agliconas (daidzeína e genisteína) enquanto que a intensidade de ultrassom influenciou na redução do teor das isoflavonas β -glicosídicas (daidzina e genistina). A otimização multi-resposta das condições do pré-tratamento da soja possibilitou obter soja macerada com alto conteúdo de isoflavonas na forma de agliconas. A soja macerada e otimizada demonstrou ser uma matéria-prima promissora devido ao seu menor tempo de maceração (2 h) e baixa intensidade de ultrassom na obtenção de soja com maior teor de umidade, menor dureza e teor significativo de isoflavonas na forma aglicona. Ainda, as condições do pré-tratamento com ultrassom (55°C, 15 min e 24 W/cm²) na maceração da soja aumentou o teor total de isoflavonas agliconas e compostos fenólicos e, conseqüentemente apresentou maior atividade de sequestro de radicais livres (DPPH e ABTS) e atividade anti-inflamatória pelo ensaio de ativação NF- κ B. O pré-tratamento com ultrassom na maceração da soja demonstrou ser uma tecnologia com grande potencial para obter grãos com elevado teor de compostos bioativos e com reduzido tempo de maceração e podem ser empregados como um ingrediente funcional na indústria de alimentos.

Palavras chave: Atividade anti-inflamatória. β -glicosidase. Capacidade antioxidante. Compostos fenólicos. Isoflavonas. Propriedades físicas.

FALCÃO, Heloisa Gabriel. **Ultrasound pretreatment in soybean maceration and multi-response optimization of the isoflavone content and phenolic compounds and evaluation of antioxidant capacity and anti-inflammatory activity.** 2019. 114 p. Thesis (Doctor's Degree in Food Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

Ultrasound can be applied in soybean soaking to convert conjugated isoflavones to their corresponding aglycones, which are widely investigated because of their biological activity and beneficial effects on human health. Soybean soaking is a very important step processor in the preparation of several products. The aim of this work was to evaluate the effects of pre-treatment with ultrasound on soybean maceration and multi-response optimization of the activity of β -glycosidases, conversion of isoflavones to aglycones, content of total phenolic compounds, and evaluation of the physical properties and of the antioxidant capacity and anti-inflammatory activity. The pre-treatment with ultrasound on soybean maceration under different conditions presented different linear, quadratic and interaction effects on the activity of β -glycosidases, daidzin, malonyl daidzin, daidzein, genistin, genistein, glycitin, and malonyl glycitin. Ultrasound intensity and temperature were significant in increasing the content of the aglycone isoflavones (daidzein and genistein) while the ultrasound intensity influenced the reduction of the content of the β -glycosidic isoflavones (daidzin and genistin). The multi-response optimization of the pre-treatment with ultrasound on soybean maceration allowed to obtain soaked soybean with the high content of isoflavones in the aglycones form. Macerated and optimized soybean was a promising raw material due to its lower soaking time (2 h) and low ultrasound intensity in obtaining soybean with higher moisture content, lower hardness and significant content of aglycone isoflavones form. Also, the pre-treatment with ultrasound (55°C, 15 min, and 24 W/cm²) prior to soybean maceration increased the total content of isoflavones aglycones and phenolic compounds and accordingly, presented the higher activity of free radical scavenging (ABTS and DPPH) and anti-inflammatory activity (NF- κ B Activation Assay). Ultrasound pretreatment in maceration of soybean has been shown to be a technology with great potential to obtain grains with high content of bioactive compounds and with short maceration time and can be used as a functional ingredient in the food industry.

Keywords: Anti-inflammatory activity. β -glucosidase. Antioxidant capacity. Phenolic compounds. Isoflavones. Physical properties.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Componentes da estrutura interna e externa do grão de soja	17
Figura 2 - Rotas de degradação das isoflavonas no processamento da soja e seus derivados	25
Figura 3 - Transformação de isoflavonas glicosídicas em agliconas pela ação das enzimas β -glicosídes.....	37
Figura 4 - Fenômeno de cavitação formado pela variação de pressão no interior de um líquido	39
Figura 5 – Aplicação do ultrassom e formação da cavitação estável e transitória	40

ARTIGO CIENTÍFICO 1

Fig. 1	Responses Surface plotting as a function of temperature (X1), time (X2), and ultrasound intensity (X3) of ultrasound soybeans pre-treatment: (a) β -GLU is β -glucosidase activity; (b) DAI is daidzin; (c) ADAI is daidzein; (d) MDAI is malonyldaidzin; (e) GLY is glycitin; (f) MGLY is malonylglycitin; (g) GEN is genistin; and (h) AGEN is genistein. UI stands for ultrasound intensity	81
Fig. 2 -	Desirability parameters estimated for the maximum values of β -glucosidase activity (β -glu), and maximum concentrations of daidzein (ADAI) and genistein (AGEN). X1 is the temperature ($^{\circ}$ C); x2 is the time (min), and x3 is the ultrasound intensity (W.cm-2)	82
Fig. 3	Physical (a) and chemical (b,c,d) changes during soaking time of soybeans pre-treated with ultrasound under optimized conditions	83

ARTIGO CIENTÍFICO 2

Fig. 1 –	Responses Surface plotting as a function of temperature (X1), and ultrasound intensity (X3) from ultrasound soybeans pre-treatment: (a) Total aglycone content (TAC) = daidzein + genistein; and (b) TPC is total phenolic content . (c) Profile for predicted values and desirability in the condition of maximum responses for TAC [μ mol of TAC/gram of sample on a dry weight basis]; and (d) TPC [mg of gallic acid equivalents/gram of sample on a dry weight basis]	109
-----------------	---	-----

- Fig. 2 –** Cell viability by MTT assay of macrophages with the samples at different concentrations or vehicle (veh) for 24 h (37 °C, 5% of CO₂). The data were expressed as the mean (n = 3) ± SD. Letters different indicate statistical difference ($p < 0.05$, Tukey's test)110
- Fig. 3 –** NF-κB activation assay in macrophages pre-treated with the samples at the concentration of 100 µg/ mL or vehicle (veh), 30 min prior to stimulation with LPS (10 ng/mL). Letters different indicate statistical difference ($p < 0.05$, Tukey's test)111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Componentes do grão de soja e sua composição química*	18
Tabela 2 - Estrutura química das diferentes formas de isoflavonas da soja	21
Tabela 3 – Teor e perfil de isoflavonas de cultivares de soja (<i>Glycine max</i> (L.) Merr.) de diferentes origens	22
Tabela 4 – Efeitos positivos e atividades biológicas de isoflavonas e compostos fenólicos da soja relatadas por ensaios <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	27
Tabela 5 - Métodos cromatográficos para a identificação e quantificação de isoflavonas na soja	31

ARTIGO CIENTÍFICO 1

Table 1 - Box Behnken Design (BBD) with coded (x) and uncoded (X) independent variables used for the ultrasound soybeans pre-treatment and their response functions	84
Table 2 – Regression coefficients and analysis of variance (ANOVA) of the mathematical models	85
Table 3 – Validation of the proposed models under optimized conditions	86

ARTIGO CIENTÍFICO 2

Table 1 - Box Behnken design with coded (x) and uncoded (X) independent variables used for the ultrasound pre-treatment of soybeans and their response functions	106
Table 2 - Estimated coefficients and the analysis of variance for response functions of total aglycone contents (TAC) and total phenolic contents (TPC)	107
Table 3 - Isoflavone contents ($\mu\text{mol/g DW}$) and antiradical activity ($\mu\text{mol TE/g}$ DW) as affected by ultrasound soybean pre-treatment in maceration	108

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
2.	OBJETIVOS	15
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1.	ASPECTOS GERAIS E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA SOJA E SEUS COMPONENTES	16
3.2.	COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E ISOFLAVONAS DA SOJA	19
3.2.1.	Compostos fenólicos totais e isoflavonas: benefícios a saúde	25
3.2.2.	Aspectos gerais sobre a determinação do teor de isoflavonas da soja	29
3.3.	MACERAÇÃO DOS GRÃOS DE SOJA E EFEITOS SOBRE A CONVERSÃO DE ISOFLAVONAS AGLICONAS, ATIVIDADE DE ENZIMAS B-GLUCOSIDASES, ABSORÇÃO DE ÁGUA E DUREZA DOS GRÃOS	33
3.4.	ULTRASSOM	37
3.4.1.	Efeitos do ultrassom sobre as atividades de enzimas	41
3.4.2.	Efeitos do ultrassom sobre os compostos fenólicos e isoflavonas	43
	REFERÊNCIAS	46
4.	MATERIAL E MÉTODOS	54
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1.	ARTIGO CIENTÍFICO 1	56
5.2.	ARTIGO CIENTÍFICO 2	87
6.	CONCLUSÕES	112
	ANEXO 1 – AUTORIZAÇÃO DA EDITORA ELSEVIER PARA INCLUIR NA TESE A VERSÃO IMPRESSA DO ARTIGO INTITULADO —SOYBEAN ULTRASOUND PRE- TREATMENT PRIOR TO SOAKING AFFECTS B-GLUCOSIDASE ACTIVITY, ISOFLAVONE PROFILE AND SOAKING TIME 	113
	ANEXO 2 – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO INTITULADO —ULTRASOUND SOYBEAN PRE-TREATMENT IN MACERATION INCREASES THE CONTENT OF ISOFLAVONES AS AGLYCONES, TOTAL PHENOLICS, ANTIOXIDANT POTENTIAL AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITIES 	114

1. INTRODUÇÃO

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é considerada a principal cultura do setor agrícola brasileiro e embora a produção nacional tenha aumentado anualmente, chegando a 117 milhões de toneladas na safra 2017/2018, apenas 50,4% da produção foi destinada ao consumo interno (EMBRAPA, 2018). Apesar de ser mundialmente comercializada pelo seu elevado teor de proteínas (aprox. 40 %) e lipídios (aprox. 20 %) (MESSINA, 2016), o consumo desta leguminosa e o interesse pelos pesquisadores vem aumentando devido aos benefícios associados a compostos biologicamente ativos presentes, como os compostos fenólicos.

Os compostos fenólicos constituem um vasto grupo de polifenóis, que são amplamente encontrados em vegetais (PEREZ-VIZCAINO; DUARTE, 2010). Nas plantas são responsáveis pela proteção contra a luz do sol, pela absorção de comprimentos de onda prejudiciais de alta energia e seus possíveis efeitos tóxicos e também contra predadores externos (SHAHIDI; YEO, 2016). As atividades antioxidante (SHAHIDI; YEO, 2016; ZHANG; TSAO, 2016a) e anti-inflamatória, bem como outras funções biológicas dos compostos fenólicos, são atribuídas às suas características aromáticas conjugadas com vários grupos hidroxila, tornando esses compostos bons doadores de átomos de hidrogênio ou elétrons, que neutralizam os radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio (ROS) (ZHANG; TSAO, 2016a). O consumo da soja está associado a redução dos sintomas da menopausa e osteoporose (VILLARES et al., 2011), inibição do crescimento de células cancerígenas (Benvenuto et al., 2016; Yang et al., 2018) e do aparecimento de doenças cardiovasculares, como hipertensão e aterosclerose (SITI; KAMISAH; KAMSIAH, 2015) proporcionando efeitos benéficos à saúde humana.

Nos vegetais, os compostos fenólicos estão presentes principalmente nas formas glicosídeos conjugados em vez de agliconas (ZHANG; TSAO, 2016a). Na soja as isoflavonas são encontradas como os principais compostos fenólicos. As isoflavonas da soja são divididas em quatro grupos principais, totalizando doze diferentes formas químicas, como: as isoflavonas conjugadas, β -glicosídeos (daidzina, glicitina e genistina), acetilglicosídeos (acetildaidzina, acetilglicitina e acetilgenistina) e malonilglicosídeos (malonildaidzina, malonilglicitina e malonilgenistina) e as isoflavonas agliconas (daidzeína, gliciteína e genisteína) (LIU, 1997).

O teor e o perfil das isoflavonas na soja pode variar e depende de fatores genéticos e de ambientes (SZYMCZAK et al., 2017) e diferentes condições de processamentos como, o tratamento hidrotérmico e pré-tratamento com ultrassom (FALCÃO et al., 2018; LIMA; KUROZAWA; IDA, 2014). Na soja *in natura*, as isoflavonas do grupo malonil glicosídeos representam entre 70 e 90% do total de isoflavonas presentes nos grãos e as isoflavonas β -glicosídeos entre 10 e 26%. As isoflavonas agliconas são encontradas em quantidades inferior e entre 1 a 7% , enquanto que as isoflavonas do grupo acetil glicosídeos estão ausentes ou presentes em baixa concentração (LIMA; IDA, 2014; PAUCAR-MENACHO et al., 2010; QUINHONE JÚNIOR; IDA, 2015).

As isoflavonas agliconas possuem maior atividade biológica, quando comparadas com as suas formas conjugadas (LARKIN; PRICE; ASTHEIMER, 2008), tais como, capacidade antioxidante e atividade anti-inflamatória, propriedades estrógenas (AGUIAR et al., 2003), prevenção de doenças cardiovasculares (KRISHNAN et al., 2018) e de câncer de mama pós-menopausa (WADA et al., 2013). Em sua maioria, as isoflavonas da soja estão na forma conjugada e sua atividade biológica depende de sua estrutura química. Desta forma, uma hidrólise inicial das moléculas glicosiladas é necessária para que ocorra a sua biodisponibilidade e sejam obtidas as formas agliconas (ZHANG; TSAO, 2016).

As atividades de β -glicosidases endógenas tem sido relacionadas com a hidrólise de isoflavonas glicosídicas conjugadas e liberação de isoflavonas agliconas e glicose. A hidrólise favorece a biodisponibilidade das isoflavonas e permite que sejam transportadas pela circulação sanguínea devido ao seu menor peso molecular (MAITAN-ALFENAS et al., 2014). Desta forma, há um crescente interesse no preparo de produtos de soja com elevado teor de isoflavonas agliconas (FALCÃO et al., 2018; FERNANDES et al., 2017; HANDA et al., 2014; QUINHONE JÚNIOR; IDA, 2015) e ressalta-se a importância de desenvolver métodos eficazes para a sua conversão.

O ultrassom é uma tecnologia que tem sido aplicada para melhorar a produtividade de processos químicos, físicos e biotecnológicos (SZABÓ; CSISZÁR, 2013). A propagação das ondas ultrassônicas produz o fenômeno denominado de cavitação, que consiste na formação, crescimento e colapso de bolhas de gás ou vapor devido às variações de pressão (NIPORNRAM; TOCHAMPA; RATTANATRAIWONG, 2018). A cavitação resulta em maior movimento das moléculas com maior penetração de solvente no material (HE et al., 2016). Assim, a sua

aplicação tem sido realizada para aumentar a solubilidade de proteínas, ativação/inativação de enzimas, extração de compostos fenólicos, taxa de germinação da soja e conversão de isoflavonas em agliconas (NIPORNRAM ET AL., 2018; YANG, GAO, YANG, & CHEN, 2015; YU, ZENG, ZHANG, LIAO, & SHI, 2014; JAMBRAK, LELAS, MASON, KREŠIĆ, & BADANJAK, 2009).

Portanto, considerando que a maceração é um dos processos mais importantes para a indústria de soja pois antecede a obtenção de diversos derivados e que o pré-tratamento da soja com ultrassom antes da maceração pode influenciar na atividade da β -glicosidase endógena, aumentar o teor de isoflavonas agliconas e compostos fenólicos, bem como elevar a capacidade antioxidante e atividade anti-inflamatória, além de reduzir o tempo de maceração dos grãos, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do pré-tratamento com ultrassom antes da maceração da soja e otimizar as multi-respostas a atividade de β -glicosidases, conversão de isoflavonas em agliconas, compostos fenólicos totais, propriedades físicas e avaliação da capacidade antioxidante e atividade anti-inflamatória.

2. OBJETIVOS

- Investigar os efeitos das condições do pré-tratamento com ultrassom na maceração da soja aplicando o delineamento Box-Behnken sobre a atividade de β -glicosidases, o teor das diferentes formas de isoflavonas e a conversão de isoflavonas β -glicosídicas em agliconas.
- Otimizar as multi-respostas da atividade de β -glicosidases e do teor das isoflavonas agliconas daidzeína e genisteína.
- Determinar na soja otimizada no pré-tratamento com ultrassom e em diferentes tempos de maceração: o teor de umidade, a dureza, a conversão das diferentes formas de isoflavonas e a atividade de β -glicosidases.
- Investigar os efeitos e otimizar multi-respostas as condições do pré-tratamento com ultrassom na maceração da soja aplicando o delineamento Box-Behnken sobre o teor de isoflavonas agliconas totais e compostos fenólicos totais.
- Avaliar na soja otimizada no pré-tratamento com ultrassom e com maior teor de isoflavonas agliconas e compostos fenólicos totais, a capacidade antioxidante e atividade anti-inflamatória.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. ASPECTOS GERAIS E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA SOJA E SEUS COMPONENTES

A soja pertence à família das leguminosas e de acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), a variedade cultivada é denominada de *Glycine Max* (L.) Merrill (BRASIL, 2007). Constitui a base da alimentação chinesa há milênios e chegou ao Brasil no século XIX. Sua entrada no país foi por volta de 1914 pelo estado do Rio Grande do Sul e somente a partir da década de 70, a indústria brasileira teve interesse em seu processamento. Apesar do contínuo crescimento de seu cultivo, somente após a década de 90, a soja atingiu destaque na economia brasileira (BONATO; BONATO, 1987).

A soja tem sido considerada como a principal cultura do setor agrícola brasileiro. Na safra de 2017/2018, o Brasil continua sendo o segundo maior produtor mundial deste grão, com produção de 117 milhões de toneladas em uma área plantada de 35 milhões de hectares e representou 35% da safra mundial que foi estimada em 337 milhões de toneladas. No país, o estado do Mato Grosso é o maior produtor de soja, seguido do Paraná e juntos, representaram 51 milhões de toneladas ou equivalente a 44% da produção nacional (EMBRAPA, 2018). Nesta safra, os Estados Unidos foram o maior produtor mundial e representaram 36% da produção mundial totalizando cerca de 120 milhões de toneladas do grão (USDA, 2018).

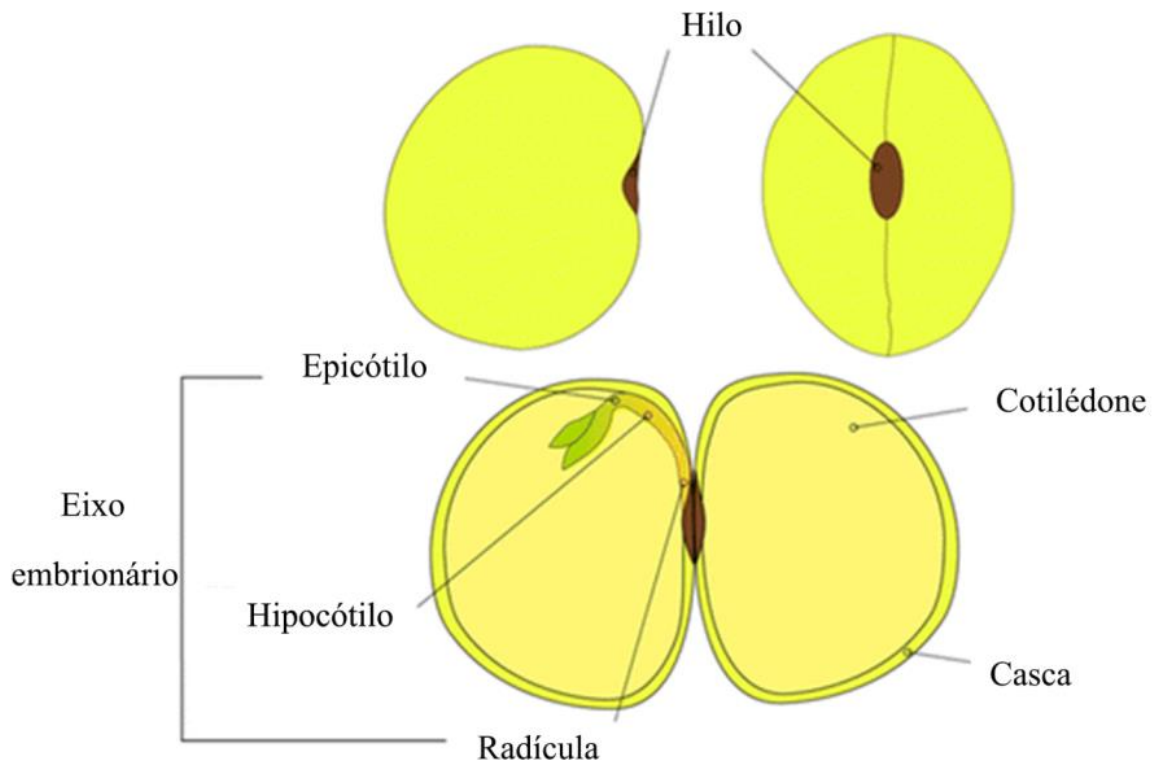
A produção da soja no Brasil apresentou um crescimento expressivo de 262 vezes ao longo das últimas cinco décadas. Sua alta produtividade deve manter-se por muitos anos, devido à crescente demanda por soja no mercado mundial e ao potencial de terras aptas que o Brasil ainda tem para serem exploradas. Considerando apenas as áreas já desmatadas e subutilizadas com pastagens degradadas, dezenas de milhões de hectares poderiam ser aproveitados para a produção da soja. Além do aumento na área plantada com produtividade de 3.333 kg/ha (EMBRAPA, 2018), o investimento em pesquisa e o desenvolvimento de cultivares mais resistentes tem melhorado o rendimento e ajudado a alavancar a produção no Brasil (BRASIL, 2012).

Apesar do aumento na produção da soja, apenas 50 % da produção nacional (ou cerca de 59 milhões de toneladas) foram destinados ao consumo interno (EMBRAPA, 2018). No Brasil, o óleo é o principal produto de soja para consumo humano. Entretanto, esta

leguminosa com grande potencial de produção pode também ser utilizada como matéria-prima para elaboração de diferentes produtos tais como: farinhas, concentrados proteicos, isolados proteicos, bem como, extratos de soja e outros produtos derivados do setor industrial (SEIBEL et al., 2018).

A composição química da soja é influenciada por diversos fatores tais como: condições climáticas, tipo de solo, localização geográfica, variedades, práticas agronômicas, dentre outros. Os principais componentes do grão de soja (Figura 1) são hipocótilo, casca (tegumento) e cotilédones e representam 2, 8 e 90% do peso do grão, respectivamente. Apesar das variações, os teores em base seca de proteínas e lipídeos são elevados e representam 40% e 21% dos constituintes do grão, respectivamente. Os carboidratos correspondem à 35% da composição química e são constituídos por açúcares, tais como: galactose, glicose, frutose, sacarose, oligosacarídeos (rafinose, estaquiase) e fibras. As cinzas representam 5% da composição química e quando os grãos são armazenados, o teor de umidade é de 13% (LIU, 1997). A composição química da soja é distinta para cada um de seus componentes e cada teor está apresentado na Tabela 1.

Figura 1 – Componentes da estrutura interna e externa do grão de soja



Fonte: Adaptado de Medic, Atkinson e Hurburgh (2014).

Tabela 1 – Componentes do grão de soja e sua composição química*

Componentes do grão	Composição química				
	(%)	Proteínas (%)	Lipídios (%)	Carboidratos (%)	Cinzas (%)
Hipocótilo	2	41	11	44	4
Cascas	8	9	1	86	4
Cotilédones	90	43	23	29	5
Grãos	100	40	20	35	5

* Expressos em (g/100g do grão, base seca).

Fonte: Adaptado de Liu (1997) e Medic, Atkinson e Hurburgh (2014)

Do ponto de vista comercial, os cotilédones são os componentes mais importantes da soja, pois neles estão estocados as proteínas e os lipídeos (MEDIC; ATKINSON; HURBURGH, 2014). No entanto, ao remover o óleo e frações solúveis e insolúveis da soja, obtém-se o isolado proteico de soja (SPI), que é amplamente utilizado na indústria de alimentos.

A soja é uma importante fonte de proteínas, que pode ser consumida de diversas formas, tais como os produtos não fermentados: tofu (proteína precipitada), moyashi (brotos de soja), soja verde (edamame) e grãos cozidos; e os fermentados como: miso (pasta de soja fermentada), natto (grãos de soja fermentados), aburage (pedaços de tofu frito), shoyu (molho de soja), tempeh e outros derivados proteicos. Além destes alimentos tradicionais, o extrato aquoso de soja também tem sido muito consumido devido às alegações de benefícios à saúde advindos da soja, assim como a proteína texturizada de soja (NISHINARI et al., 2014). Dentre os benefícios do consumo das proteínas da soja têm-se a atividade hipocolesterolêmica e anticarcinogênica (MEDIC; ATKINSON; HURBURGH, 2014).

Antes de haver o crescente interesse pela proteína, a obtenção do óleo era o principal objetivo comercial da produção da soja (HE; CHEN, 2013). Dentre os derivados de soja para alimentação humana, o óleo refinado é o produto mais utilizado e representa 25% de todos os óleos e gorduras consumidos no mundo (EMBRAPA, 2018a). Na composição do óleo, dentre os ácidos graxos encontram-se os ácidos esteárico (3,5 %) e oléico (7 % a 25 %) e os ácidos graxos essenciais poli-insaturados, o linoleico ($\omega 6$) (55 %) e o linolênico ($\omega 3$) (7,5 %) (SEIBEL, 2018). Os ácidos graxos essenciais são aqueles que não são sintetizados pelos seres humanos e desta forma, há a necessidade de sua ingestão por meio da alimentação. Além das funções fisiológicas, o consumo regular de alimentos ricos em ácidos graxos essenciais proporciona benefícios à saúde, incluindo redução de doenças cardiovasculares

(HE; CHEN, 2013) pela sua ação hipocolesterolêmica e anticarcinogênica (MEDIC; ATKINSON; HURBURGH, 2014).

O teor de carboidratos totais nos grãos de soja é de 34%, no qual 10% deste total correspondem aos carboidratos solúveis ou oligossacarídeos solúveis em água (5% de sacarose, 4% de estaquiase e 1% de rafinose). A rafinose e a estaquiase são os principais responsáveis pela flatulência causada após a ingestão de soja e derivados (BORDINGNON; MANDARINO, 1994) no entanto, podem favorecer o desenvolvimento de bifidobactérias endógenas no cólon contra as bactérias putrefativas. Os carboidratos insolúveis consistem em polissacarídeos complexos como celulose, hemicelulose e pectina e são classificados como fibras alimentares (CHEN et al., 2012). O consumo das fibras alimentares fornecem diversos benefícios a saúde como a melhora da função do trato digestivo, prevenção de câncer de cólon e prevenção de doenças cardiovasculares pela sua ação anti-hipertensiva, hipotrigliceridêmica e hipocolesterolêmica (MEDIC; ATKINSON; HURBURGH, 2014)

Os grãos de soja contêm em torno de 5% de cinzas em base seca. Dentre os minerais pode-se citar a presença de cálcio, fósforo, ferro, sódio, potássio, magnésio, zinco e cobre. Além dos minerais, a soja também apresenta algumas vitaminas em sua composição, como as vitaminas A, E, B1, B2 e niacina (Embrapa, 2018b). Ainda, apresenta as vitaminas B6, B12, C e K, que não são sintetizadas em quantidades suficientes pelo organismo humano e, portanto, devem ser fornecidas a partir da dieta (CHEN et al., 2012).

Desta forma, nota-se que o valor nutritivo da soja advém de seus principais constituintes, tais como proteínas, lipídeos, carboidratos, minerais e eventualmente de vitaminas. Diversos trabalhos têm estudado a composição química da soja, enfatizando principalmente as diferenças existentes entre as cultivares e outros fatores já citados anteriormente. No entanto, há carência de informações do efeito de processamento hidrotérmico da soja com ultrassom na maceração sobre os compostos bioativos que apresentam benefícios à saúde humana.

3.2. COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E ISOFLAVONAS DA SOJA

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários de frutas, legumes, nozes, sementes e plantas. Desenvolvem um papel importante no crescimento dos vegetais e atuam como um regulador fisiológico interno na proteção das plantas contra os predadores externos, tais como os insetos e microrganismos insvasores e na proteção contra a luz solar,

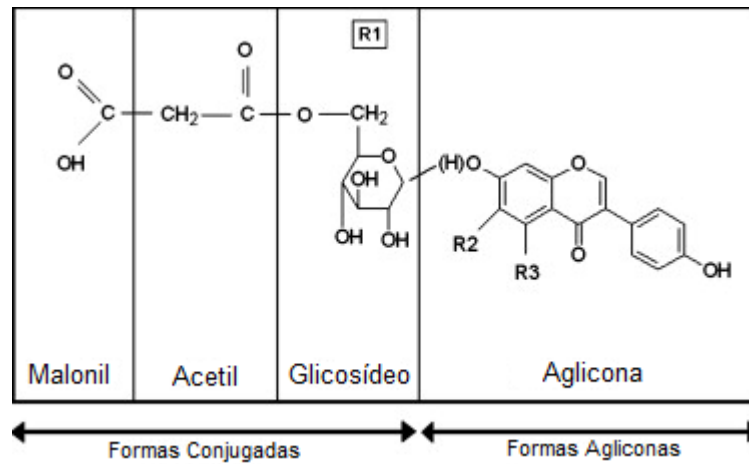
absorvendo comprimentos de ondas de alta energia que podem ser prejudiciais às plantas. Os flavonoides são um subgrupo dos compostos fenólicos e possuem um esqueleto básico de 15 carbonos, composto por uma estrutura de três anéis (C6-C3-C6). Com base nas diferenças estruturais do anel aglicona C e nas substituições dos grupos hidroxila e metoxi, os flavonoides podem ser classificados como: flavonas, flavanonas, flavonóis, flavanonois, isoflavonas, flavanois e antocianidinas (PAN; LAI; HO, 2010; SHAHIDI; YEO, 2016).

Diversas classes de fitoquímicos têm sido identificadas na soja, incluindo os inibidores de proteases, fitoesteróis, saponinas, ácidos fenólicos, ácido fítico e isoflavonas (ROSTAGNO et al., 2009). As isoflavonas são divididas em quatro formas químicas distintas e denominadas de: agliconas (genisteína, daidzeína e gliciteína), β -glicosídeos (genistina, daidzina e glicitina), malonilglicosídeos (malonilgenistina, malonildaidzina e malonilglicitina) e acetilglicosídeos (acetilgenistina, acetildaidzina e acetilglicitina) (LIU, 1997). A característica básica de sua estrutura é um núcleo flavona, composto por dois anéis benzenos ligado a um anel heterocíclico (Tabela 2) (ROSTAGNO et al., 2009).

Na soja, as isoflavonas agliconas (daidzeína, gliciteína e genisteína) acumulam-se em suas respectivas formas conjugadas durante o desenvolvimento dos grãos (KUDOU et al., 1991). Contudo, o conteúdo de isoflavonas e suas formas químicas variam e dependem da cultivar e condições de plantio (ano, localização e temperatura média do desenvolvimento da vagem) (BENASSI; PRUDENCIO, 2013; SZYMCAK et al., 2017), assim como, condições em que os grãos foram submetidos após a colheita (umidade relativa, temperatura e período de armazenamento) (BENASSI; PRUDENCIO, 2013), dentre outros fatores. Geralmente, a estocagem em períodos prolongados à temperatura ambiente resultam em redução do teor das formas β -glicosídicas, malonil glicosídicas e aumento das agliconas, sendo que a intensidade desta conversão é dependente da temperatura e umidade (ZIEGLER et al., 2018). A distribuição e forma química das isoflavonas também podem variar conforme os componentes do grão, sendo que a concentração maior de isoflavonas totais ocorre no hipocótilo (87%) seguido dos cotilédones (13%). Ainda que o hipocótilo represente a maior concentração de isoflavonas dentre os componentes do grão, proporcionalmente este componente participa com apenas 2% do total de isoflavonas e desta forma, são equivalentes aos cotilédones e contribuem de modo similar no teor de isoflavonas na soja. A radícula e epicótilo apresentam ausência de isoflavonas no grão *in natura* (YOSHIARA et al., 2018a). O perfil e teor de isoflavonas de cultivares de soja de diferentes regiões são apresentados na

Tabela 3.

Tabela 2 - Estrutura química das diferentes formas de isoflavonas da soja



Isoflavonas	Símbolo	R1	R2	R3
Genisteína	Ge	H	H	OH
Daidzeína	De	H	H	H
Gliciteína	Gle	H	OCH ₃	H
Genistina	Gi	C ₆ O ₅ H ₁₁	H	OH
Daidzina	Di	C ₆ O ₅ H ₁₁	H	H
Glicitina	Gli	C ₆ O ₅ H ₁₁	OCH ₃	H
Acetil-Genistina	AGi	C ₆ O ₅ H ₁₁ +COCH ₃	H	OH
Acetil-Daidzina	ADi	C ₆ O ₅ H ₁₁ +COCH ₃	H	H
Acetil-Glicitina	AGli	C ₆ O ₅ H ₁₁ +COCH ₃	OCH ₃	H
Malonil-Genistina	MGi	C ₆ O ₅ H ₁₁ +COCH ₂ COOH	H	OH
Malonil- Daidzina	MDi	C ₆ O ₅ H ₁₁ +COCH ₂ COOH	H	H
Malonil-Glicitina	MGli	C ₆ O ₅ H ₁₁ +COCH ₂ COOH	OCH ₃	H

Fonte: adaptado de Kudou et al. (1991) e Liu (1997)

Tabela 3 – Teor e perfil de isoflavonas de cultivares de soja (*Glycine max* (L.) Merr.) de diferentes origens.

Cultivar/Origem	Malonil glicosídeos (%) ^a			Total (%)	Glicosídeos (%) ^b			Total (%)	Agliconas (%) ^c			Total (%)	Referência
	<i>M.Dai</i>	<i>M.Gli</i>	<i>M.Gen</i>		<i>Dai</i>	<i>Gli</i>	<i>Gen</i>		<i>ADai</i>	<i>AGli</i>	<i>AGen</i>		
BRS 257/Brasil	25,3	17,7	45,8	88,8	3,5	2,0	4,6		N.d	N.d	1,1	1,1	LIMA e IDA (2014)
BRS 284/Brasil	7,5	47,2	8,2	72,9	7,1	15,7	3,2	25,9	N.d	N.d	1,2	1,2	QUINHONE JÚNIOR e IDA (2015)
BRS 267/Brasil	20,0	--	50,2	70,2	5,9	--	18,5	24,4	--	--	5,4	5,4	BORGES et al. (2016)
Caloria/Alemanha	16,6	--	17,9	34,5	30,0	4,3	30,7	65,0	0,2	0,1	0,25	0,55	SZYMCZAK et al. (2017)
Labrador/Alemanha	22,1	--	36,8	58,9	20,9	2,0	16,1	39	0,5	0,1	1,4	2,0	
Poppelsdorfer/Alemanha	17,8	--	21,1	38,9	24,7	4,2	30,9	59,8	0,3	0,3	0,8	1,4	
Safir/França	16,2	--	30,8	47,0	16,8	2,2	32,0	51	0,6	0,3	1,1	2,0	
Nanking/França	17,5	--	29,7	47,2	18,3	2,1	31,3	51,7	0,3	0,3	0,5	1,1	
Lutea/França	10,8	--	29,3	40,1	13,1	3,2	37,6	53,9	2,0	0,6	3,4	6	
Brovallia/França	15,9	--	27,7	43,6	20,7	0,7	32,0	53,4	1,2	0,1	1,5	2,8	
Fiskeby/França	14,5	--	26,1	40,6	21,5	0,8	33,9	56,2	1,2	0,2	1,9	3,3	
H.Ohashi/ Itália ^d	11,9	--	26,0	37,9	19,9	2,3	39,1	61,3	0,3	0,2	0,5	1,0	
H.Ohashi/Austria ^d	18,9	--	28,7	47,6	14,9	3,5	32,9	51,3	0,4	0,2	0,6	1,2	
H.Ohashi/França ^d	16,4	--	27,9	44,3	20,7	1,4	32,5	54,6	0,4	0,2	0,6	1,2	
H.Ohashi/Polônia ^d	11,0	--	25,8	36,8	20,3	1,6	39,4	61,3	0,4	0,3	1,2	1,9	
BRS 257/Brasil	28,1	8,0	42,5	78,6	9,9	3,1	7,8	20,8	0,3	--	0,3	0,6	YOSHIARA et al. (2018)

^aM.Dai, M.Gli e M.Gen correspondem as isoflavonas Malonil daidzina, Malonil glicitina e Malonil genistina, respectivamente. ^bDai, Gli e Gen correspondem as isoflavonas daidzina, glicitina e genistina, respectivamente. ^cADai, AGli e AGen correspondem as isoflavonas agliconas daidzeína, gliciteína e genisteína, respectivamente.

^dSubespécie da soja de diferentes origens. Nd: Não detectado. -- Valores não relatados.

As mudanças químicas que ocorrem nas isoflavonas durante o processamento da soja e seus derivados têm sido relatadas. No processamento de oito cultivares de soja brasileiras para a obtenção de tofus, Benassi e Prudencio (2013) observaram alterações no perfil e teor de isoflavonas, perda de isoflavonas no processamento, com retenção média nos tofus de 33%, comparadas ao teor total inicial dos grãos. Ainda, as formas malonil, que representavam 55% do total de isoflavonas nos grãos, reduziram para 34% nos tofus, sendo que esta redução do teor de malonil foi associada a conversão em acetildaidzina (de ausente passou a 1%) e em formas β -glicosídeos (de 42% passaram a 52%). Estas conversões de malonil às formas acetil e β -glicosídeos foram atribuídas devido a ação do calor que foi aplicado durante o tratamento térmico do extrato aquoso de soja durante o processamento dos tofus. As agliconas nos grãos representavam inicialmente 3% do total de isoflavonas dos grãos e nos tofus passaram a 14%, pela possível hidrólise enzimática dos glicosídeos.

Foi possível obter as isoflavonas agliconas por meio da deglicosilação (clivagem da ligação glicosídica) a partir das formas conjugadas de isoflavonas pela ação das enzimas endógenas β -glicosidases (HSIAO; HSIEH, 2018). Alguns estudos têm descrito o processo da fermentação em estado semi-sólido ou estado sólido da farinha de soja integral ou desengordurada como um método eficiente na conversão de isoflavonas em agliconas e diferentes resultados foram encontrados dependendo das cepas de fungos aplicadas. Da Silva, Celeghini e Chang (2011) investigaram o efeito da fermentação da farinha de soja integral (FSI) (cultivar BRS 232) na conversão de isoflavonas β -glicosídeos em agliconas com *Aspergillus oryzae* CCT 4359, incubadas a 30 °C por 24h (FSI-24h) e 48 h (FSI-48h). Os resultados mostraram que a FSI fermentada por 48 h continha predominantemente isoflavonas agliconas (75,51%) quando comparada com a FSI autoclavada (6,94%) e FSI (2,67%). Ainda, as concentrações das isoflavonas agliconas daidzeína e genisteína foram significativamente maior na FSI-48 h quando comparada com a FSI-24 h e esta conversão de isoflavonas foi devido a atividade extracelular das enzimas β -glicosidases.

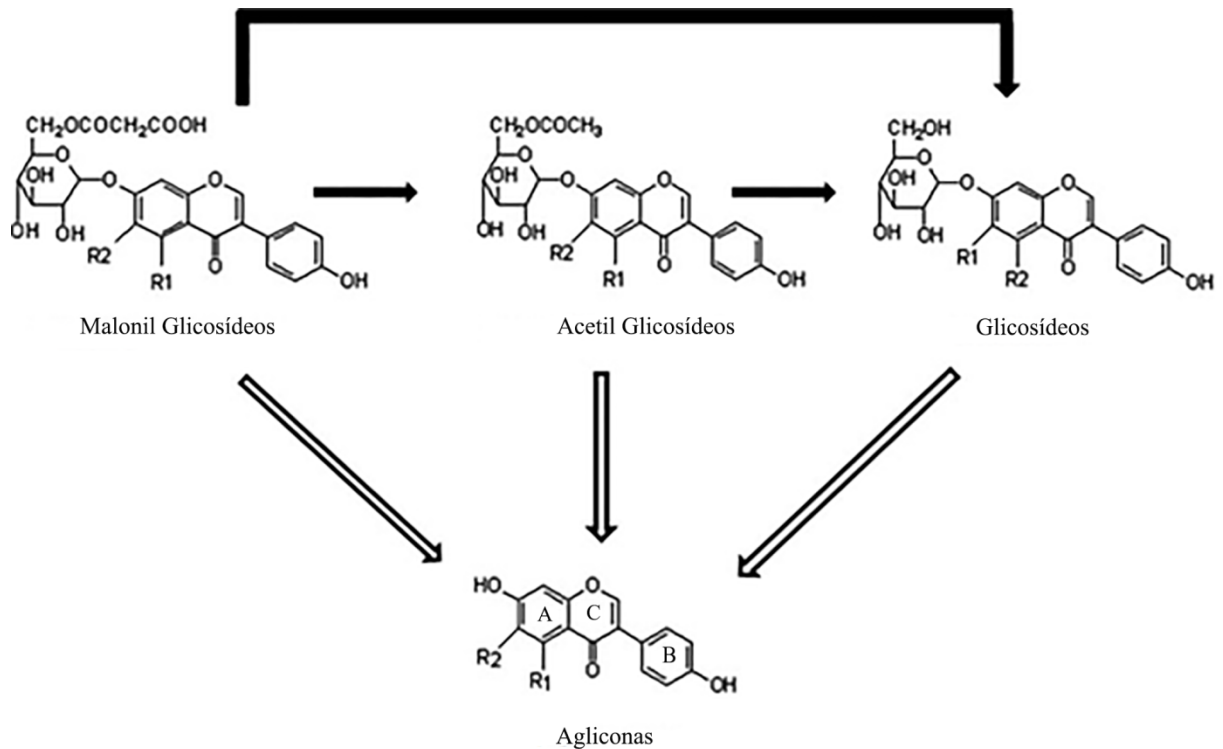
Handa et al. (2014) também avaliaram os parâmetros da fermentação em estado sólido (SSF) da farinha de soja desengordurada (FSD) com *Aspergillus oryzae* 3999/1998 ou *Monascus purpureus* NRRL 1992 sobre a produção de β -glicosidase e conversão isoflavonas glicosídicas em agliconas, utilizando o delineamento experimental composto central rotacional. As variáveis investigadas foram: pH inicial de FSD, volume de água adicionado a FSD e temperatura de incubação. As β -glicosidases extracelulares produzidas por ambas cepas hidrolisaram as isoflavonas β -glicosídeos daidzina e genistina gerando as isoflavonas agliconas daidzeína e genisteína. A atividade de β -glicosidase da cepa *A. oryzae* IOC 3999/1998 foi 10,7 vezes maior comparada com a cepa *M. purpureus* NRRL 1992. Entretanto, a atividade da β -glicosidase produzida por *M. purpureus* NRRL 1992 foi 1,44 vezes maior na produção de daidzeína e 1,35 vezes maior na produção de genisteína do que a atividade da β -glicosidase produzida por *A. oryzae* IOC 3999/1998. Assim, a fermentação de FSD com *M. purpureus* NRRL 1992, demonstrou ser mais eficiente na conversão de isoflavonas.

Além de processos fermentativos, a germinação da soja também foi descrita como um método eficaz na conversão de isoflavonas em agliconas. Quinhone Júnior e Ida (2015) avaliaram o efeito do tempo de germinação (24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168h) sobre os parâmetros físicos (comprimento, umidade, peso seco e peso fresco) e sobre o perfil e teor de diferentes formas de isoflavonas dos brotos. Os grãos de soja (BRS 284) foram germinados com incidência de luz natural a 35 °C e umidade relativa de 100%. Os grãos de soja continham inicialmente 26,0% de isoflavonas β -glicosídeos, 72,9% de malonil glicosídeos e 1,2% agliconas. O rendimento de brotos de soja germinados por 168h foi de 632,4%. O tempo apresentou diferentes efeitos: linear sobre o peso fresco do grão e teor da isoflavonas malonil daidzina; quadrático sobre o comprimento e umidade do broto e sobre o teor de daidzina, genistina e daidzeína e; nenhum efeito sobre a matéria seca do grão. O teor de malonil glicetina foi constante, e a glicetina e gliciteína não foram detectadas nos brotos.

Além da germinação, tratamentos térmicos da farinha de soja integral (FSI) também foram descritos como métodos eficientes na conversão de isoflavonas β -glicosídeos em agliconas. Andrade et al. (2016) avaliaram os efeitos do tratamento térmico da FSI sobre a conversão de isoflavonas e a inativação de inibidores de tripsina. Os efeitos do tempo (10, 15 e 20 min) e temperatura (100, 150 e 200° C) foram investigados pela aplicação do planejamento experimental 3² e as funções respostas foram conteúdo de diferentes formas de isoflavonas e da atividade residual de inibidores de tripsina. O tratamento térmico alterou o conteúdo e perfil das diferentes formas de isoflavonas, no qual a maior conversão de malonil glicosídeos em acetil glicosídeos, β -glicosídeos e agliconas e redução na atividade de inibidores de tripsina, ocorreu a 200 °C por 20 min.

A Figura 2 ilustra as principais rotas de degradação das isoflavonas no processamento da soja e seus derivados. Assim, a interconversão de isoflavonas pode ocorrer de diferentes formas, sendo as principais: descarboxilação das formas malonilglicosídeos e formação de acetil glicosídeos, hidrólise éster das formas malonil e acetil glicosídeos e formação de β -glicosídeos e a deglicosilação das formas malonil, acetil e β -glicosídeos com formação de agliconas (GRÜN et al., 2001).

Figura 2 - Rotas de degradação das isoflavonas no processamento da soja e seus derivados



Fonte: Adaptado de Rostagno et al. (2009)

3.2.1. Compostos fenólicos totais e isoflavonas: benefícios a saúde

Os benefícios para a saúde relacionados ao consumo de alimentos à base de soja têm sido associados às atividades antioxidante e anti-inflamatória dos polifenóis (PAN; LAI; HO, 2010). A inflamação é uma resposta biológica estimulada por patógenos ou células danificadas e é um processo de proteção para resolver a infecção e ativar o reparo do tecido. No entanto, este processo deve ser rápido, específico e bem controlado, a fim de evitar a ativação excessiva da resposta imune inata, doenças infecciosas e/ou inflamatórias crônicas que podem causar sérios danos aos tecidos. Evidências mostraram que o desenvolvimento de várias doenças, incluindo obesidade, diabetes, aterosclerose e câncer, está correlacionado com a inflamação. Estudos recentes demonstraram que os flavonoides, exibem atividades antioxidante e anti-inflamatória *in vitro* e *in vivo* (YU et al., 2016) e existem diversos mecanismos de ação pelos quais estes compostos podem exibir efeitos benéficos a saúde humana. Dados sobre estes efeitos protetivos são apresentados na Tabela 4.

A capacidade antioxidante e atividade anti-inflamatórias bem como outras funções biológicas dos polifenóis foram atribuídas às particularidades de suas estruturas químicas. A característica aromática e o sistema altamente conjugado bem como a presença de diversos grupos hidroxila tornam esses compostos bons doadores de elétrons ou átomos de hidrogênio, neutralizando os radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio (EROS) (ZHANG; TSAO, 2016b). Os principais mecanismos da atividade antioxidante dos compostos fenólicos foram descritos como: (i) sequestro de radicais livres; (ii) quelação de metais; (iii) inibição de vários tipos de oxidases (como ciclo-oxigenase) e (iv) estimulação de enzimas com propriedades antioxidantes (superóxido dismutase, catalase, etc.) (NIJVELDT et al., 2001; XYNOS et al., 2012).

Dentro da família de compostos fenólicos, o foco desta pesquisa tem sido em uma subclasse, as isoflavonas, que são encontradas principalmente em soja e derivados. As isoflavonas glicosídicas não são absorvidas intactas e sua biodisponibilidade requer uma hidrólise inicial (SETCHELL et al., 2001). Assim, a conversão das isoflavonas glicosídicas em agliconas é desejável, pois resulta em quantidades maiores de compostos que fornecem benefícios à saúde humana (PARK et al. 2001a) e a importância das isoflavonas agliconas nos alimentos tem sido enfatizada devido a sua elevada atividade biológica (AMARAL et al., 2017).

A atividade anti-inflamatória *in vitro* de extratos etanólicos de soja verde e amarela com ou sem irradiação de luz visível foram avaliados em células Jurkat THP-1 e RAW264.7. Os extratos de soja verde irradiados com luz visível apresentaram efeitos anti-inflamatórios e melhorou a dermatite atópica em modelo animal. A isoflavona aglicona genisteína foi identificada como um inibidor de proteína tirosina quinase (PTK) que possui propriedades anti-inflamatórias *in vitro*. No presente estudo, os níveis de isoflavonas não foram significativamente alterados pela irradiação de luz visível, no entanto, a irradiação de luz visível induziu a formação de um novo produto oxidativo da daidzeína. A diferença estrutural entre este novo composto e a daidzeína se encontra no anel C: o anel C da daidzeína foi modificado através de uma reação oxidativa da daidzeína catalisada pela clorofila (Figura 2). Este novo composto foi denominado por protodaidzeona (TANAKA et al., 2014).

Tabela 4 – Efeitos positivos e atividades biológicas de isoflavonas e compostos fenólicos da soja relatadas por ensaios *in vivo* e *in vitro*

Composto analisado	Efeito biológico	Principais resultados	Prevenção ou Função	Referência
Genisteína	Angiogênese	Genisteína melhorou o atraso na cicatrização de feridas no diabetes tipo 1 em camundongos.	Diabetes tipo 1	TIE et al. (2013)
Daidzeína	Atividade anti-inflamatória	Daidzeína atenuou acentuadamente a inflamação do pulmão nos tecidos pulmonares dos ratos.	Doenças pulmonares inflamatórias	LI et al. (2014)
Extratos da soja verde irradiada com luz visível (ESVILV)	Atividade anti-inflamatória	ESVILV suprimiu o desenvolvimento de dermatite atópica, como lesões de pele e reduziu a incidência de dermatite dos camundongos.	Dermatite	TANAKA et al. (2014)
Genisteína	Atividades antioxidante e anti-inflamatória	Genisteína modulou a expressão de NF- κ B e MAPK (p-38 e ERK1 / 2), atenuando a insuficiência hepática fulminante em ratos Wistar e manteve o potencial redox, fortalecendo o sistema antioxidante de defesa da célula.	Doenças hepáticas e inflamatórias	GANAI et al. (2015)
Genisteína	Atividade anti-inflamatória	Genisteína protegeu a lesão inflamatória endotelial, reduziu a liberação de EROS, inibiu a ativação do NF- κ B, evitando células inflamatórias e plaquetas adesão, levando a um balanço: da proliferação de células endoteliais e apoptose.	Doenças cardiovasculares	HAN; WU; LI (2015)
Extrato de soja verde	Atividade anti-inflamatória	Maior expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro no hipocampo em camundongos que ingeriram extrato de soja verde (ESV) comparados ao controle. Este estudo sugere que a ingestão de ESV aumenta as habilidades de aprendizado e memória em camundongos.	Melhora a função cognitiva	PERVIN et al. (2017)

Genisteína	Atividade antioxidante	Genisteína normalizou significativamente a expressão alterada de citocinas pró-inflamatórias. Alivia a neuroinflamação e restabelece a função cognitiva. Pode ser usada como um forte antioxidante para atenuar os efeitos neurotóxicos dos xenobióticos.	Encefalopatia Hepática (HE)	GANAI; HUSAIN (2017)
Genisteína/ Extrato de soja	Atividades anti-aromatase e anti-tumoral	Extrato de soja biotransformado (ESB) por <i>Aspergillus awamori</i> foi mais eficiente na atividade anti-aromatase e anti-proliferativa de células de câncer de mama, comparado ao ES não biotransformado. A eficácia mais eficiente do ESB foi associado a isoflavona genisteína.	Prevenção de câncer de mama.	AMARAL et al. (2017)

^aROS = Espécies reativas de oxigênio (Reactive Oxygen Species).

^bC3G = Cianidina-3-Glicosídeo (Cyanidin-3-Glucoside).

N.r. = Não relatado.

Em estudo da avaliação da atividade anti-inflamatória e da hepatotoxicidade da genisteína em ratos Wistar, Ganai et al. (2015) concluíram que esta isoflavona aglicona pode servir como um potencial suplemento na prevenção de doenças hepáticas e inflamatórias. Os efeitos hepatoprotetores e curativos da genisteína foram evidenciados a partir de uma diminuição dos níveis séricos de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), bem como prevenção de danos histológicos por pré-tratamento com genisteína. Além disso, a genisteína foi capaz de manter o potencial redox fortalecendo o sistema antioxidante de defesa da célula.

Os efeitos de extratos aquosos de soja verde (cultivar Echigomidori) e de soja amarela (cultivar Fukuyutaka) sobre o crescimento do número de células SH-SY5Y e sobre a função cognitiva de ratos jovens foram avaliados por Pervin et al. (2017), e observaram que a administração de extratos aquosos de soja verde pôde alterar as habilidades de aprendizagem e memória, o que refletiu na melhora da função cognitiva, além de aumentar significativamente o número de células. Embora as isoflavonas agliconas (genisteína e daidzeína) tenham aumentado o número de células SH-SY5Y, este efeito só foi observado em uma alta concentração [0,05 μ M (13 ng/mL)]. Este estudo sugeriu que a ingestão de extrato de soja verde aumentou as habilidades de aprendizado e memória em camundongos.

A causa mais comum de morte por câncer em mulheres no mundo todo é por câncer de mama positivo para receptor de estrogênio (ER⁺). Assim, Amaral et al. (2017) investigaram as propriedades anti-tumorais do extrato de soja, assim como a efetividade de sua biotransformação pelo fungo *Aspergillus awamori*. Foi verificado que o extrato de soja bioconvertido por *A. awamori* apresentou-se mais eficaz em relação a atividade anti-aromatase e antiproliferativa em células de câncer de mama. Daidzeína e genisteína inibiram o crescimento de células cancerígenas, sendo a aglicona genisteína a isoflavona que mais contribuiu aos efeitos induzidos pelo extrato de soja bioconvertido. Desta forma, foi demonstrado que a biotransformação do extrato de soja por *A. awamori* aumentou a eficácia do extrato de soja no combate das células de câncer de mama. Além disso, elucidou o uso potencial da soja na prevenção e/ou tratamento do câncer de mama.

3.2.2. Aspectos gerais sobre a determinação do teor de isoflavonas da soja

As isoflavonas podem ser extraídas de diferentes derivados de soja

incluindo os grãos macerados ou germinados, okara, farinha fermentada, pasta de soja fermentada, tofu, misso, dentre outros. Vários métodos de extração tem sido descritos visando uma extração que represente fidedgnamente a amostra em relação ao perfil e teor destes compostos. A extração é uma etapa que antecede a separação, identificação e quantificação de isoflavonas. Diversas técnicas tem sido propostas e todas com alguns objetivos em comum, tais como: (a) extrair os compostos bioativos; (b) aumentar a seletividade dos métodos analíticos; c) aumentar a sensibilidade do bioensaio aumentando a concentração dos compostos específicos; e (d) fornecer um método robusto e reprodutível que seja independente de variações na matriz da amostra (AZMIR et al., 2013).

Uma etapa preliminar e importante no preparo de amostras é a moagem. Os métodos que utilizam grandes martelos, discos eletrônicos, discos rotativos e laminadores a frio foram testados e comparados com a extração tradicional utilizando metanol a 70% e não encontraram diferenças significativas nos extratos entre os quatro tipos de moinho quanto o teor e perfil de isoflavonas. Além da moagem, a agitação também se torna uma etapa importante, pois deve garantir o melhor contato entre a superfície das partículas de farinha de soja e o solvente. Os métodos de agitação foram testados, utilizando os agitadores magnéticos, horizontais e verticais. Sendo que a melhor eficiência de extração foi encontrada com o agitador vertical, pois provavelmente permitiu a mistura completa do solvente e da farinha, com uma solubilização mais completa das isoflavonas (LANTE et al., 2018).

Os métodos convencionais de extração de isoflavonas baseiam-se no uso de solventes químicos e agitação das amostras para maximizar a solubilidade dos compostos alvo e acelerar a transferência de massa (LANTE et al., 2018). O rendimento da extração depende de vários fatores, incluindo o tipo e a quantidade de solvente (YOSHIARA et al., 2012) e tempo e temperatura empregados na extração (LANTE et al., 2018). A polaridade do composto de interesse é o fator mais importante para a escolha do solvente, assim como a afinidade molecular entre o solvente e soluto, transferência de massa, segurança ambiental, toxicidade humana e a viabilidade financeira (AZMIR et al., 2013). Os solventes orgânicos comumente usados na extração de isoflavonas de soja são soluções aquosas de metanol, etanol e/ou acetona, em concentrações variáveis e com ou sem acidificação com ácido acético. Alguns exemplos de extração de isoflavonas empregando diferentes solventes são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Métodos cromatográficos para a identificação e quantificação de isoflavonas na soja

Extração	Instrumentação	Coluna	Fases móveis (FM)	Referência
Água ultra-pura:etanol:acetona (1:1:1; v:v:v)	UPLC-DAD	BEH (Ethylene Bridged Hybrid) Fase Reversa C18	FM A: Ácido acético glacial (pH3); FM B: Acetonitrila (ACN)	YOSHIARA et al. (2012) LIMA e IDA (2014) BAÚ e IDA (2015) QUINHONE JÚNIOR e IDA (2015)
80% metanol, 80% methanol em 0.1 N HCl, 80% acetonitrile ou 80% acetonitrile em 0.1 N HCl	HPLC-ESI-ToF- MS	Symmetry C18	FM A: Solução aquosa de ácido fórmico 0.05%; FM B: Metanol	LEE et al. (2015)
Metanol 80%	HPLC	C18	FM A: Metanol FM B: Água	YANG et al. (2015)
Etanol 70% contendo 0,1% de ácido acético	HPLC-DAD	ODS (Octadecyl-silica) Fase Reversa C18	FM A: Metanol contendo 0.025% de TFA; FM B: Água contendo 0.025% de TFA	COSTA et al. (2015)
Etanol 70% contendo 0,1% de ácido acético	HPLC-PDA	ODS (Octadecyl-silica) Fase Reversa C18	FM A: Metanol contendo 0.025% de TFA; FM B: Água ultrapura contendo 0.025% de TFA	CIABOTTI et al. (2016)
Água ultra-pura:etanol:acetona (1:1:1; v:v:v)	UPLC-DAD	BEH (Ethylene Bridged Hybrid) Fase Reversa C18	FM A: Ácido acético glacial (pH3); FM B: ACN	ANDRADE et al. (2016) BORGES et al. (2016)
Água ultra-pura:etanol:acetona (1:1:1; v:v:v)	UPLC-DAD	BEH (Ethylene Bridged Hybrid) Fase Reversa C18	FM A: Ácido acético glacial (pH3); ACN	MULITERNO et al. (2017) FERNANDES et al. (2017)
Metanol 80%	HPLC-DAD-MS	C18	FM A: Solução aquosa de TFA 0,025% FM B: ACN	SZYMCZAK et al. (2017)

Metanol 80%	HPLC-ESI-ToF-MS*	Fase Reversa C18	FM A: 0.1% ácido fórmico FM B: Metanol	ZIEGLER et al. (2018)
Metanol 70%	HPLC-DAD	C18	FM A: Solução aquosa de ácido trifluoroacético (TFA) 0,25% FM B: ACN	LANTE et al. (2018)
70% de etanol contendo 0.1% de ácido acético	HPLC-DAD	CTO-10AS VP	FM A: Ácido acético (pH3) ACN	YOSHIARA et al. (2018)
Etanol 30%	HPLC-UV	Discovery Bio Wide Pore C18	FM A: Ácido acético 0,1% FM B: ACN	DA SILVA; KUPSKI; BADIALE-FURLONG (2018)
Acetona: água: ácido acético (70:29.5:0.5, v/v/v)	HPLC-DAD	RP-18	FM A: Água grau HPLC FM B: ACN	HSIAO e HSIEH (2018)
Água ultra-pura:etanol:acetona (1:1:1; v:v:v)	UPLC-DAD	BEH (Ethylene Bridged Hybrid) Fase Reversa C18	FM A: Solução aquosa de ácido fórmico 0,4% FM B: ACN	FALCÃO et al. (2018)
Água ultra-pura:etanol:acetona (1:1:1; v:v:v)	UPLC-DAD	BEH (Ethylene Bridged Hybrid) Fase Reversa C18	FM A: Ácido acético glacial (pH3) FM B: ACN	YOSHIARA et al. (2018b)
Metanol 80%	HPLC-UV/vis	AQ-C18	FM A: Solução aquosa de ácido acético 0,1% FM B: ACN acificada com ácido acético 0,1%	MA et al. (2019)

HPLC, DAD, PDA, UV/vis correspondem a Cromatografia Líquida de Alta Performance (High-Performance Liquid Chromatography), Detector de matriz de diodo (diode array detection) e Detector de matriz de fotodiodo (photodiode array detection), Ultra-violeta/visível respectivamente.

*Cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massa de tempo de voo de ionização por electrospray.

Na otimização da extração de isoflavonas (malonil, β -glicosídeos e agliconas) da soja com diferentes solventes variando sua polaridade (água, acetona, etanol e acetonitrila), observou-se que o perfil das isoflavonas de soja variou com os diferentes solventes de extração. As diferentes formas químicas foram melhor extraídas com água:acetona:etanol (1:1:1; v:v:v). Além disso, foi observado que a extração de isoflavonas de farinha de soja com solventes orgânicos puros (etanol, metanol ou acetona) não foram eficientes e os resultados sugeriram que a mistura binária ou ternária com água até 50% foi mais vantajosa (YOSHIARA et al., 2012).

Alguns parâmetros de extração assistida por ultrassom das isoflavonas agliconas da soja (daidzeína e genisteína) foram avaliados por Da Silva, Kupski e Badiale-Furlong (2018) por meio do delineamento central composto. As diferentes concentrações de etanol (50, 60 e 70%) avaliadas não alteraram significativamente a quantidade de isoflavonas extraídas e a solução de etanol a 30 % com a aplicação de ultrassom no extrato a 500W foi utilizada para as análises posteriores. Um experimento isolado foi conduzido para obter a melhor concentração de HCl (1, 2 ou 3 mol/L) para a hidrólise das isoflavonas conjugadas após a extração, sendo que a solução de HCl 1 mol/L forneceu a melhor taxa de recuperação de ambas isoflavonas (daidzeína e genisteína). Outros parâmetros de extração (frequência, 34 a 76 kHz) e hidrólise (temperatura, 60 a 140 °C; tempo, 18 a 42 min) foram avaliados pela aplicação de um delineamento experimental CCDR (2³). A função de desejabilidade indicou que a melhor condição de extração e hidrólise assistida por ultrassom das isoflavonas agliconas da soja (daidzeína e genisteína) foi o tempo de extração por 30 min, frequência de 55 kHz e temperatura de hidrólise 168 °C.

3.3. MACERAÇÃO DOS GRÃOS DE SOJA E EFEITOS SOBRE A CONVERSÃO DE ISOFLAVONAS AGLICONAS, ATIVIDADE DE ENZIMAS B-GLICOSIDASES, ABSORÇÃO DE ÁGUA E DUREZA DOS GRÃOS

A maceração da soja é considerada uma das etapas mais importantes no processamento para a obtenção de derivados pois resulta na redução de energia requerida no processamento e no tempo de cozimento dos grãos (LIU, 1997).

No estudo do tratamento hidrotérmico de quatro variedades de soja (Toyomusume, Tamahomare, Murayutaka, Toyokomachi) em água (1:3; soja:água) a 15 °C por 20 h sobre o perfil de isoflavonas, Toda et al. (2001) verificaram que o teor de

isoflavonas agliconas aumentou enquanto que o teor de isoflavonas glicosídicas diminuiu e não houve alteração na proporção de isoflavonas conjugadas malonil ou acetil. Houve diferença na taxa de absorção de água entre as variedades e conversão de isoflavonas glicosídicas a agliconas que foram associadas à atividade da β -glicosidase presente na soja.

O efeito do tratamento hidrotérmico (40, 50 e 60°C por 12 e 18 h) de cultivares de soja (BR 36, FEPAGRO RS-10 e BRS 155) cultivadas em diferentes regiões (Londrina, Capanema e Palmas) do Paraná na safra 1999/2000 sobre o teor de isoflavonas agliconas nos grãos foi avaliado por Carrão-Panizzi; Simão; Kikuchi (2003). Verificaram que a aplicação do binômio temperatura x tempo de 50 °C por 12 h na maceração foi mais eficiente na conversão de isoflavonas glicosídicas em agliconas. No entanto, o aumento da temperatura para 60°C resultou em queda no conteúdo de isoflavonas agliconas decorrente da inativação das enzimas endógenas β -glicosidases. As isoflavonas conjugadas malonil, apresentaram redução no teor com a aplicação de temperaturas mais elevadas devido a sua instabilidade térmica.

O efeito da temperatura (30, 50, 60 e 85 °C) de maceração da soja em água na proporção 1:5 (água:soja) sobre a absorção de água, a atividade da β -glicosidase endógena e a conversão de genistina e daidzina em suas respectivas agliconas foram investigados por Wardhani; Vázquez; Pandiella (2008). Foi observado que a máxima atividade da β -glicosidase ocorreu a 50°C após 1 h de maceração e após este período a atividade diminuiu. Destacaram que a atividade da β -glicosidase na soja na maceração contribuiu para o aumento da quantidade de isoflavonas agliconas nos grãos macerados e que o teor de umidade final do grão foi dependente da temperatura.

Na hidratação de cotilédones da soja BRS 213 (safra 2004 e 2005) a 50 °C por 12 h com água nas proporções 1:1,2 ou 1:1,3 (soja:água), foi observado que o teor de isoflavonas malonil e β -glicosídeos diminuiu 33% e 56,5% após a maceração dos grãos das safras de 2004 e 2005, respectivamente. Enquanto que as agliconas daidzeína e genisteína, que anteriormente não foram detectadas, aumentaram para 0,5 e 0,8 $\mu\text{mol/g}$ nos grãos das safras de 2004 e 2005, respectivamente. Um maior teor de isoflavonas agliconas foi observado nos cotilédones como resultado da pouca migração de isoflavonas e β -glicosidases para a água de hidratação (GÓES-FAVONI; CARRÃO-PANIZZI; BELEIA, 2010).

A otimização das condições da maceração da soja para a máxima conversão de isoflavonas β -glicosídicas em agliconas utilizando a superfície de resposta

e proporção de 1:1,5 (p:p) de soja: solução tampão citrato-fostato 0,05 mol/L e pH 6, foi investigado por Lima e Ida (2014). Observaram que a máxima conversão de isoflavonas em agliconas (1,22 $\mu\text{mol/g}$) ocorreu a 55 °C (± 1 °C) após 6 h de maceração. Nesta condição, a soja macerada apresentou um conteúdo mínimo de isoflavonas β -glicosídicas e baixa atividade de β -glicosidases. A baixa atividade da enzima foi atribuída à perda da sua estabilidade após a sua máxima atuação. Além disso, o tratamento hidrotérmico favoreceu a atividade das β -glicosidases para a conversão de isoflavonas conjugadas em agliconas, sendo que a solução tampão em pH 6 utilizada como meio de imersão contribuiu para esses resultados. Ainda, os efeitos do tempo (0 a 7 h) e temperatura (25, 40, 55 e 70 °C) na maceração da soja em água na mesma proporção sobre as propriedades de textura, umidade dos grãos e a perda de isoflavonas também foram investigados (LIMA; KUROZAWA; IDA, 2014). Observaram que o teor de isoflavonas totais e proteínas solúveis foram melhor preservados nas temperaturas de 25 °C e 40 °C e a maceração a 55 °C por 5 h antes dos processos subsequentes foram recomendados para que ocorra uma maior formação de isoflavonas agliconas e preservação do teor total de isoflavonas sem prejudicar a absorção de água, dureza ou teor de proteína solúvel da soja. Além disso, a atividade da β -glicosidase e os conteúdos de isoflavonas agliconas e β -glicosídeos da soja macerada por 5 h à 55°C foram relacionados. Nesta condição, a soja macerada apresentou um teor de isoflavonas agliconas de 6 vezes maior do que a soja inteira (81,4 μg agliconas/g).

A absorção de água da soja durante a maceração está diretamente relacionada à sua textura e propriedades de moagem durante o processamento. Neste sentido, os efeitos da aplicação do vácuo (0,02–0,08 MPa) na maceração da soja (8 a 16 h) em água ou soluções salinas de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) ou cloreto de sódio (NaCl) foram avaliados sobre a absorção de água, textura e propriedades de moagem. Os resultados mostraram que a maceração a vácuo promoveu maior absorção de líquidos, devido a ruptura da parede celular da soja e como consequência houve a diminuição da dureza da soja e redução do tempo de maceração comparado a soja macerada sob pressão atmosférica. Adicionalmente, na obtenção de extrato aquoso de soja (EAS) o teor de proteínas foi maior no EAS obtido a partir de soja macerada sob vácuo do que no EAS macerada sob pressão atmosférica (XIAO et al., 2015).

A conversão de isoflavonas e a atividade da β -glicosidase endógena durante a maceração (40 °C por 0, 3, 6, 9, 12, 15 e 18 h) da soja preta (Tainan 3) em água destilada para a obtenção de EAS, foi investigada por Hsiao e Hsieh (2018). Foi

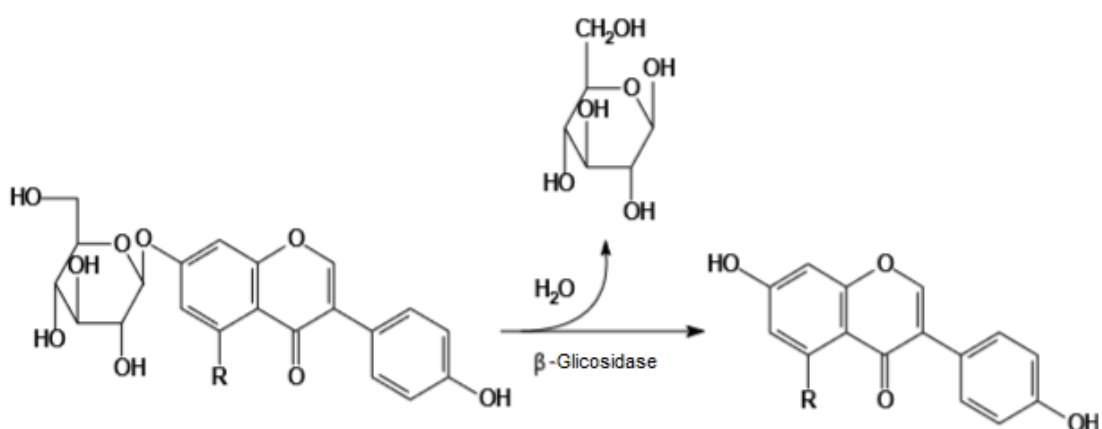
observado que a atividade da β -glicosidase endógena aumentou com o tempo de maceração, atingindo máxima atividade (1,64 vezes maior do que o controle) em 15 h, sendo que a máxima produção de daidzeína e genisteína ocorreu após este tempo e foi associada à atividade da β -glicosidase endógena. O conteúdo de compostos bioativos, incluindo daidzeína, genisteína também aumentou significativamente e esta conversão possivelmente foi devido a reação de desglicosilação das isoflavonas conjugadas. No EAS, após o aquecimento a 90 ° C por 1 h, o conteúdo de isoflavonas glicosídicas incluindo a daidzina, glicitina e genistina foi aumentado devido a uma reação de desesterificação a partir das isoflavonas malonil glicosídicas a alta temperatura. Pelo contrário, o teor de agliconas, incluindo daidzeína e genisteína, não foi alterado significativamente, indicando que as agliconas apresentaram uma boa estabilidade térmica. Desta forma, estes resultados sugeriram que a maceração da soja foi benéfica para a produção do EAS pois a conversão dos componentes bioativos, incluindo a daidzeína e genisteína foi alcançada.

As enzimas possuem natureza proteica e são catalisadores biológicos de muitas reações em organismos vivos. Geralmente, a aplicação industrial das enzimas visa acelerar a velocidade de uma reação em que é ambientalmente sustentável (MONTEIRO; SILVA, 2009) e adicionar um valor agregado aos alimentos. As enzimas de alimentos podem ser classificadas como: (1) exógenas em que são adicionadas aos alimentos objetivando causar alguma mudança desejável e (2) endógenas em que estão presentes na matriz do próprio alimento e são responsáveis pelas mudanças na qualidade dos produtos alimentícios. Existe um grande desafio no controle da atividade das enzimas endógenas, uma vez que estão presentes em diversas concentrações e há restrições na forma de manipulação do alimento para moldar a ação da enzima. Em alguns alimentos, estas enzimas podem ser as responsáveis pela melhora nas suas características de qualidade, enquanto que em outros sistemas são desejáveis a sua inativação ou eliminação. As fontes das β -glicosidases podem ser microbianas ou de vegetais (PARKIN, 2010) e a Figura 3 ilustra a hidrólise das isoflavonas glicosídicas em agliconas e glicose pela ação das enzimas β -glicosidases.

A aplicação das enzimas livres e imobilizadas (células imobilizadas em alginato de cálcio contendo a enzima) de *Debaryomyces hansenii* UFV-1 em melaço de soja foi realizada por Maitan-Alfenas et al. (2014) para hidrolisar os glicosídeos das isoflavonas. Observaram que a β -glicosidase livre e as células imobilizadas contendo a enzima apresentaram pH e temperatura ótimos de 6,0 e 45° C e 5,5 e 50° C,

respectivamente. Ainda, o tratamento do melão de soja com a enzima livre e células imobilizadas contendo β -glicosidase, por 2 h a 40 ° C, promoveu uma eficiente hidrólise das isoflavonas β -glicosídeos em suas formas agliconas. Desta forma, estes resultados comprovaram que esta enzima em ambas formas podem ser usadas na indústria de alimentos, como um processo seguro e eficiente para hidrolisar os β -glicosídeos de melão de soja.

Figura 3 - Transformação de isoflavonas glicosídicas em agliconas pela ação das enzimas β -glicosidases.



Fonte: Adaptado de Park et al. (2001).

Neste contexto, as variações nos parâmetros durante a maceração e a aplicação de métodos efetivos de pré-tratamentos hidrotérmicos visando aumentar o teor de isoflavonas agliconas e compostos fenólicos totais nos grãos de soja, sem prejudicar suas propriedades físicas têm sido investigados. Contudo, ressalta-se também a importância de avaliar os efeitos destes pré-tratamentos sobre as atividades das β -glicosidases endógenas da soja que possuem a sua importância pois influenciam na hidrólise das isoflavonas glicosídicas em agliconas durante a maceração dos grãos.

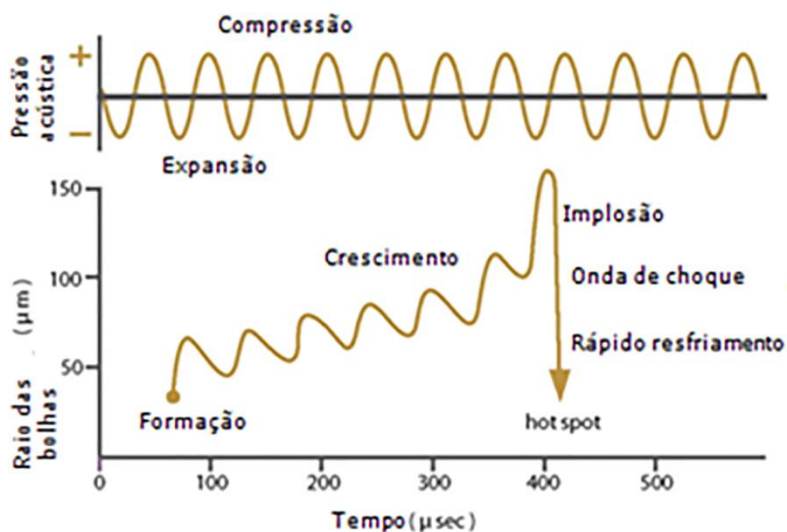
3.4. ULTRASSOM

O ultrassom é um som cujas ondas sonoras possuem frequências acima do limite audível para o ser humano, ou seja, acima de 20.000 Hz. A frequência de som audível pelo ser humano varia entre 20 e 20.000 Hz. Abaixo dessa faixa está o

infrassom e acima, o ultrassom. O ultrassom é, portanto, constituído por ondas longitudinais que percorrem o meio, vibrando a matéria e carregando a energia produzida com a colisão das moléculas e partículas e produzindo o calor. As principais propriedades do ultrassom são: (i) propagação através de líquidos, tecidos e sólidos; (ii) diferentes velocidades de propagação, de acordo com o meio, sendo essa característica inerente ao processo de interação das ondas com o meio em particular; (iii) reflexão e refração nas interfaces, onde ocorre uma mudança na densidade; (iv) propagação em um meio (CÁRCEL et al., 2012).

A aplicação do ultrassom na indústria alimentícia pode ser dividida em duas categoriais: (i) baixa intensidade, que requer a aplicação de frequências entre 1 a 10 MHz e potências menores do que 1 W/cm^2 ou de (ii) alta intensidade, que utiliza frequências entre 20-100 MHz e potências altas, entre 10 a 1.000 W.cm^{-2} . O ultrassom de baixa intensidade utiliza níveis de força tão baixos que as ondas ultrassônicas geradas não causam mudanças químicas ou físicas no material. Em contraste, a aplicação do ultrassom de alta intensidade pode provocar certas reações químicas, como a oxidação e causar o rompimento do material (MCCLEMENTS, 1995) levando a um aumento da hidratação da matriz durante a aplicação (TOMA et al., 2001). A variação de pressão (compressão e descompressão) provocada pela propagação das ondas ultrassônicas no meio em estudo, é responsável pelo fenômeno denominado de cavitação, que é definida como a criação e a implosão de microbolhas de gás no centro de um líquido (Figura 4) (BARBOZA; SERRA, 1992). A cavitação pode ocorrer em três fases: (i) formação de núcleos de cavitação (formação de bolhas de ar perto de partículas que contenham superfícies irregulares), (ii) crescimento e (iii) violenta implosão das bolhas (BARBOZA; SERRA, 1992; LUQUE-GARCÍA; LUQUE DE CASTRO, 2003; JYOTI; PANDIT, 2004) cujo processo completo ocorre em torno de $400 \mu\text{s}$ (Figura 4).

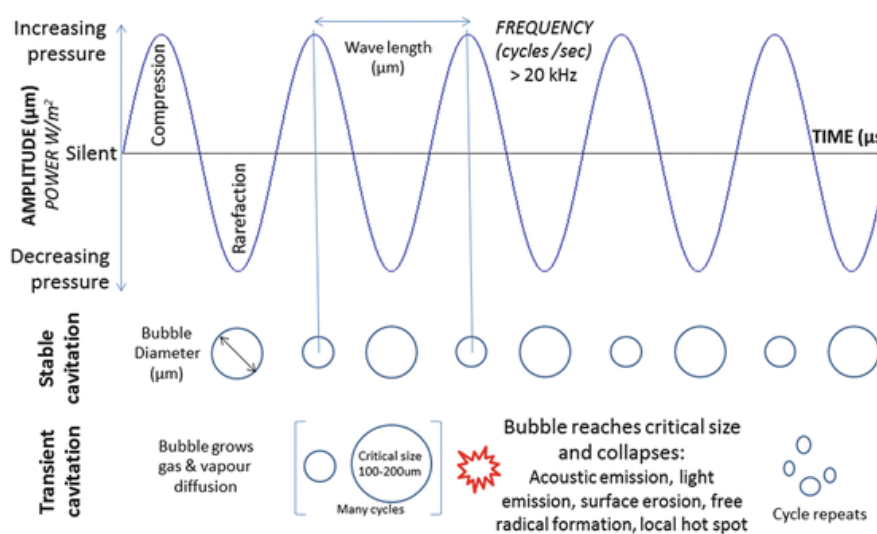
Figura 4 - Fenômeno de cavitação formado pela variação de pressão no interior de um líquido.



Fonte: Adaptado de Bang e Suslick (2010).

Uma vez iniciada a cavitação pela aplicação do ultrassom, dois fenômenos podem ocorrer: (i) a cavitação estável e (ii) a cavitação transitória. A cavitação estável consiste na formação de bolhas que possuem tempo de vida maior (de alguns ciclos) e que oscilam periodicamente (BARBOZA; SERRA, 1992). Há um aumento de volume destas bolhas por penetração do gás dissolvido no meio, quando na fase de descompressão (pressão negativa). A cavitação transitória forma bolhas com um tempo de vida mais curto, de poucos ciclos, e na fase de compressão (quando há pressão positiva) ocorre a implosão, sendo as responsáveis pela cavitação (Figura 5) (BARBOZA; SERRA, 1992; MARTINES; DAVOLOS; JUNIOR, 1999). A sonicação de alta intensidade é a responsável pela produção da cavitação e gera microfluxos nos líquidos, aquecimento e ruptura nos materiais em estado sólido e instabilidade na superfície da interface de sistemas líquido-gás e líquido-líquido (JYOTI; PANDIT, 2004).

Figura 5 – Aplicação do ultrassom e formação da cavitação estável e transitória



Fonte: Price (2017).

O ciclo de compressão gera uma pressão positiva no líquido e empurra as moléculas umas às outras, enquanto que no ciclo de decompressão, gera uma pressão negativa no líquido e promove o afastamento das moléculas. Esta implosão das bolhas, libera a energia concentrada e estocada dentro da bolha em um tempo muito curto (com um aquecimento na taxa de 10^{10} K s^{-1}) e esta liberação de energia cavitacional é considerada localizada (SUSLICK, 1990). O tamanho das bolhas formadas é muito pequeno em relação ao volume total do líquido, assim o aquecimento que estas produzem ao colapsar é rapidamente dissipado a uma velocidade de 10 bilhões de $^{\circ}\text{C s}^{-1}$ (LUQUE-GARCÍA; LUQUE-DE-CASTRO, 2003).

Para que ocorra a cavitação, são importantes a presença de dois elementos: (i) a presença de gás dissolvido (o qual enche as bolhas) e (ii) a presença de partículas em suspensão (importantes no papel da diminuição da coesão molecular) (BARBOZA; SERRA, 1992). Uma grande quantidade de pressão negativa associada ao ciclo de expansão é necessária para superar a resistência de tração do líquido e esta quantidade depende do tipo e da pureza do líquido. Porém, em alguns casos, a quantidade de partículas pequenas presentes no líquido são suficientes para que o processo de cavitação se inicie prontamente mesmo a baixas pressões negativas (SUSLICK, 1989).

Além deste efeito, no momento da implosão das bolhas, devido a alta temperatura e pressão geradas, pode haver a formação de radicais livres na água (BARBOZA; SERRA, 1992; JYOTI; PANDIT, 2004; BANG; SUSLICK, 2010)

formados pela dissociação dos vapores presos nas cavidades (JYOTI; PANDIT, 2004) e também há a ativação das reações químicas (MARTINES; DAVOLOS; JUNIOR, 2000; JYOTI; PANDIT, 2004).

A cavitação em um sistema heterogêneo é muito diferente de um sistema com líquido puro (SUSLICK, 1990). Nos sistemas heterogêneos, a destruição das bolhas se faz de forma assimétrica (na interface sólido-líquido) dando origem a um jato de líquido dirigido para a superfície sólida e que pode causar erosão localizada (SUSLICK, 1990; BARBOZA; SERRA, 1992; ROSTAGNO et al., 2009).

Os principais fenômenos físicos e responsáveis pela eficiência da aplicação da tecnologia de sonificação são: (i) aumento do transporte de massa (os microfluxos de líquidos são formados devido a absorção de grande quantidade de energia vibracional e devido às ondas de choque formadas pelo colapso das bolhas) com consequente aumento na velocidade da reação e mistura da solução; e (ii) produção de ondas de choque (capazes de provocar defeitos e deformações na superfície sólida), com consequente aumento da superfície de contato devido à fragmentação dos sólidos (BARBOZA; SERRA, 1992; ROSTAGNO et al., 2009). Estes efeitos acoplados ao aumento de transferência de massa e ruptura das células, aumentam a liberação de produtos intracelulares de interesse no meio líquido (ROSTAGNO et al., 2009). Assim, o ultrassom tem sido aplicado para aumentar a eficiência de extração de alguns constituintes de interesse na obtenção de um produto contendo compostos bioativos desejáveis.

3.4.1. Efeitos do ultrassom sobre as atividades de enzimas

O efeito do ultrassom sobre a atividade de enzimas tem sido pouco explorado e resultados contraditórios sobre ativação e inativação tem sido relatados (PENA-FARFAL et al., 2005) pois as enzimas apresentam diferentes efeitos mediante a aplicação do ultrassom e a estabilidade destas depende da frequência e intensidade do ultrassom (MANN; KRULL, 2004; LEÃES 2012), tempo de aplicação (ÖZBEK; ÜLGEN, 2000; MANN; KRULL, 2004), amplitude do comprimento de onda (μm) e temperatura do tratamento (ÖZBEK; ÜLGEN, 2000).

O ultrassom pode romper as ligações fracas, tais como as ligações de hidrogênio e interações de Van der Waals e assim, resultar em mudanças conformacionais nas estruturas das proteínas afetando a sua atividade (SUBHEDAR;

GOGATE, 2014). A tolerância das enzimas em relação ao ultrassom depende da sua localização na célula (membrana celular ou no citoplasma), seu peso molecular e sua fonte (ÖZBEK; ÜLGEN, 2000).

Özbek e Ülgen (2000) avaliaram os efeitos das condições de operação do ultrassom de baixa frequência (20 kHz) e intensidades diferentes (11,0 a 62,88 W.cm⁻²) sobre atividades de seis enzimas comerciais (álcool desidrogenase, malato desidrogenase, glicose-6-fosfato desidrogenase, L-lático desidrogenase, fosfatase alcalina e β-galactosidase). Os autores observaram que o aumento da potência do ultrassom, com excessão da enzima fosfatase alcalina (que manteve 100% de sua atividade), todas enzimas apresentaram alguma inativação. O mecanismo de inativação de cada enzima foi diferente e específico para cada uma e demonstraram que os parâmetros operacionais como o tempo de processamento, a potência aplicada e ciclo de onda teve efeito significativo na estabilidade da enzima. Foi observado também que quando a viscosidade da solução aumentou (1 a 6 cps) com adição de glicerol (10, 20, 30, 40 e 50%) houve uma redução na atividade da enzima.

As atividades intracelulares e extracelulares das β-glicosidases de origem microbiana (*Lactobacillus*) foram avaliadas por Ewe et al. (2012a) após tratamentos das células com ultrassom (frequência de 30 KHz e potência de 100 W) à diferentes porcentagens de amplitude total do probe (20, 60 e 100 %) e tempos (1, 2 e 3 min). Foi observado que as atividades das β-glicosidases foram intensificadas com o tratamento de ultrassom das células de *Lactobacillus* (p < 0,05) o que ocasionou um aumento da bioconversão de isoflavonas do extrato aquoso de soja, principalmente as genistina e malonil genistina em genisteínas. Ewe et al. (2012b) avaliaram também as atividades intracelulares e extracelulares das β-glicosidases após submeter ao tratamento com ultrassom (30 KHz, 60 W, 2 min) em uma suspensão de células de *Lactobacillus fermentum* BT8633 e observaram um aumento das atividades específicas das β-glicosidases que favoreceu um aumento da bioconversão das isoflavonas glicosídicas a isoflavonas agliconas durante a fermentação do EAS suplementado com biotina.

Yeo e Liong (2013) ao avaliarem os efeitos do ultrassom (60W, 3min) sobre o crescimento, bioconversão de isoflavonas e propriedades probióticas de *Lactobacillus casei* FTDC 2113, observaram que no EAS ocorreu um aumento significativo no crescimento de células, bem como um aumento na atividade extra e intracelular das β-glicosidases, o que ocasionou um aumento da bioconversão de isoflavonas e das propriedades probióticas das bactérias.

Na avaliação do efeito do ultrassom de baixa frequência (20 kHz) e intensidades que variaram de 2,88 a 23,10 W.cm⁻² em uma solução de celulase (1,0 g/L), Subheder e Gogate (2014) verificaram que o tratamento com 17,33 W.cm⁻² mudou a estrutura molecular da enzima que favoreceu o acesso ao sítio ativo e aumentou a sua atividade em 25 % comparada com a enzima não tratada com ultrassom. Segundo Rokhina, Lens e Virkutyte (2009) quando utilizaram o ultrassom de baixa intensidade e baixa frequência, ocorreu a formação de uma cavitação estável no líquido e, de acordo com Subhedar e Gogate (2014), estas bolhas oscilatórias induzidas pela cavitação estável, mudaram a conformação espacial da enzima e assim aumentou a sua atividade.

3.4.2. Efeitos do ultrassom sobre os compostos fenólicos e isoflavonas

O ultrassom foi descrito como um método rápido e efetivo na extração de compostos fenólicos (TENG; LEE; CHOI, 2014). A cavitação gerada pela sua aplicação resultou em um movimento rápido das moléculas do líquido com consequente penetração do solvente no material. Assim, o uso de ultrassom como uma técnica de extração de compostos bioativos destinados ao consumo humano, reduziu a utilização de solventes tóxicos, o qual é desejável (HE et al., 2016).

Fahmi et al. (2012) avaliaram a extração de daidzina e genistina assistida por ultrassom no homogenato de soja a diferentes frequências (35 e 130 KHz), temperaturas (20 e 40 °C) e tempos (20, 40 e 60 min) de tratamento. Observaram que ambas frequências favoreceram o aumento do conteúdo de isoflavonas totais no EAS. No entanto, o tratamento a 35 KHz (baixa frequência, maior intensidade) resultou em um maior conteúdo de isoflavonas totais (daidzina, genistina, daidzeína e genisteína) no EAS quando comparado com alta frequência (130 KHz, menor intensidade). Estes resultados foram atribuídos a diferença da frequência do ultrassom, que foi inversamente proporcional ao tamanho da bolha. Assim, com o aumento da frequência, a formação das bolhas se tornaram mais difíceis e a zona de cavitação menos violentas. Também foi observado que houve uma relação linear entre aumento da temperatura (20 a 40 °C) e tempo de sonificação (20 a 60 min) com o conteúdo de isoflavonas totais no EAS. O emprego da frequência de 35 KHz e a temperatura de 40 °C aumentou a proporção de isoflavonas agliconas:glicosídicas em 23 e 19 % respectivamente.

Dados limitados estão disponíveis sobre as propriedades físicas e nutricionais dos brotos provenientes da soja e tratada com ultrassom. Yang et al. (2015)

avaliaram os efeitos da aplicação de diferentes níveis de potência do ultrassom (0, 100, 200 e 300 W) em grãos de soja cultivar Dongnong 48 em água (proporção 100 sementes: 160 mL de água) e posteriormente submetidas a germinação a 30 °C por 5 dias na ausência de luz. Foram observados os efeitos do ultrassom sobre as alterações morfológicas, padrões de proteínas, conteúdo de aminoácidos, conteúdo de ácido γ -aminobutírico (GABA), ligação a IgE, atividade isoenzimática da lipoxigenase, inibidor de tripsina e teor de isoflavonas de brotos de soja. Os resultados mostraram que o tratamento com ultrassom aumentou a taxa de germinação, comprimento do broto e teor de GABA dos brotos de soja. Nenhuma mudança significativa foi observada nos padrões de proteína. A atividade de ligação a IgE e lipoxigenase e o teor de inibidor de tripsina dos brotos mostraram uma diminuição dependente do potência do ultrassom depois que as sementes foram expostas aos tratamentos. Quanto às isoflavonas, os conteúdos de daidzina e genistina diminuíram, enquanto os conteúdos de daidzeína e genisteína aumentaram, quando comparados com as amostras não tratadas. O presente trabalho evidenciou que o tratamento com ultrassom ainda nos grãos melhorou a qualidade nutritiva de brotos de soja.

Os efeitos da temperatura (40 a 80 °C), tempo (40 a 80 min), concentração de etanol (30 a 70%) e potência do ultrassom (19,2 a 38,4W/L) na extração de compostos bioativos e para produção de um extrato líquido de alho (*Allium ursinu*) foram descritos por Tomšik et al. (2016) sobre o rendimento de compostos fenólicos totais, flavanóides e atividade antioxidante dos extratos obtidos. Observaram que a temperatura de 80 °C exerceu uma maior influência no aumento do rendimento de compostos fenólicos totais, enquanto que a potência de ultrassom de 28,8 W/L e temperatura de 60 °C exerceram uma interação positiva sobre a atividade antioxidante dos extratos. O aumento do rendimento de compostos fenólicos totais foi atribuído ao efeito múltiplo da temperatura e da potência do ultrassom no processo de transferência de massa, com difusão melhorada dos compostos de interesse, degradação da matriz vegetal e melhoria da penetração do solvente.

A otimização da extração de antocianinas e compostos fenólicos totais de bagaço de mirtilo por meio de extração assistida por ultrassom em diferentes temperaturas (50, 60 e 70 °C), proporções de solvente: sólidos (15, 20 e 25 mg/mL) e tempos de sonicação (15, 25 e 35 min) foi realizada por He et al. (2016). Observaram que nas condição otimizada (61,03 °C, proporção solvente-sólido de 21,70 mL/g e 23,67 min de sonicação), a aplicação do ultrassom resultou em uma recuperação de 2,5

vezes maior de fenólicos totais e de 3,2 vezes maior de antocianinas quando comparado com o método de extração convencional com solventes. A obtenção de maior rendimento de compostos fenólicos totais e antocianinas foi atribuído as ondas do ultrassom que promoveram a penetração de solvente da matriz da amostra e aumentou as taxas de transferência de massa para o solvente de extração.

Há poucos estudos relatando os efeitos do ultrassom na maceração da soja sobre as propriedades físicas e nutritivas dos grãos. Falcão et al. (2018) avaliaram os efeitos da temperatura (35, 45 e 55 °C), tempo (5, 15 e 25 min) e intensidade de ultrassom (6, 15 e 24 W/cm²) no pré-tratamento da soja antes da maceração com reduzido volume de água (1:1,5; soja:água) pela aplicação do delineamento de experimentos Box-Behnken. Observaram que o ultrassom exerceu efeitos significativos sobre o conteúdo das isoflavonas com uma redução das isoflavonas β -glicosídeos daidzina e genistina e aumento do teor das isoflavonas agliconas daidzeína e genisteína. Esta conversão de isoflavonas β -glicosídeos a agliconas foi associada aos efeitos da cavitação, no qual a ruptura das bolhas, consequência final da cavitação, gerou ondas de choque que podem ter facilitado a hidrólise da ligação éter dos β -glicosídeos das isoflavonas, produzindo agliconas como produto final, tornando a soja pré-tratada com ultrassom um melhor insumo para a indústria alimentícia. As melhores condições estabelecidas para o pré-tratamento da soja com ultrassom na obtenção de grãos com maior teor de agliconas e manutenção da atividade da β -glicosidase o mais alto possível, foram estabelecidas a 55 °C, 5 min e 19,5W/cm². Além disso, o pré-tratamento da soja com ultrassom resultou em reduzido tempo de maceração (2 h) para atingir o maior teor de umidade, menor dureza e maior conteúdo de agliconas, sendo este pré-tratamento recomendado antes dos processos subsequentes da soja para a obtenção de maior teor de isoflavonas agliconas sem reduzir a absorção de água e dureza dos grãos.

Portanto, com base nesta breve revisão bibliográfica, observou-se que o ultrassom exerceu efeitos significativos na extração dos compostos bioativos de diferentes matrizes.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, C. L.; SUZUKI, C. N.; PAREDES-GUZMÁN, J. F.; ALENCAR, S. M.; PARK, Y. K. Transformación de las β -glicosil isoflavonas por Fermentación semi-sólida de harina de soja con *Aspergillus oryzae*. **Ciencia y Tecnología Alimentaria**, v. 4, n. 2, p. 115–121, 2003.
- AMARAL, C.; TOLOI, M. R. T.; VASCONCELOS, L. D.; FONSECA, M. J. V.; CORREIA-DA-SILVA, G.; TEIXEIRA, N. The role of soybean extracts and isoflavones in hormone-dependent breast cancer: Aromatase activity and biological effects. **Food and Function**, v. 8, n. 9, p. 3064–3074, 2017.
- ANDRADE, J. C.; MANDARINO, J. M.G.; KUROZAWA, L. E.; IDA, E. I. The effect of thermal treatment of whole soybean flour on the conversion of isoflavones and inactivation of trypsin inhibitors. **Food Chemistry**, v. 194, p. 1095–1101, 2016.
- AZMIR, J.; ZAIDUL, I. S. M.; RAHMAN, M. M.; SHARIF, K. M.; MOHAMED, A.; SAHENA, F.; JAHURUL, M. H. A.; GHAFUOR, K.; NORULAINI, N. A. N.; OMAR, A. K. M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials : A review. **Journal of Food Engineering journal**, v. 117, p. 426–436, 2013.
- BANG, J.H. AND SUSLICK, K.S. Applications of Ultrasound to the Synthesis of Nanostructured Materials. **Advanced Materials**, v. 22, p. 1039-1059, 2010.
- BAÚ, T. R.; IDA, E. I. Soymilk processing with higher isoflavone aglycone content. **Food Chemistry**, v. 183, p. 161–168, 2015.
- BARBOZA, J. C. S.; SERRA, A. A. Ultra-som: Influência do ultra-som na química. **Química Nova**, v. 15, n. 4, 1992.
- BENASSI, V. T.; PRUDENCIO, S. H. Impactos do processamento de soja na retenção de minerais, isoflavonas e proteínas em tofus. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 24, n. 1, p. 51–59, 2013.
- BENVENUTO, M.; MATTERA, R.; TAFFERA, G.; GIGANTI, M. G.; LIDO, P.; MASUELLI, L.; MODESTI, A.; BEI, R. The Potential Protective Effects of Polyphenols in Asbestos-Mediated Inflammation and Carcinogenesis of Mesothelium. **Nutrients**, v. 8, n. 5, p. 275–298, 2016.
- BONATO, E. R.; BONATO, A. L. V. **A soja no Brasil: História e Estatística**. Londrina, EMBRAPA-CNPSO, 1987. 61p.
- BORDINGNON, J.R.; MANDARINO, J.M.G. **Soja: composição química, valor nutricional e sabor**. Londrina: EMBRAPA CNPSO, 1994. 32p.
- BRASIL. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 11, DE 15 DE MAIO DE 2007. Estabelece o regulamento técnico da soja. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. 2007.

BORGES, C. W. C.; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; MANDARINO, J.M. G.; DA SILVA, J. B.; BENEDETTI, S.; IDA, E. I. Contents and bioconversion of β - glycoside isoflavones to aglycones in the processing conditions of soybean tempeh. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 51, n. 3, p. 271–279, 2016.

CÁRCEL, J. A.; GARCÍA-PÉREZ, J. V.; BENEDITO, J.; MULET, A. Food process innovation through new technologies: Use of ultrasound. **Journal of Food Engineering**, v. 110, n. 2, p. 200–207, 2012.

CARRÃO-PANIZZI, M. C.; SIMÃO, A. S.; KIKUCHI, A. Efeitos de genótipos, ambientes e de tratamentos hidrotérmicos na concentração de isoflavonas agliconas em grãos de soja. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 38, n. 8, p. 897–902, 2003.

CHEN, K. I.; ERH, M. H.; SU, N. W.; LIU, W. H.; CHOU, C. C.; CHENG, K. CH. Soyfoods and soybean products: From traditional use to modern applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, n. 1, p. 9–22, 2012.

CIABOTTI, S.; SILVA, A. C. B. B.; JUHASZ, A. C. P.; MENDONÇA, C. D.; TAVANO, O. L.; MANDARINO, J. M. G.; GONÇALVES, C. A. A. Chemical composition, protein profile, and isoflavones content in soybean genotypes with different seed coat colors. **International Food Research Journal**, v. 23, n. 2, p. 621–629, 2016.

COSTA, G. R.; OLIVEIRA, N.; MANDARINO, J. M. G.; LEITE, R. S.; GUIMARÃES, N. C. C.; JUNQUEIRA, R. G.; LABANCA, R. A. Isoflavone and Mineral Content in Conventional and Transgenic Soybean Cultivars. **American Journal of Plant Sciences**, v. 6, n. August, p. 2051–2059, 2015.

DA SILVA, B.; KUPSKI, L.; BADIALE-FURLONG, E. Central Composite Design-Desirability Function Approach for Optimum Ultrasound-Assisted Extraction of Daidzein and Genistein from Soybean and Their Antimycotoxigenic Potential. **Food Analytical Methods**, n. September, 2018.

DA SILVA, L. H.; CELEGHINI, R. M. S.; CHANG, Y. K. Effect of the fermentation of whole soybean flour on the conversion of isoflavones from glycosides to aglycones. **Food Chemistry**, v. 128, n. 3, p. 640–644, 2011.

EMBRAPA. **Soja em números**. 2018. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/en/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>>. Acesso em 20 jan 2019.

EMBRAPA. **Soja na alimentação**. 2018b. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/en/soja/alimentacao/composicaodasoja>>. Acesso em 01 fev 2019.

EWE, J.-A.; WAN ABDULLAH, W.-N.; BHAT, R.; KARIM, A. A.; LIONG, M.-T. Enhanced growth of lactobacilli and bioconversion of isoflavones in biotin-supplemented soymilk upon ultrasound-treatment. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.19, p.160–173, 2012.

EWE, J.-A.; WAN ABDULLAH, W.-N.; KARIM, A. A.; LIONG, M.-T. Effects of ultrasound on growth, bioconversion of isoflavones and probiotic properties of parent

and subsequent passages of *Lactobacillus fermentum* BT 8633 in biotin-supplemented soymilk. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.19, p.890–900, 2012.

FAHMI, R.; KHODAIYAN, F.; POURAHMAD, R.; EMAM-D-JOMEH. Effect of ultrasound assisted extraction upon the Genistin and Daidzin contents of resultant soymilk. **Journal of Food Science and Technology**, p. 6–10, 2012.

FALCÃO, H. G. HANDA, C. L.; SILVA, M. B. R.; DE CAMARGO, A. C.; SHAHIDI, F.; KUROZAWA, L. E.; IDA, E. I. Soybean ultrasound pre-treatment prior to soaking affects β -glucosidase activity, isoflavone profile and soaking time. **Food Chemistry**, v. 269, n. April, p. 404–412, 2018.

FERNANDES, M. S.; LIMA, F. S.; RODRIGUES, D.; HANDA, C. L.; GUELFY, M.; GARCIA, S.; IDA, E. I. Evaluation of the isoflavone and total phenolic contents of kefir-fermented soymilk storage and after the in vitro digestive system simulation. **Food CHEMISTRY**, V. 229, P. 373–380, 2017.

GANAI, A. A.; KHAN, A. A.; MALIK, Z. A.; FAROOQI, H. Genistein modulates the expression of NF- κ B and MAPK (p-38 and ERK1/2), thereby attenuating d-Galactosamine induced fulminant hepatic failure in Wistar rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 283, n. 2, p. 139–146, 2015.

GANAI, A. A.; HUSAIN, M. Genistein Alleviates Neuroinflammation and Restores Cognitive Function in Rat Model of Hepatic Encephalopathy : Underlying Mechanisms. **Molecular Neurobiology**, n. February, 2017.

GÓES-FAVONI, S. P.; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; BELEIA, A. Changes of isoflavone in soybean cotyledons soaked in different volumes of water. **Food Chemistry**, v. 119, n. 4, p. 1605–1612, 2010.

GRÜN, I. U.; ADHIKARI, K.; LI, C.; LI, Y.; LIN, B.; ZHANG, J.; FERNANDO, L. N. Changes in the Profile of Genistein , Daidzein , and Their Conjugates during Thermal Processing of Tofu †. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 2839–2843, 2001.

HAN, S.; WU, H.; LI, W. Protective effects of genistein in homocysteine-induced endothelial cell inflammatory injury. **Molecular and Cellular Biochemistry**, n. January, 2015.

HANDA, C. L. COUTO, U. R.; VICENSOTI, A. H.; GEORGETTI, S. R.; IDA, E. I. Optimisation of soy flour fermentation parameters to produce β -glucosidase for bioconversion into aglycones. **Food Chemistry**, v. 152, p. 56–65, 2014.

HE, B.; ZHANG, L.-L.; YUE, X.-Y.; LIANG, J.; JIANG, J.; GAO, X.-L.; YUE, P.-X. Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium ashei*) wine pomace. **Food Chemistry**, v. 204, p. 70–76, 2016.

HE, F.; CHEN, J. Consumption of soybean , soy foods , soy isoflavones and breast cancer incidence: Differences between Chinese women and women in Western countries and possible mechanisms. **Food Science and human Wellness**, v. 2, p. 146–161, 2013.

HSIAO, Y.; HSIEH, J. The conversion and deglycosylation of iso flavones and anthocyanins in black soymilk process. **Food Chemistry**, v. 261, n. April, p. 8–14, 2018.

JAMBRAK, A. R.; LELAS, V.; MASON, T. J.; KREŠIĆ, G.; BADANJAK, M. Physical properties of ultrasound treated soy proteins. **Journal of Food Engineering**, v. 93, n. 4, p. 386–393, 2009.

JYOTI, K. K.; PANDIT, A. B. Ozone and cavitation for water disinfection. **Biochemical Engineering Journal**, v. 18, n. 1, p. 9–19, 2004.

KRISHNAN, V.; GOTHWAL, S.; DAHUJA, A.; VINUTHA, T.; SINGH, B.; JOLLY, M.; PRAVEEN, S.; SACHDEV, A. Enhanced nutraceutical potential of gamma irradiated black soybean extracts. **Food Chemistry**, v. 245, n. April 2017, p. 246–253, 2018.

KUDOU, S.; FLEURY, Y.; WELTI, D.; MAGNOLATO, D.; UCHIDA, T.; KITAMURA, K.; OKUBO, K. Malonyl Isoflavone Glycosides in Soybean Seeds (Glycine Max MERRILL). **Journal of Agricultural and Biological Chemistry**, v. 55, n. 9, p. 2227–2233.

LANTE, A.; BARION, G.; ZANNONI, S.; RITA, M.; TINELLO, F.; DAL, C.; MOSCA, G. An ecofriendly procedure to extract iso flavones from soybean seeds. **Journal of Cleaner Production**, v. 170, p. 1102–1110, 2018.

LARKIN, T.; PRICE, W. E.; ASTHEIMER, L. E. E. The key importance of soy isoflavone bioavailability to understanding health benefits. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 552, p. 538–552, 2008.

LEE, M. J.; CHUNG, I. M.; KIM, H.; JUNG, M. Y. High resolution LC-ESI-TOF-mass spectrometry method for fast separation, identification, and quantification of 12 isoflavones in soybeans and soybean products. **Food Chemistry**, v. 176, p. 254–262, 2015.

LIMA, F. S. DE; IDA, E. I. Optimisation of soybean hydrothermal treatment for the conversion of β -glucoside isoflavones to aglycones. **LWT - Food Science and Technology**, v. 56, p. 232–239, 2014.

LIMA, F. S.; KUROZAWA, L. E.; IDA, E. I. The effects of soybean soaking on grain properties and isoflavones loss. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, p. 1274–1282, 2014.

LIU, K. Chemistry and Nutritional Value of Soybean Components. In: **Soybeans**. Springer, Boston, MA. 1997.

LUQUE-GARCÍA, J. L.; LUQUE DE CASTRO, M. D. Ultrasound: a powerful tool for leaching. **Trends in Analytical Chemistry**, Vol. 22, No. 1, 2003.

MA, M.; WANG, P.; YANG, R.; ZHOU, T.; GU, Z. UV-B mediates isoflavone accumulation and oxidative-antioxidant system responses in germinating soybean. **Food Chemistry**, v. 275, n. July 2018, p. 628–636, 2019.

- MANN, T. L.; KRULL, U. J. The application of ultrasound as a rapid method to provide DNA fragments suitable for detection by DNA biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 20, p. 945–955, 2004.
- MAITAN-ALFENAS, G. P.; LAGE, L. G.; DE ALMEIDA, M. N.; VISSER, E. M.; DE REZENDE, S. T.; GUIMARÃES, V. M. Hydrolysis of soybean isoflavones by *Debaryomyces hansenii* UFV-1 immobilised cells and free β -glucosidase. **Food Chemistry**, v. 146, p. 429–436, 2014.
- MARTINES, M. A. U.; DAVOLOS, M. R.; JÚNIOR, M. J. O efeito do ultra-som em reações químicas. **Química nova**, v. 23, n. 2, 2000.
- MCCLEMENTS, D. J. Advances in the application of ultrasound in food analysis and processing. **Trends in Food Science & Technology**, v. 61, n. Sep., 1995.
- MEDIC, J.; ATKINSON, C.; HURBURGH, C. R. Current knowledge in soybean composition. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 91, p. 363–384, 2014.
- MESSINA, M. Soy and Health Update : Evaluation of the Clinical and Epidemiologic Literature. **Nutrients**, v. 8, p. 754, 2016.
- MULITERNO, M. M.; RODRIGUES, D.; LIMA, F. S.; IDA, E. I. KUROZAWA, L. E. Conversion / degradation of iso flavones and color alterations during the drying of okara. **LWT - Food Science and Technology**, v. 75, p. 512–519, 2017.
- NIJVELDT, R. J.; VAN NOOD, E. L. S.; VAN HOORN, D. E.; BOELEN, P. G.; VAN NORREN, K.; VAN LEEUWEN, P. A. Flavonoids : a review of probable mechanisms of action and potential applications. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 74, p. 418–425, 2001.
- NIPORNRAM, S.; TOCHAMPA, W.; RATTANATRAIWONG, P. Optimization of low power ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from mandarin (*Citrus reticulata* Blanco cv. Sainampung) peel. **Food Chemistry**, v. 241, n. August 2017, p. 338–345, 2018.
- NISHINARI, K.; FANG, Y.; GUO, S.; PHILLIPS, G. O. Soy proteins: A review on composition, aggregation and emulsification. **Food Hydrocolloids**, v. 39, p. 301–318, 2014.
- ÖZBEK, B.; ÜLGEN, K. O. The stability of enzymes after sonication. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 9, p. 1037–1043, 2000.
- PAN, M.; LAI, C.; HO, C. Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids. **Food & Function**, v. 1, p. 15–31, 2010.
- PARK, Y. K.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; SCAMPARINI, A. R. P. Biotransformação de isoflavonas de soja. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 20, n. maio/junho, 2001a.
- PAUCAR-MENACHO, L. M.; BERHOW, M. A.; MANDARINO, J. M. G.; MEJIA, E. G.; CHANG, Y. K. Optimisation of germination time and temperature on the

concentration of bioactive compounds in Brazilian soybean cultivar BRS 133 using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 119, n. 2, p. 636–642, 2010.

PENA-FARFAL, C.; MOREDA-PINEIRO, A.; BERMEJO-BARRERA, A.; BERMEJO-BARRERA, P.; PINOCHET-CANCINO, H.; GREGORI-HENRIQUEZ, I. Speeding up enzymatic hydrolysis procedures for the multi-element determination in edible seaweed. **Analytica Chimica Acta**, v. 548, p. 183–191, 2005.

PEREZ-VIZCAINO, F.; DUARTE, J. Molecular Aspects of Medicine Flavonols and cardiovascular disease. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 31, p. 478–494, 2010.

PERVIN, M.; UNNO, K.; NAKAYAMA, Y.; IKEMOTO, H.; IMAI, S.; IGUCHI, K.; MINAMI, A.; KIMURA, Y.; NAKAMURA, Y. Improvement in cognitive function with green soybean extract may be caused by increased neuritegenesis and BDNF expression. **Journal of Food Processing and Technology**, v. 8, n. 10, 2017.

QUINHONE JÚNIOR, A.; IDA, E. I. Profile of the contents of different forms of soybean isoflavones and the effect of germination time on these compounds and the physical parameters in soybean sprouts. **Food Chemistry**, v. 166, p. 173–178, 2015.

ROKHINA, E. V.; LENS, P.; VIRKUTYTE, J. Low-frequency ultrasound in biotechnology: state of the art. **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 5, p. 298–306, 2009.

ROSTAGNO, M. A.; VILLARES, A.; GUILLAMÓN, E.; GARCÍA-LAFUENTE, A.; MARTÍNEZ, J. A. Sample preparation for the analysis of isoflavones from soybeans and soy foods. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 1, p. 2–29, 2009.

SEIBEL, N. F (Org.). **Soja: cultivo, benefícios e processamento**. Curitiba: CRV, 2018. 150p.

SETCHELL, K. D. R.; BROWN, N. M.; DESAI, P.; ZIMMER-NECHEMIAS, L.; WOLFE, B. E.; BRASHEAR, W.T.; KIRSCHNER, A. S.; CASSIDY, A.; HEUBI, J. E. Bioavailability of Nutrients and Other Bioactive Components from Dietary Supplements Bioavailability of Pure Isoflavones in Healthy Humans and Analysis of Commercial Soy Isoflavone Supplements 1 , 2. **Journal of nutrition**, p. 1362–1375, 2001.

SHAHIDI, F.; YEO, J. Insoluble-Bound Phenolics in Food. **Molecules**, v. 21, p. 1–22, 2016.

SITI, H. N.; KAMISAH, Y.; KAMSIAH, J. The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). **Vascular Pharmacology**, v. 71, p. 40–56, 2015.

SUBHEDAR, P. B.; GOGATE, P. R. Enhancing the activity of cellulase enzyme using ultrasonic irradiations. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 101, p. 108–114, 2014.

SUSLICK, K. S. The Chemical Effects of Ultrasound. **Scientific American**, v. Feb., 1989.

SZABÓ, O. E.; CSISZÁR, E. The effect of low-frequency ultrasound on the activity

and efficiency of a commercial cellulase enzyme. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, n. 2, p. 1483–1489, 2013.

SZYMCZAK, G.; WÓJCIAK-KOSIOR, M.; SOWA, I.; ZAPAŁA, K.; STRZEMSKI, M.; KOCJAN, R. Evaluation of isoflavone content and antioxidant activity of selected soy taxa. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 57, p. 40–48, 2017.

TANAKA, K.; OHGO, Y.; KATAYANAGI, Y.; YASUI, K.; HIRAMOTO, S.; IKEMOTO, H.; NAKATA, Y.; MIYOSHI, N.; ISEMURA, M.; OHASHI, N.; IMAI, S. Anti-inflammatory effects of green soybean extract irradiated with visible light. **Scientific Reports**, p. 1–7, 2014.

TENG, H.; LEE, W. Y.; CHOI, Y. H. Optimization of Ultrasonic-Assisted Extraction of Polyphenols, Anthocyanins, and Antioxidants from Raspberry (*Rubus coreanus* Miq.) Using Response Surface Methodology. **Food Analytical Methods**, v. 7, n. 7, p. 1536–1545, 2014.

TIE, L.; AN, Y.; HAN, J.; XIAO, Y.; XIAOKAITI, Y.; FAN, S.; LIU, S.; CHEN, A. F.; LI, X. Genistein accelerates refractory wound healing by suppressing superoxide and FoxO1 / iNOS pathway in type 1 diabetes ☆. **Journal of Nutrition Biochemistry**, v. 24, p. 88–96, 2013.

TODA, T.; SAKAMOTO, A.; TAKAYANAGI, T.; YOKOTSUKA, K. Changes in Isoflavone Compositions of Soybean during Soaking in Water. **Food Science and Technology Research**, v. 7, n. 2, p. 171–175, 2001.

TOMŠIK, A.; PAVLIĆ, B.; VLADIĆ, J.; RAMIĆ, M.; BRINDZA, J.; VIDOVIĆ, S. Optimization of ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from wild garlic (*Allium ursinum* L.). **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 29, p. 502–511, 2016.

USDA. 2018. **Soybean Production**. Disponível em: <<https://www.nass.usda.gov/Newsroom/2019/02-08-2019.php>>. Acesso em 20 jan 2019.

VILLARES, A.; ROSTAGNO, M. A.; GARCÍA-LAFUENTE, A.; GUILLAMÓN, E.; MARTÍNEZ, J. A. Content and Profile of Isoflavones in Soy-Based Foods as a Function of the Production Process. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, n. 1, p. 27–38, 2011.

WADA, K.; NAKAMURA, K.; TAMAI, Y.; TSUJI, M.; KAWACHI, T.; HORI, A.; TAKEYAMA, N. Soy isoflavone intake and breast cancer risk in Japan: From the Takayama study. **International Journal of Cancer**, v. 133, p. 952–960, 2013.

WARDHANI, D. H.; VÁZQUEZ, J. A.; PANDIELLA, S. S. Kinetics of daidzin and genistin transformations and water absorption during soybean soaking at different temperatures. **Food Chemistry**, v. 111, n. 1, p. 13–19, 2008.

XIAO, G.; GONG, J.; GE, Q.; YOU, Y. Effect of vacuum soaking on the properties of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). **International Journal of Food Engineering**, v. 11, n. 1, p. 151–155, 2015.

XYNOS, N.; PAPAESTATHIOU, G.; PSYCHIS, M.; ARGYROPOULOU, A.; ALIGIANNIS, N.; SKALTSOUNIS, A. L. Development of a green extraction procedure with super/subcritical fluids to produce extracts enriched in oleuropein from olive leaves. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 67, p. 89–93, 2012.

YANG, C. S.; HO, C.-T.; ZHANG, J.; WAN, X.; ZHANG, K.; LIM, J. Antioxidants: Differing Meanings in Food Science and Health Science. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, p. 3063–3068, 2018.

YANG, H.; GAO, J.; YANG, A.; CHEN, H. The ultrasound-treated soybean seeds improve edibility and nutritional quality of soybean sprouts. **Food Research International**, v. 77, p. 704–710, 2015.

YEO, S. K.; LIONG, M. T. Effect of ultrasound on bioconversion of isoflavones and probiotic properties of parent organisms and subsequent passages of *Lactobacillus*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 51, n. 1, p. 289–295, 2013.

YOSHIARA, L. Y.; MADEIRA, T. B.; DELAROZA, F.; DA SILVA, J. B.; IDA, E. I. Optimization of soy isoflavone extraction with different solvents using the simplex-centroid mixture design. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 63, n. 8, p. 978–986, 2012.

YOSHIARA, L. Y.; MANDARINO, J. M. G.; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; MADEIRA, T. B.; DA SILVA, J. B.; DE CAMARGO, A. C.; SHAHIDID, F.; IDA, E. I. Germination changes the isoflavone profile and increases the antioxidant potential of soybean. **Journal of Food Bioactives**, p. 1–7, 2018a.

YOSHIARA, L. Y.; MADEIRA, T. B.; DE CAMARGO, A. C.; FERREIDON SHAHIDI; IDA, E. I. Multistep Optimization of β -Glucosidase Extraction from Germinated Soybeans (*Glycine max* L . Merrill). **Foods**, v. 7, n. 110, p. 2–13, 2018b.

YU, J.; BI, X.; YU, B.; CHEN, D. Isoflavones: Anti-inflammatory benefit and possible caveats. **Nutrients**, v. 8, n. 6, p. 1–16, 2016.

YU, Z. L.; ZENG, W. C.; ZHANG, W. H.; LIAO, X. P.; SHI, B. Effect of ultrasound on the activity and conformation of α -amylase, papain and pepsin. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 21, n. 3, p. 930–936, 2014.

ZHANG, H.; TSAO, R. ScienceDirect Dietary polyphenols , oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. **Current Opinion in Food Science**, v. 8, n. 33, p. 33–42, 2016a.

ZHANG, H.; TSAO, R. Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. **Current Opinion in Food Science**, v. 8, p. 33–42, 2016b.

ZIEGLER, V.; FERREIRA, C. D.; HOFFMANN, J. F.; DE OLIVEIRA, M.; ELIAS, M. C. Effects of moisture and temperature during grain storage on the functional properties and isoflavone profile of soy protein concentrate. **Food Chemistry**, v. 242, n. June 2017, p. 37–44, 2018.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este item **4 MATERIAL E MÉTODOS** foi contemplado com as redações dos dois artigos científicos abaixo relacionados e estão apresentados no item **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**.

ARTIGO CIENTÍFICO 1 (Publicado)

FALCÃO, H. G.; HANDA, C. L.; SILVA, M. B. R.; DE CAMARGO, A. C.; SHAHIDI, F.; KUROZAWA, L. E.; IDA, E. I. Soybean ultrasound pre-treatment prior to soaking affects β -glucosidase activity, isoflavone profile and soaking time. **Food Chemistry**, v. 269, n. April, p. 404–412. 2018.

ARTIGO CIENTÍFICO 2 (Submetido em Março de 2019 para Food Chemistry)

FALCÃO, H. G.; SILVA, M. B. R.; DE CAMARGO, A. C.; SHAHIDI, F.; FRANCHIN, M.; ROSALEN, P. L.; ALENCAR, S. M.; KUROZAWA, L. E.; IDA, E. I. Ultrasound soybean pre-treatment in maceration increases the content of isoflavones as aglycones, total phenolics, antioxidant potential and anti-inflammatory activities.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este item **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO** foi contemplado com as redações dos dois artigos científicos abaixo relacionados .

ARTIGO CIENTÍFICO 1 (Publicado)

FALCÃO, H. G.; HANDA, C. L.; SILVA, M. B. R.; DE CAMARGO, A. C.; SHAHIDI, F.; KUROZAWA, L. E.; IDA, E. I. Soybean ultrasound pre-treatment prior to soaking affects β -glucosidase activity, isoflavone profile and soaking time. **Food Chemistry**, v. 269, n. April, p. 404–412. 2018.

ARTIGO CIENTÍFICO 2 (Submetido em Março de 2019 para Food Chemistry)

FALCÃO, H. G.; SILVA, M. B. R.; DE CAMARGO, A. C.; SHAHIDI, F.; FRANCHIN, M.; ROSALEN, P. L.; ALENCAR, S. M.; KUROZAWA, L. E.; IDA, E. I. Ultrasound soybean pre-treatment in maceration increases the content of isoflavones as aglycones, total phenolics, antioxidant potential and anti-inflammatory activities.

1 5.1 ARTIGO CIENTÍFICO 1

2

3 **Soybean ultrasound pre-treatment prior to soaking affects β -glucosidase activity,**
4 **isoflavone profile and soaking time**

5 Heloisa Gabriel Falcão^a; Cíntia Ladeira Handa^a; Mariah Benine Ramos Silva^a; Adriano Costa
6 de Camargo^{a,b}; Fereidoon Shahidi^b; Louise Emy Kurozawa^c; Elza Iouko Ida^{a*}

7 **Affiliations:**

8 ^aLondrina State University, Department of Food Science and Technology, 86051-990
9 Londrina, Parana State, Brazil

10 ^bDepartment of Biochemistry, Memorial University of Newfoundland, St. John's, NL A1B
11 3X9, Canada

12 ^cDepartment of Food Engineering, School of Food Engineering, University of Campinas,
13 Campinas, SP, Brazil

14 * Author to whom correspondence should be addressed; E-mail: elida@uel.br

15 **Abstract**

16 Ultrasound may convert conjugated isoflavones into their corresponding aglycones, the best
17 form for absorption in the human body. However, ultrasound may also influence the activity
18 of endogenous β -glucosidase. Therefore, the present work evaluated the effects of soybean
19 ultrasound pre-treatment by applying the Box-Behnken design prior to soaking, a step that is
20 important for industries to prepare certain soy products. Furthermore, a multi-response
21 optimisation is provided. The best conditions for soybean ultrasound pre-treatment were
22 established as temperature, $X_1 = 55^\circ\text{C}$; exposure time, $X_2 = 5$ min and ultrasound intensity, X_3
23 $= 19.5 \text{ W.cm}^{-2}$. Under these conditions, soybeans with higher contents of aglycones were
24 obtained and kept β -glucosidase activity as high as possible. A second experiment was
25 conducted and confirm that ultrasound pre-treatment results in a lower soaking time (2h) to
26 achieve the highest moisture content, lower hardness as well as increased content of
27 aglycones.

28 **Keywords:** sonication; hydrothermal processing; soybean enzymes; flavonoids; texture;
29 moisture; optimization;

30

31 **Chemical compounds studied in this article:** Daidzein (PubChem CID: 5281708), Daidzin
32 (PubChem CID: 107971), 6''-O-Acetyldaidzin (PubChem CID: 156155), 6''-O-
33 Malonyldaidzin (PubChem CID: 9913968), Genistein (PubChem CID: 5280961), Genistin
34 (PubChem CID: 5281377), 6''-O-Acetylgenistin (PubChem CID: 5315831), 6''-O-
35 Malonylgenistin (PubChem CID: 53398685), Glycitein (PubChem CID: 5317750), Glycitin
36 (PubChem CID: 187808), 6''-O-Acetylglycitin (PubChem CID: 10228095), 6''-O-
37 Malonylglycitin (PubChem CID: 23724657).

38 **Introduction**

39 Soybean isoflavones have been widely studied because of their potential health benefits.
40 Isoflavone intake has been linked to a lower incidence of certain types of cancer and
41 osteoporosis. These flavonoids have also been found to act as antioxidants and anti-
42 inflammatory compounds (Rostagno, Villares, Guillamón, García-Lafuente, & Martínez,
43 2009; Villares, Rostagno, García-Lafuente, Guillamón & Martínez, 2011). A human trial
44 conducted by Ye et al. (2012), demonstrated that bioactive compounds from soy germ also
45 alleviate menopausal symptoms. There are several pieces of evidence demonstrating that
46 isoflavones are not well absorbed in their conjugated forms (Larkin, Price, & Astheimer,
47 2008; Rowland, Faughnan, Hoey, Wähälä, Williamson, & Cassidy, 2003). Thus, to be
48 bioaccessible, soybean isoflavones must be hydrolyzed into their corresponding aglycones
49 (Larkin, Price, & Astheimer, 2008). Accordingly, procurement of soybean products with
50 greater content of aglycone isoflavones is desirable.

51 The presence and the concentration of different forms of isoflavones in soybeans may vary
52 among different cultivars. In addition, further processing to obtain different soybean
53 products may also change both their identities and quantities (Wang & Murphy, 1994).
54 Soybean isoflavones exist in four different groups as aglycones (genistein, daidzein, and
55 glycitein), β -glucosides (genistin, daidzin, and glycitin), acetylglucosides (acetylgenistin,
56 acetyldaidzin, and acetylglycitin), and malonylglucosides (malonylgenistin,
57 malonyldaidzin, and malonylglycitin). Therefore, there are twelve forms of isoflavones in
58 soybeans. Isoflavones in the β -glucoside form may be converted to aglycones during
59 processing (Fernandez-Lopez, Lamothe, Delamplé, Denayrolles, & Bennetau-Pelissero,
60 2016) or by hydrolysis via the action endogenous β -glucosidases (Lima & Ida, 2014).

61 Soaking of soybean is an important pre-treatment to obtain several products such
62 as soymilk, kefir-fermented soymilk, yogurt, germinated soybean, tofu, and tempeh, among
63 others. Soaking of soybeans improves the softness of the product due to water absorption,
64 thus facilitating further processing. Furthermore, Lima, Kurozawa, and Ida (2014)
65 demonstrated that soybean soaking (especially at 55°C) may enhance the conversion of
66 conjugated isoflavones to their aglycone forms due to the action of their endogenous β -
67 glucosidases.

68 Consumers are looking for high-quality products which have been driving the industry to
69 search for safer and effective processing methods. Ultrasound, an emergent technology, has
70 been considered safe, non-toxic, and environmentally friendly (Yang, Gao, Yang, & Chen,
71 2015). The process brings about the application of high-frequency sound generated energy
72 (Yeo & Liong, 2013). Cavitation bubbles are generated due to pressure changes caused
73 when high power ultrasound propagates in a liquid. The violent collapse of these
74 microbubbles generates high pressure and temperature regions. The level of energy
75 transmitted to the medium is expressed as ultrasound power (W), ultrasound intensity
76 ($\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$), or acoustic energy density ($\text{W}\cdot\text{mL}^{-1}$) (O'Donnell, Tiwari, Bourke, & Cullen,
77 2010). Ultrasound application may influence chemical, physical, and biological aspects of
78 food. Therefore, its application may have specific benefits depending on each application
79 (Rokhina, Lens, & Virkutyte, 2009).

80 Ultrasound has been applied to different food products to uniform heat transfer during
81 cooking and increase mass transfer. It has also been applied during freezing and drying as
82 well as to generate emulsions (Chemat, Huma & Khan, 2011). Furthermore, ultrasound
83 application may enhance the germination rate of soybeans. Additionally, both physical and
84 nutritional properties of germinated soybeans were improved compared to their
85 ungerminated counterparts (Yang, Gao, Yang, & Chen, 2015). Furthermore, ultrasound-

86 assisted extraction of phenolic compounds from plant foods has been reported (Nipornram,
87 Tochampa, Rattanatraiwong, & Singanusong, 2018); since food phenolics may be linked to
88 the cell wall materials (Shahidi & Yeo, 2016), ultrasound-assisted extraction may actually
89 affect the release of insoluble-bound fraction of these bioactive phenolics. Furthermore, due
90 to the influence of several ultrasound parameters (e.g. frequency, intensity, and time of
91 application) (Subhedar & Gogate, 2014; Szabó & Csiszár, 2013), a detailed study about
92 their effects on the activity of endogenous enzymes is required.

93 Cavitation, a consequence of the ultrasound, may influence endogenous enzymatic activity
94 via different mechanisms, which may occur at the same time as well as separately.
95 Delgado-Povedano and Luque de Castro (2015) summarized the mechanisms involved as
96 follows: (a) thermal effects due to high temperatures generated in cavitation microzones;
97 (b) free radical effects generated due to hydrolysis of water and/or any other solvent
98 system, and (c) mechanical effects created by microstreaming and shock.

99 The application of different ultrasound parameters (e.g. temperature, time of application
100 and ultrasound intensity) may influence the obtaining of soybeans and other raw materials.
101 So, in order to evaluate the behavior of the response function and to obtain conditions in
102 which the procedure applied gives the best possible response (Bezerra, Santhelli, Oliveira,
103 Villar, & Escaleira, 2008), the application of the response surface methodology (RSM) to
104 the optimization of the extraction of bioactive compounds in these plant materials is
105 important.

106 Therefore, considering that soybean treatment with ultrasound prior hydration can enhance
107 the conversion of conjugated isoflavones into their aglycone forms, and to influence the
108 activity of endogenous β -glucosidase. This contribution is the first report on the application
109 of ultrasound treatment, the objective of the present study was to evaluate the effects of

110 temperature, time and ultrasound intensity applied to soybean pre-treated with ultrasound,
111 designed to evaluate the effects such a process on chemical and physical changes that may
112 play an important role on the soybean industry. Two sets of experiments were conducted as
113 follows: (i) The Box Behnken design was applied to optimize the conditions of soybean
114 pre-treatment with ultrasound to achieve the highest content of isoflavones in the aglycone
115 form as well as to enhance the activity of endogenous β -glucosidase to the as highest
116 possible level. Finally, a multi-response optimization was carried out. (ii) Soybean samples
117 subjected to ultrasound under optimized conditions were subsequently soaked at a fixed
118 temperature and evaluated the soaking time, physical properties, endogenous β -glucosidase
119 activity and isoflavone contents.

120 **2. Materials and methods**

121 *2.1 Soybean samples and chemicals*

122 Lipxygenase-free soybean samples [*Glycine Max.* (L.) Merr], cultivar BRS 257 (crop year
123 2016) were kindly provided by SL Alimentos (Londrina, Paraná, Brazil). On average, the
124 grains showed the width of 5.234 ± 0.321 mm and length of 6.464 ± 0.662 mm.
125 Acetylaidzin (6''-O-acetylaidzin), acetylgenistin (6''-O-acetylgenistin), acetylglucitin (6''-
126 O-acetylglucitin), malonyldaidzin (6''-O-malonyldaidzin), malonylgenistin (6''-O-
127 malonylgenistin) and malonylglucitin (6''-O-malonylglucitin) were purchased from Wako
128 Pure (Osaka, Japan). Daidzin, genistin, glucitin, daidzein, genistein, glucitein, and *p*-
129 nitrophenyl β -D-glucopyranoside were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO,
130 USA). The remaining chemicals and solvents were of HPLC or analytical grade.

131 *2.2 Soybeans pre-treatment with ultrasound: effects of temperature, time and ultrasound* 132 *intensity*

133 The soybean samples (50g) were pre-treated with ultrasound after its mixing with water at
134 1:1.5 (w/v) and the assays were have done following the factorial Box-Behnken design
135 (Box & Behnken, 1960). Independent variables (X_1 = temperature, X_2 = time, and X_3 =
136 ultrasound intensity), as well as their ranges, are shown in Table 1. A total of 16
137 experiments were conducted in a random manner. Four replicates of the central point
138 (experiments 13-16) were used to evaluate the pure error. The levels of the independent
139 variables for the activity of endogenous β -glucosidase were defined according to the
140 maximum activity of various enzymes subjected to ultrasound treatment (Subhedar &
141 Gogate, 2014; Szabó & Csiszár, 2013; Wang, Lin, Li, Zhang, Wang, & Ma, 2012). Soybean
142 samples, in 150 mL beakers, were kept in a water bath (MA127, MARCONI, Piracicaba,
143 Brazil) until the water temperature reached (X_1) 35, 45 or 55°C after which the samples and
144 the soaking water were transferred to another beaker coupled to a thermostatic water bath
145 (TE-2005, Tecnal, Piracicaba, Brazil). The latter step was conducted to keep the internal
146 temperature of the sample (X_1) during the ultrasound treatment. The ultrasound (Q700,
147 QSonica, Newtown, Connecticut, USA) equipped with a low-intensity probe sonicator was
148 operated at 20 kHz and intensities defined according to the experimental planning (X_3 = 6,
149 15, and 24 W.cm⁻²). After each assay, the samples were cooled down until reaching 25 °C.
150 The water was removed and the samples were frozen, lyophilized (Crhist Alpha 1-4 plus
151 LSC, Christ, Newtown, UK), milled with a grinder (MDR301, Cadence, Navegantes,
152 Brazil) and stored at -22 °C until determination of β -glucosidase activity and the content of
153 different forms of isoflavones.

154 *2.3 Optimised soybeans: moisture content, hardness, aglycones concentration and β -* 155 *glucosidase activity*

156 Soybeans subjected to ultrasound pre-treatment under optimized conditions (kept in their
157 soaking water) were submitted to hydrothermal treatment process ($55 \pm 1^\circ\text{C}$) for up to 6 h.

158 Every hour, the samples were cooled down in an ice bath until reaching 25°C. The
159 remaining water was drained and the moisture content recorded. Intact soybeans without
160 hulls were used to evaluate the texture. A portion of the samples was lyophilized and stored
161 at -22 °C prior to chemical analysis.

162 *2.4 Analytical methods*

163 *2.4.1 Physical properties*

164 The moisture content was evaluated according to the method described in the literature
165 (AOAC, 2006). Soybean samples (18 grains) were used to measure the texture with a TA-
166 XT2i texture analyzer (Stable Micro Systems, Surrey, UK) equipped with an HDP/MTP
167 multiple pea rigs. The equipment settings were: pre-test speed (2 mm s⁻¹), test speed (2 mm
168 s⁻¹), penetration distance (3.5 mm), and force (0.05 N). The maximum force (N) necessary
169 to penetrate the soaked soybeans (with tegument) was determined as an indicator of
170 hardness (Lima, Kurozawa, & Ida, 2014).

171 *2.4.2 Endogenous β -glucosidase activity*

172 Endogenous β -glucosidase was extracted from soybean samples using a previously
173 described procedure (Lima & Ida, 2014). After centrifugation (15 min, 4°C, and 794 g -
174 Eppendorf 5804R, Hamburg, Germany), the supernatant was collected and used for
175 determination of enzyme activity (Matsuura & Obata, 1993) by using the procedure
176 reported by Lima and Ida (2014). *p*-Nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (*p*-NP) was used as
177 the substrate and the enzyme activity, expressed as activity unit (UA), was the quantity of
178 enzyme necessary to release 1 μ mol of *p*-NP per min. The enzyme activity was expressed as
179 UA.g⁻¹ of the sample (dry basis and full fat).

180 *2.4.3 Identification and quantification of isoflavones by UPLC*

181 Ground soybean samples were defatted with hexane (1:10, w/v) for 1h under constant
182 agitation using a water bath shaker (Marconi, MA 140/CFT, Piracicaba, Brazil) The
183 extraction of isoflavones was carried out in triplicate (Handa, Couto, Vicensoti, Georgetti,
184 & Ida, 2014) and a solvent system consisting of ultrapure water-ethanol-acetone was used
185 (1:1:1, v/v/v) (Yoshiara, Madeira, Delarozza, da Silva, & Ida, 2012). The UPLC method
186 described by Handa et al. (2014) was slightly modified to separate the isoflavones. The
187 samples were filtered (Millex filter-H, 0.22 μm) and aliquots of 1.4 μL injected using an
188 automatic injection (Acquity UPLC[®] System, Waters, Milford, Massachusetts, USA). A
189 reversed-phase BEH C18 column (2.1 mm x 50 mm, 1.7 μm , Waters) was used and the
190 binary mobile phase consisted of 0.4% formic acid (A) and acetonitrile (B). The flow rate
191 was adjusted to 0.3 mL.min⁻¹ and the column temperature was kept at 27°C. The elution
192 gradient used was as follows: 0 min, 95% A; 8.5 min, 20% A. The column equilibration
193 was carried out from 9.5 to 12 min. A diode array detector (DAD) was used and the
194 compounds were detected at 260 nm. Retention time and UV spectral data were compared
195 with those of authentic standards. Calibration curves were prepared and used for
196 quantification purposes. Isoflavones have different molecular weights. Therefore, their
197 individual concentration was expressed on a molar basis (μmol of isoflavone .g⁻¹ of the
198 sample, in dry basis and full fat).

199 *2.5 Statistical analysis*

200 *2.5.1 Individual response functions*

201 The response functions were subjected regression analysis and analysis of variance
202 (ANOVA). Individual variables (linear and quadratic effects), as well as their interaction,
203 were evaluated. The estimated models were evaluated by analysis of coefficient of
204 determination (R^2) and coefficient of determination adjusted (R^2_{adjusted}) as well as for the

205 significance of lack of fit ($p_{\text{lack-of-fit}}$). Some non-significant terms were removed from the
 206 models, followed by a new statistical evaluation for validation purposes. The model
 207 obtained was used to explain response functions (highest adjusted coefficient) (Granato, de
 208 Araújo Calado, & Jarvis, 2014). The response functions are represented by the following
 209 equation: $Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_{ii}^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_j^k \beta_{ij} X_i X_j$; where: Y = response
 210 function; X_i and X_j independent variables (i and j vary from 1 to k); β_0 = intercept coefficient
 211 ; β_i , β_{ii} , and β_{ij} are, respectively, the linear, quadratic and interaction coefficients estimated
 212 by the model; k = number of parameters of the model ($k = 3$ for this study). Adjusted
 213 models were used to evaluate all response functions ($p < 0.05$). The regression analysis and
 214 analysis of variance (ANOVA), three-dimensional response surfaces and desirability
 215 function graphics were generated using the software Statistica 10.0 (StatSoft, Tulsa, OK,
 216 USA).

217 2.5.2 Multi-response optimisation

218 The overall desirability function was used for simultaneous optimization of response
 219 variables. Maximum values for β -glucosidase activity and contents of daidzein and
 220 genistein were estimated. Student's t-test ($p < 0.05$) was used to validate the models by
 221 comparing experimental and predicted values for the activity of β -glucosidase as well as for
 222 isoflavones (daidzin, glycitin, genistin, malonyldaidzin, malonylglycitin, malonylgenistin,
 223 daidzein, and genistein).

224 2.5.3 Optimized soybeans

225 The soybeans obtained under optimized conditions were evaluated with respect to its
 226 moisture content, hardness, aglycones concentration and β -glucosidase activity. Mean

227 values were compared by one-way ANOVA and Tukey's test ($p < 0.05$). Statistica 10.0
228 (StatSoft, Tulsa, OK, USA) was used.

229 **3. Results and discussion**

230 *3.1 Effects of soybean ultrasound pre-treatment on the activity of endogenous β -* 231 *glucosidase*

232 Regression coefficients and analysis of variance (ANOVA) of the β -GLU response function
233 are shown in Table 2. Only the coefficient β_{11} (temperature) was negative and significant.
234 However, some non-significant terms were kept in the equation of the β -GLU response
235 function due to their contribution to adjust the model (higher adjusted R^2). The lack of fit
236 was not significant ($p > 0.05$). Furthermore, R^2 indicated that 72.8% of data fitted the
237 model, which supports the application of the model obtained for predictive purposes. The
238 lowest β -glucosidase activity occurred in soybeans submitted to pre-treatment with
239 ultrasound at 55°C (X_1), 25 min (X_2) and intensity of 24 W.cm⁻² (X_3) (Fig. 1a and Table 2).
240 The highest activity (0.172 UA.g⁻¹) estimated by the model occurred at 45°C, in good
241 agreement with the data reported by Matsuura and Obata (1993). These authors extracted
242 endogenous β -glucosidase isoforms from soybean cotyledon and further demonstrated that
243 β -glucosidase B and C added to soymilk were able to hydrolyze daidzin and genistin, thus
244 causing an increase in their respective aglycones (daidzein and genistein). The effects of
245 ultrasound application on soybeans depend on several factors such as enzyme
246 concentration, temperature, substrate type and concentration, and pH of the medium.
247 Enzymes may be inactivated due to their denaturation, but dissociation into smaller
248 subunits is also contemplated (O'Donnell, Tiwari, Bourke, & Cullen, 2010). The
249 ultrasound-assisted inhibition of α -amylase and papain has been reported by Yu et al.
250 (2014). However, the same study also showed that pepsin is able to recover from the

251 ultrasound-induced damage to its original structure, thus suggesting that such a treatment is
252 enzyme-specific and, therefore, demonstrating that the outcomes of ultrasound application
253 in enzyme stability deserve further investigation. The reduction in β -glucosidase activity in
254 the present study may be due to the high ultrasound intensity (24 W.cm^{-2}) and longer
255 exposure time (25 min). O'Donnell et al. (2010) summarized the mechanisms of enzyme
256 inactivation upon ultrasound application. According to these authors, cavitation (high
257 pressure), the formation of free radicals (sonolysis of water produces reactive oxygen
258 species), intracellular micromechanical shocks (disruption of cellular structural and
259 functional components leading to cell lysis), and compressions and rarefactions or
260 compression/expansion cycles (acoustic microstreaming) may be involved. Meanwhile, Yu,
261 Zeng, Zhang, Liao and Shi (2014) demonstrated that enzymatic activity is mainly
262 influenced by ultrasonic treatment due to effects on their secondary and tertiary structures.
263 The increase in the isoflavone content in the aglycone form is shown in Fig. 1c and 1h.
264 Therefore, the decrease of β -glucosidase activity may also be related to the generation of
265 aglycones that may inhibit, at least in part, the activity of β -glucosidase (Esen, 2003). A
266 decrease in the activity of endogenous β -glucosidase at $55 \text{ }^\circ\text{C}$ with a parallel increase in the
267 isoflavones content in the aglycone form was also described in a previous study (Lima,
268 Kurozawa, & Ida, 2014). Phenolics from several classes and feedstocks were found to
269 inhibit enzyme activity *in vitro* (Ambigaipalan, de Camargo, & Shahidi, 2017; de Camargo,
270 Regitano-d'Arce, Biasoto, & Shahidi, 2016). Although it has been suggested that the
271 treatment of soybeans with ultrasound releases the sugar moiety of the isoflavones, such a
272 process may also release aglycones that are linked to the cell wall of the plant material.
273 Isoflavone aglycones released from their insoluble-bound form have recently been detected
274 in black soybeans (Peng, Li, Li, Deng, & Zhang, 2017) and in chia seeds (Rahman, de
275 Camargo, & Shahidi, 2017). Data from the literature (Delgado-Povedano, Priego-Capote, &

276 Luque de Castro, 2017) and our own results demonstrated the crucial role of ultrasound
277 treatment in the conversion of food phenolics to their corresponding aglycones. However,
278 possible inactivation of β -glucosidase by both the ultrasound conditions as well as the
279 phenolics present in the medium supports the use of optimization techniques to find the best
280 conditions at which such a treatment should be used.

281 *3.2 Effects of soybean ultrasound pre-treatment on the conversion of isoflavones β -* 282 *glucosides into their aglycone forms*

283 Regression coefficients and analysis of variance (ANOVA) of the DAI (daidzin), MDAI
284 (malonyldaidzin), ADAI (daidzein), GEN (genistin), AGEN (genistein), GLY (glycitin) and
285 MGLY (malonylglycitin) response function are shown in Table 2. These response functions
286 showed different significant linear, quadratic, and interaction effects, whereas non-
287 significant effect was observed in the MGEN (malonylgenistin) response function (Table
288 2). As mentioned for the β -GLU response function, some non-significant terms were kept in
289 the response functions due to their contribution to adjust the model (higher adjusted R^2).
290 Furthermore, the lack of fit was not significant for all models. Glycitein was not detected in
291 any sample, which is supported by a previous study conducted with the same soybean
292 cultivar (Lima & Ida, 2014). Therefore, its respective response function was not generated
293 (Table 1).

294 The MDAI response function displayed a significant and positive effect from linear and
295 quadratic coefficients of the ultrasound intensity (X_3) and its interaction with temperature
296 ($X_1.X_3$). Thus, there was a decrease in the MDAI as the ultrasound intensity was increased
297 (24 W.cm^{-2}). In contrast, the temperature decrease (35°C) reduced the MDAI response
298 function. Thus, the effects on the MDAI were due to the effect of ultrasound intensity as
299 well as the interaction of intensity with the temperature, as shown to be significant (Fig.

300 1d). Such a decrease (up to 30.4%) may be explained by the ultrasound-assisted hydrolysis
301 of the ether bond and a consequent loss of the malonyl group, which renders an increase in
302 the content of the respective isoflavone in its β -glucoside form. Furthermore, acetyl and
303 malonyl isoflavone forms have been reported to be poorly hydrolyzed by endogenous β -
304 glucosidase and the transformation of conjugated glucosides into their respective aglycones
305 was suggested to increase the hydrolysis rate of isoflavones and, in turn, a better absorption
306 (Ismael & Hayes, 2005) and respective health benefits in human health. Therefore, the use
307 of ultrasound may fill this gap. Nevertheless, malonylglucoside isoflavones have higher
308 polarity than aglycone isoflavones (Yoshiara, Madeira, Delarozza, da Silva, & Ida, 2012)
309 which, along with ultrasound application, may favor their diffusion into the water
310 (Rostagno, Palma, & Barroso, 2003).

311 The ultrasound intensity (X_3) was the only variable that linearly and negatively affected the
312 DAI response function; the GEN response function was affected by linear and quadratic
313 effects of this independent variable (Fig. 1b and 1g, respectively). Therefore, the lowest
314 DAI and GEN response functions were estimated ($0.200 \mu\text{mol daidzin.g}^{-1}$ and $0.143 \mu\text{mol}$
315 genistin.g^{-1} , respectively) when the ultrasound pre-treatment was used at 35°C , 15 min and
316 24 W.cm^{-2} . In contrast, the ultrasound intensity (X_3) showed the opposite effect, thus
317 increasing the ADAI and AGEN response function (Fig. 1c and 1h). Furthermore, the
318 temperature (X_1) also showed a positive and significant effect on the ADAI and AGEN
319 response functions. Meanwhile the AGEN response function showed all effects that were
320 significant and included linear and quadratic effects from temperature (X_1) and ultrasound
321 intensity (X_3), as well as the interaction between these two variables ($X_1.X_3$). Only linear
322 effects of temperature (X_1) and ultrasound intensity (X_3) were significant and positive for
323 ADAI response function. The highest ADAI and AGEN estimated by the models were

324 0.190 and 0.141 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ of sample, respectively, and such values will be achieved under
325 the conditions of 55 °C, 5 min and 24 W.cm^{-2} .

326 The reduction in DAI and GEN response functions (β -glucosides isoflavones) with a
327 parallel increase in ADAI and AGEN response functions (aglycones isoflavones) may be
328 explained by the cavitation effects of ultrasound. Cavitation, is among the effects of
329 ultrasound in a liquid system. In this study, disruption of bubbles, the final consequence of
330 cavitation, generated shock waves that may have facilitated the hydrolysis of the ether bond
331 of the β -glucosides of isoflavones (Rostagno, Palma, & Barroso, 2003), thus producing
332 aglycones as the final product. Therefore, isoflavones in the aglycone form should be
333 procured due to their well substantiated superior biological activity when compared with
334 their conjugated counterparts (Larkin, Price, & Astheimer, 2008), which includes their
335 antioxidant activity and anti-inflammatory effects as well as their potential in preventing
336 certain types of cancer (Wada et al., 2013). Soybean seeds subjected to ultrasound (0.35
337 W.cm^{-2} , 0.54 W.cm^{-2} and 1.0 W.cm^{-2} for 30 min at 25°C) also brought about a reduction in
338 the content of β -glucosides of isoflavones (daidzin and genistin), together with a parallel
339 increase in the concentration of isoflavones aglycones (daidzein and genistein) (Yang, Gao,
340 Yang, & Chen, 2015). Additionally, the same study showed that when the ultrasound
341 intensity was increased to 1 W.cm^{-2} (300 W), a higher conversion was noted as
342 demonstrated by a decrease (79.6%) in the daidzin content which was followed by an
343 increase in the daidzein content (39.1%). Ultrasound-treated *Lactobacillus casei* FTDC
344 2113 fermented soymilk (30 kHz, 60 W and 3 min) also had a positive effect in the product
345 by increasing the content of aglycone isoflavones due to the hydrolysis of their conjugated
346 forms (Yeo & Liong, 2013).

347 The initial daidzin and daidzein contents were 0.331 ± 0.039 and $0.149 \pm 0.003 \mu\text{mol.g}^{-1}$,
348 respectively. When evaluating the reduction in the daidzin content (up to 28.1%) and the

349 concurrent increase in the daidzein content (up to 14.8%), it is possible to note that
350 conversion of daidzin to daidzein is not equimolar (Table 1). This result may be explained
351 by some degree of lixiviation of daidzin to the water. Other authors (Wardhani, Vázquez, &
352 Pandiella, 2008) also reported a non-equimolar conversion of β -glucosides of isoflavones
353 into their aglycone forms, which was also explained by a possible lixiviation of the
354 isoflavones to the water as well as by degradation of the isoflavones thus generating
355 unidentified compounds. Furthermore, isoflavones in the aglycone form showed to be less
356 soluble in water than in solvents with a lower polarity (Jankowiak, Trifunovic, Boom, &
357 Van Der Goot, 2014), therefore, lixiviation of aglycone isoflavones during maceration in
358 water or ultrasound treatment may be more difficult compared to the conjugated ones.
359 However, a different trend with respect to the contents of genistin and genistein was noted.
360 The initial genistin and genistein content were 0.373 ± 0.035 and $0.076 \pm 0.003 \mu\text{mol.g}^{-1}$,
361 respectively, and the concentration of genistin decreased by up to 43.2% whereas that of
362 genistein increased up to 90.9%. Ultrasound-assisted extraction allows greater penetration
363 of the solvent into the plant material, thus increasing the contact surface area between the
364 solid and liquid phases. This physical effect may also facilitate mass transfer and enhance
365 cell disruption (Rostagno, Palma, & Barroso, 2003). Phenolic compounds may be linked to
366 plant cell walls (Shahidi & Yeo, 2016). Furthermore, the presence of genistein in the
367 insoluble-bound form in other feedstocks, including black soybeans has already been
368 reported (Peng, Li, Li, Deng, & Zhang, 2017; Rahman, de Camargo, & Shahidi, 2017).
369 Therefore, the release of insoluble-bound genistein upon ultrasound treatment may also be
370 contemplated.

371 The GLY response function (Table 1 and Fig. 1e) was positively affected by the time of
372 exposure (X_2) (linear and quadratic effects significant) (Table 1). In contrast, the ultrasound
373 intensity (X_3) was affected significantly and negatively. Therefore, the minimum GLY

374 response function was found with 15 min exposure and 24 W.cm⁻² intensity. The MGLY
375 response function is shown in Table 1 and Fig. 1f. While a negative and significant effect
376 was found for ultrasound intensity (X₃) and for its interaction with exposure time (X₂.X₃), a
377 positive and significant effect was found for time of exposure (X₂) and the interaction
378 between temperature (X₁) and ultrasound intensity (X₃) (Table 2). Thus, a decreasing trend
379 started at 45 °C (Fig. 1f) and 15 min exposure. Furthermore, the lowest concentration was
380 detected with the highest ultrasound intensity (24 W.cm⁻²).

381 3.3. Multi-response optimisation of ultrasound pre-treatment and data validation

382 Endogenous β -glucosidase plays an important role in converting conjugated isoflavones to
383 their aglycone form as the latter ones display a superior biological activity compared to
384 their conjugated counterparts (Larkin, Price, & Astheimer, 2008). Therefore, multi-response
385 optimization was carried out taking into account the greater activity of β -glucosidase, as
386 well as higher concentrations of daidzein and genistein (aglycone isoflavones). Adjusted
387 models were used to obtain a desirability function. Thus, the generated ranges of X₁, X₂ and
388 X₃ enabled to obtain the maximum conditions of response functions estimated β -
389 glucosidase, daidzein and genistein (Fig. 2). Regardless of the time (X₂), the maximum
390 values were observed at 55°C (X₁) and, as for the ultrasound intensity (X₃), the values were
391 between 19.5 and 24 W.cm⁻². Therefore, to validate the model, but also considering the
392 lower operation cost, the best conditions were established (X₁ = 55°C; X₂ = 5 min and X₃ =
393 19.5 W.cm⁻²). The relative standard deviations (Table 3) were lower than 20% when
394 comparing the estimated results with those obtained under experimental conditions (β -
395 glucosidase, 9.9%; daidzein, 17.6%; and genistein, 9.0%). Therefore, our model can be
396 used for predictive purposes.

397 3.4 Effect of optimized soybean soaking time after pre-treatment with ultrasound

398 After ultrasound pre-treatment under optimized conditions, soybeans were subjected to
399 soaking for 1, 2, 3, 4, 5 and 6h and the effect of time in relation to β -glucosidase activity
400 and isoflavone content was monitored. Furthermore, due to its importance for the industry,
401 a physical parameter (water absorption) was also monitored. In the present study, soaking
402 during 2 h (Fig. 3a) was sufficient to achieve a moisture content of 127g/ 100g of sample,
403 which did not change significantly ($p > 0.05$) afterward. A previous work (Lima,
404 Kurozawa, & Ida, 2014), however, showed that a similar moisture content (120g/100g of
405 sample) was reached only after 3h of soaking. The study conducted by Lima, Kurozawa,
406 and Ida (2014) was carried out under the same conditions as the current one, but no
407 ultrasound pre-treatment was applied. Therefore, it is possible to suggest that the lower time
408 (2h) to obtain soybeans with 127% moisture content stems from the treatment. Ultrasound
409 pre-treatment may have increased the permeability of the samples through the interaction
410 with the cell walls of the plant material (Rostagno, Villares, Guillamón, García-Lafuente, &
411 Martínez, 2009), thus facilitating the absorption of water. Likewise, 2h soaking was able to
412 reduce the texture of soybeans by 17% (Fig. 3a), which was higher than that found by Lima
413 Kurozawa, and Ida (2014), in which a reduction of 5% was reported for soybeans soaked
414 for 2h with no ultrasound pre-treatment. Supporting the data obtained for the moisture
415 content, the texture did not change in a significant manner ($p > 0.05$) after 2h of soaking.
416 The minimum moisture content (120%) for soaked soybeans for further processing has been
417 suggested by Pan and Tangratnavalee (2003). Therefore, by reducing the time from 3 to 2h
418 due to the use of ultrasound pre-treatment, this study also helps the economical aspects and
419 use by the industry due to both the energy and time consumption during processing.

420 The activity of endogenous β -glucosidase is shown in Fig. 3b, 3c, and 3d. Other than the
421 original samples (not subjected to soaking), the highest activity was detected at 1h and the
422 minimum activity was reached at 4h, which did not change up to 6h ($p < 0.05$). In contrast,

423 the content of aglycone isoflavones (daidzein, genistein, and glycitein) increased at 1h (Fig.
424 3b, 3c, and 3d). The reduction on the activity of endogenous β -glucosidase after the first
425 hour of soaking at different temperatures has also been reported (Lima, Kurozawa, & Ida,
426 2014; Wardhani, Vázquez, & Pandiella, 2008), thus lending support to the findings of the
427 current study. As mentioned before, such a decrease may be due to increase in the content
428 of isoflavones in the aglycone form (Esen, 2003) because they may bind to this enzyme
429 thus changing its structure and affecting its activity. The concentration of daidzein and
430 genistein increased up to 2.5 (Fig. 3b) and 3.3 times (Fig. 3c), respectively with respect to
431 the content found in samples that were not subjected to soaking, but this content did not
432 change until 6h ($p > 0.05$). In contrast, at 4h of soaking a reduction of 53.6, 32.3, 39.1, and
433 26.2% was detected for daidzin, malonyldaidzin, genistin, and malonylgenistin,
434 respectively, thus demonstrating that there was a conversion of the conjugated forms into
435 their corresponding aglycones. It is noteworthy that glycitein, which was not detected in the
436 sample subjected to ultrasound pre-treatment, was now detected after 1h of soaking (0.081
437 $\pm 0.008 \mu\text{mol.g}^{-1}$) and then increased up to 2.2 times after 4h and reaching 2.9 times in 6h
438 (Fig. 3d). Endogenous β -glucosidase present a low specificity for glycitin and
439 malonylglycitin (Ismael & Hayes, 2005), therefore, its generation and further increase in
440 concentration of glycitein may be explained by the thermal hydrolysis of glycitin and
441 malonylglycitin. In general, 4 h of soaking was necessary to obtain the highest content of
442 isoflavones in the aglycone form. However, in 2h a significant increase was also observed.
443 Furthermore, as mentioned before, 2h soaking was sufficient to obtain soybeans with lower
444 hardness ($118.46 \pm 4.3 \text{ N}$) and higher moisture content ($127.3 \pm 0.7\%$), which is a shorter
445 time than previously found (Lima, Kurozawa, & Ida, 2014). Therefore, ultrasound pre-
446 treatment (55°C , 5 min, and 19.5 W.cm^{-2}) showed to be advantageous to obtain soaked

447 soybeans with desirable physical and chemical characteristics. Ultrasound pre-treated
448 soybeans may serve as a better feedstock for the food industry.

449 **4. Conclusion**

450 The response functions (β -glucosidase, daidzin, malonyldaidzin, daidzein, genistin,
451 genistein, glycitin, malonylglycitin)–showed different linear, quadratic, and interaction
452 effects. However, the present study employed multi-response optimization of ultrasound
453 pre-treatment of soybeans in order to obtain a feedstock with higher contents of isoflavones
454 in the aglycone form, which was further carried out. The best conditions of ultrasound pre-
455 treatment of soybeans were established ($X_1 = 55^\circ\text{C}$; $X_2 = 5$ min, and $X_3 = 19.5 \text{ W.cm}^{-2}$) and
456 the models may be used for predictive purposes. Furthermore, ultrasound pre-treated
457 soybeans showed to be a promising feedstock due to their lower soaking time (2h) to
458 achieve the highest moisture content, lower hardness and increased the content of
459 isoflavones in the aglycone form. The greater biological potential of non-conjugated
460 isoflavones is well substantiated. Therefore, the present study provides information about a
461 physical treatment and its outcomes in terms of the chemistry of bioactive small molecules
462 and further processing. As such, the data presented may be useful to the food industry and
463 may offer benefits to consumers of soybean and its products.

464 **Acknowledgments**

465 H. G. Falcão and M. B. R. Silva are thankful to Coordination of Improvement of Higher
466 Education – Ministry of Education of Brasil - CAPES for providing their PhD scholarships.
467 A. C. de Camargo acknowledges CAPES for his postdoctoral fellowship. C. L. Handa
468 would like to thank CNPq (National Council for Scientific and Technological Development
469 – Brazil) for her PhD scholarship.

470 **References**

- 471 Ambigaipalan, P., de Camargo, A. C., & Shahidi, F. (2017). Identification of phenolic
472 antioxidants and bioactives of pomegranate seeds following juice extraction using
473 HPLC-DAD-ESI-MSⁿ. *Food Chemistry*, 221, 1883-1894.
- 474 AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International. 18 th. Edition, 2006.
- 475 Box, G. E. P., & Behnken, D. W. (1960). Some new three level designs for the study of
476 quantitative variables. *Technometrics*, 2, 455-475.
- 477 Chemat, F., Huma, Z. E., & Khan, M. K. (2011). Applications of ultrasound in food
478 technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18,
479 813–835.
- 480 de Camargo, A. C., Regitano-d'Arce, M. A. B., Biasoto, A. C. T., & Shahidi, F. (2016).
481 Enzyme-assisted extraction of phenolics from winemaking by-products: antioxidant
482 potential and inhibition of alpha-glucosidase and lipase activities. *Food Chemistry*,
483 212, 395–402.
- 484 Delgado-Povedano, M. D. M., Priego-Capote, F., & Luque de Castro, M. D. (2017).
485 Selective ultrasound-enhanced enzymatic hydrolysis of oleuropein to its aglycon in
486 olive (*Olea europaea* L.) leaf extracts. *Food Chemistry*, 220, 282-288.
- 487 Delgado-Povedano, M. M., & Luque de Castro, M. D. (2015). A review on enzyme and
488 ultrasound: A controversial but fruitful relationship. *Analytica Chimica Acta*, 889, 1-
489 21.
- 490 Esen, A. (2003). β -Glucosidase. In J. R. Whitaker, A. G. J. Voragen & D. W. S. Wong
491 (Eds.), *Handbook of Food Enzymology*, (pp. 774-786). New York: Marcel Dekker
- 492 Fernandez-Lopez, A., Lamothe, V., Delample, M., Denayrolles, M., & Bennetau-Pelissero,
493 C. (2016). Removing isoflavones from modern soyfood: Why and how? *Food*
494 *Chemistry*, 210, 286-294.

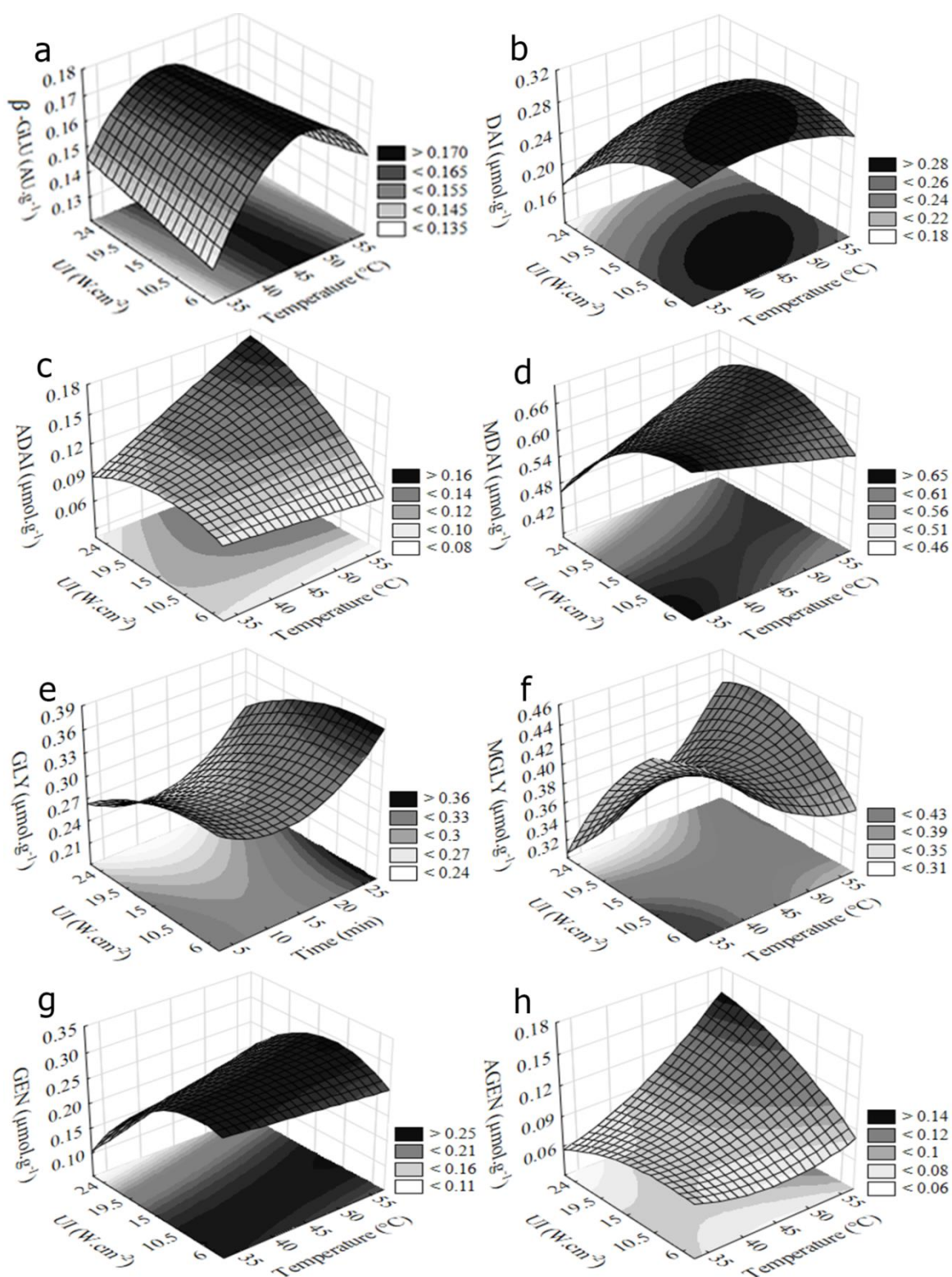
- 495 Granato, D., de Araújo Calado, V. M., & Jarvis, B. (2014). Observations on the use of
496 statistical methods in Food Science and Technology. *Food Research International*,
497 55, 137-149.
- 498 Handa, C. L., Couto, U. R., Vicensoti, A. H., Georgetti, S. R., & Ida, E. I. (2014).
499 Optimisation of soy flour fermentation parameters to produce β -glucosidase for
500 bioconversion into aglycones. *Food Chemistry*, 152, 56-65.
- 501 Ismael, B., & Hayes, K. (2005). β -Glycosidase activity toward different glycosidic forms of
502 isoflavones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4918-4924.
- 503 Jankowiak, L., Trifunovic, O., Boom, R. M., & Van Der Goot, A. J. (2014). The potential
504 of crude okara for isoflavone production. *Journal of Food Engineering*, 124, 166-172.
- 505 Larkin, T., Price, W. E., & Astheimer, L. (2008). The key importance of soy isoflavone
506 bioavailability to understanding health benefits. *Critical Reviews in Food Science and*
507 *Nutrition*, 48, 538-552.
- 508 Lima, F. S., Kurozawa, L. E., & Ida, E. I. (2014). The effects of soybean soaking on grain
509 properties and isoflavones loss. *LWT - Food Science and Technology*, 59, 1274-1282.
- 510 Matsuura, M., & Obata, A. (1993). β -Glucosidases from soybeans hydrolyze daidzin and
511 genistin. *Journal of Food Science*, 58, 144-147.
- 512 Nipornram, S., Tochampa, W., Rattanatraiwong, P., & Singanusong, R. (2018).
513 Optimization of low power ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds
514 from mandarin (*Citrus reticulata* Blanco cv. Sainampueng) peel. *Food Chemistry*,
515 241, 338-345.
- 516 O'Donnell, C. P., Tiwari, B. K., Bourke, P., & Cullen, P. J. (2010). Effect of ultrasonic
517 processing on food enzymes of industrial importance. *Trends in Food Science &*
518 *Technology*, 21, 358-367.

- 519 Pan, Z., & Tangratanavalee, W. (2003). Characteristics of soybeans as affected by soaking
520 conditions. *LWT - Food Science and Technology*, *36*, 143-151.
- 521 Peng, H., Li, W., Li, H., Deng, Z., & Zhang, B. (2017). Extractable and non-extractable
522 bound phenolic compositions and their antioxidant properties in seed coat and
523 cotyledon of black soybean (*Glycinemax* (L.) merr). *Journal of Functional Foods*, *32*,
524 296-312.
- 525 Rahman, M. J., de Camargo, A. C., & Shahidi, F. (2017). Phenolic and polyphenolic
526 profiles of chia seeds and their in vitro biological activities. *Journal of Functional*
527 *Foods*, *35*, 622-634.
- 528 Rokhina, E. V., Lens, P., & Virkutyte, J. (2009). Low-frequency ultrasound in
529 biotechnology: state of the art. *Trends in Biotechnology*, *27*, 298-306.
- 530 Rostagno, M. A., Palma, M., & Barroso, C. G. (2003). Ultrasound-assisted extraction of soy
531 isoflavones. *Journal of Chromatography A*, *1012*, 119-128.
- 532 Rostagno, M. A., Villares, A., Guillamón, E., García-Lafuente, A., & Martínez, J. A.
533 (2009). Sample preparation for the analysis of isoflavones from soybeans and soy
534 foods. *Journal of Chromatography A*, *1216*, 2-29.
- 535 Rowland, I., Faughnan, M., Hoey, L., Wähälä, K., Williamson, G., & Cassidy, A. (2003).
536 Bioavailability of phyto-oestrogens. *British Journal of Nutrition*, *89*, S45-S58.
- 537 Lima, F. S., & Ida, E. I. (2014). Optimisation of soybean hydrothermal treatment for the
538 conversion of β -glucoside isoflavones to aglycones. *LWT - Food Science and*
539 *Technology*, *56*, 232-239.
- 540 Shahidi, F., & Yeo, J. (2016). Insoluble-Bound Phenolics in Food. *Molecules*, *21*, 1-22.
- 541 Subhedar, P. B., & Gogate, P. R. (2014). Enhancing the activity of cellulase enzyme using
542 ultrasonic irradiations. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *101*, 108-114.

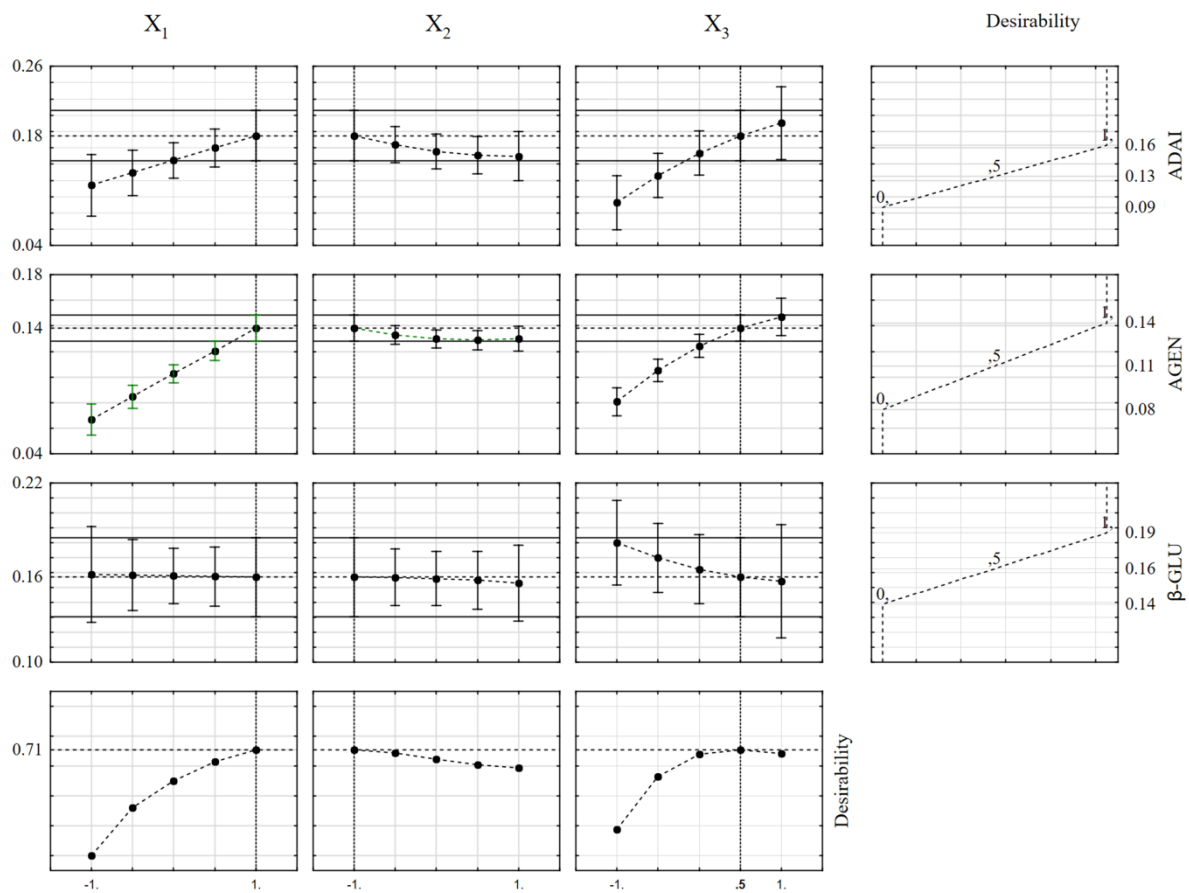
- 543 Szabó, O. E., & Csiszár, E. (2013). The effect of low-frequency ultrasound on the activity
544 and efficiency of a commercial cellulase enzyme. *Carbohydrate Polymers*, 98, 1483-
545 1489.
- 546 Villares, A., Rostagno, M. A., García-Lafuente, A., Guillamón, E., & Martínez, J. A.
547 (2011). Content and profile of isoflavones in soy-based foods as a function of the
548 production process. *Food and Bioprocess Technology*, 4, 27-38.
- 549 Wada, K., Nakamura, K., Tamai, Y., Tsuji, M., Kawachi, T., Hori, A., Takeyama, N.,
550 Tanabashi, S., Matsushita, S., Tokimitsu, N., & Nagata, C. (2013). Soy isoflavone
551 intake and breast cancer risk in Japan: From the Takayama study. *International*
552 *Journal of Cancer*, 133, 952-960.
- 553 Wang, H. J., & Murphy, P. A. (1994). Isoflavone content in commercial soybean foods.
554 *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 1666-1673.
- 555 Wang, Z., Lin, X., Li, P., Zhang, J., Wang, S., & Ma, H. (2012). Effects of low intensity
556 ultrasound on cellulase pretreatment. *Bioresource Technology*, 117, 222-227.
- 557 Wardhani, D. H., Vázquez, J. A., & Pandiella, S. S. (2008). Kinetics of daidzin and genistin
558 transformations and water absorption during soybean soaking at different
559 temperatures. *Food Chemistry*, 111, 13-19.
- 560 Yang, H., Gao, J., Yang, A., & Chen, H. (2015). The ultrasound-treated soybean seeds
561 improve edibility and nutritional quality of soybean sprouts. *Food Research*
562 *International*, 77, 704-710.
- 563 Ye, Y. B., Wang, Z. L., Zhuo, S. Y., Lu, W., Liao, H. F., Verbruggen, M., Fang, S., Mai, H.
564 Y., Chen, Y. M., & Su, Y. X. (2012). Soy germ isoflavones improve menopausal
565 symptoms but have no effect on blood lipids in early postmenopausal Chinese
566 women: A randomized placebo-controlled trial. *Menopause*, 19, 791-798.

- 567 Yeo, S. K., & Liong, M. T. (2013). Effect of ultrasound on bioconversion of isoflavones
568 and probiotic properties of parent organisms and subsequent passages of
569 *Lactobacillus*. *LWT - Food Science and Technology*, *51*, 289-295.
- 570 Yoshiara, L. Y., Madeira, T. B., Delaroza, F., Da Silva, J. B., & Ida, E. I. (2012).
571 Optimization of soy isoflavone extraction with different solvents using the simplex-
572 centroid mixture design. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, *63*,
573 978-986.
- 574 Yu, Z.-L., Zeng, W.-C., Zhang, W.-H., Liao, X.-P., & Shi, B. (2014). Effect of ultrasound
575 on the activity and conformation of α -amylase, papain and pepsin. *Ultrasonics*
576 *Sonochemistry*, *21*, 930-936.

577 **Fig. 1** Responses Surface plotting as a function of temperature (X_1), time (X_2), and ultrasound
 578 intensity (X_3) of ultrasound soybeans pre-treatment: (a) β -GLU is β -glucosidase activity; (b)
 579 DAI is daidzin; (c) ADAI is daidzein; (d) MDAI is malonyldaidzin; (e) GLY is glycitin; (f)
 580 MGLY is malonylglycitin; (g) GEN is genistin; and (h) AGEN is genistein. UI stands for
 581 ultrasound intensity.

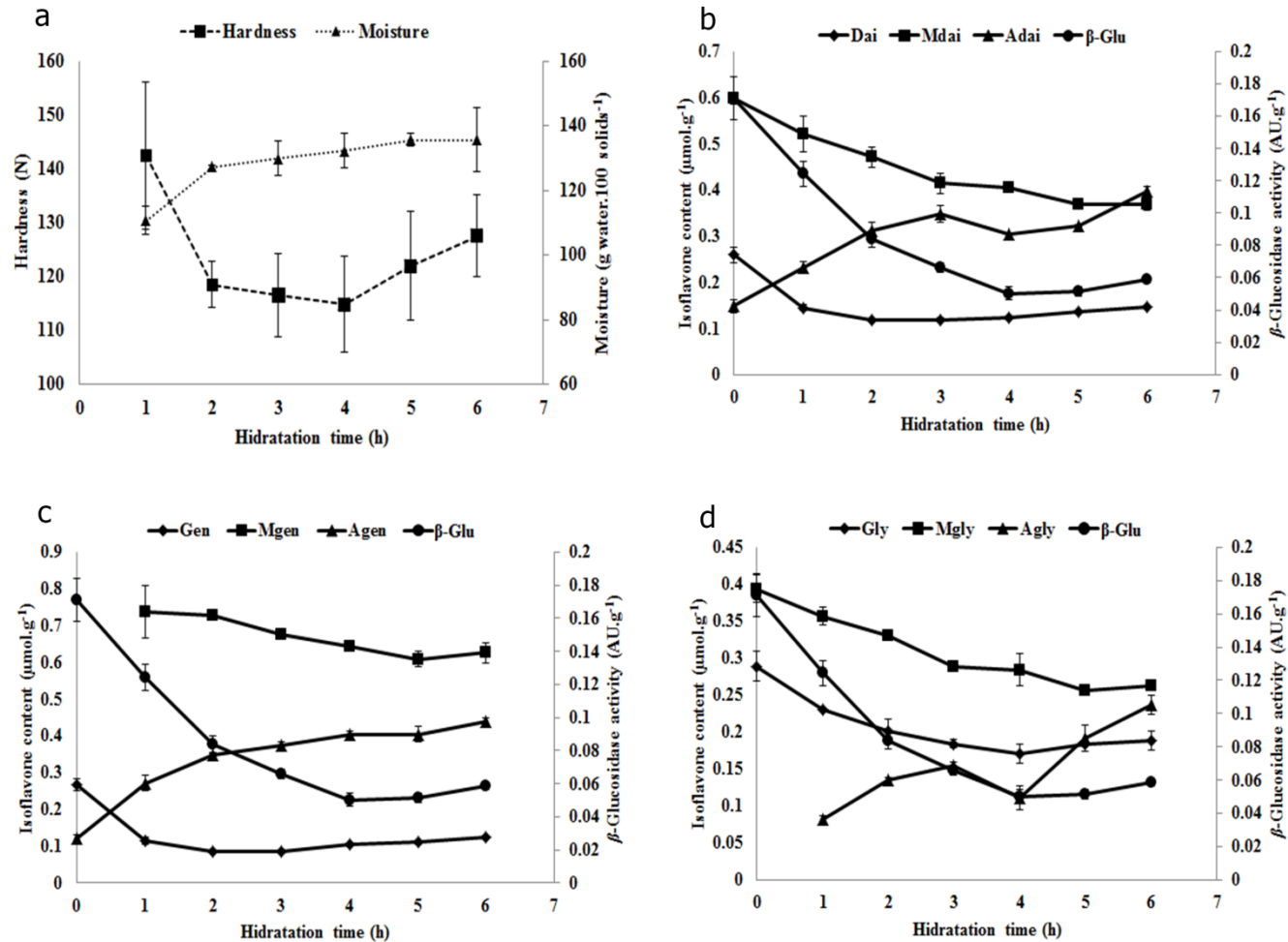


583 **Fig. 2** - Desirability parameters estimated for the maximum values of β -glucosidase activity
 584 (β -glu), and maximum concentrations of daidzein (adai) and genistein (agen). X_1 is the
 585 temperature ($^{\circ}\text{C}$); x_2 is the time (min), and x_3 is the ultrasound intensity ($\text{w}\cdot\text{cm}^{-2}$).



586

587 **Fig. 3** Physical (a) and chemical (b,c,d) changes during soaking time of soybeans pre-treated with ultrasound under optimized conditions. β -glu is
 588 β -glucosidase activity; dai is daidzin; gly is glycitin; gen is genistin; mdai is malonyldaidzin; mgly is malonylglycitin; mgen is malonylgenistin;
 589 adai is daidzein; agen is genistein, and agly is glycitein. The error bars are the standard deviation. data represent mean values \pm standard
 590 deviation (n = 3 for moisture and isoflavone content, n = 4 for hardness, and n = 9 for β -glu).



591 **Table 1** - Box Behnken design (DBB) with coded (x) and uncoded (X) independent variables used for the ultrasound soybeans pre-treatment and
 592 their response functions

Assays	Independent variables			Response functions ^a								
	x_1 (X ₁)	x_2 (X ₂)	x_3 (X ₃)	β -GLU	DAI	MDAI	ADAI	GLI	MGLI	GEN	MGEN	A GEN
01	-1 (35)	-1 (5)	0 (15)	0.139	0.286	0.672	0.107	0.329	0.480	0.284	0.930	0.088
02	1 (55)	-1(5)	0 (15)	0.148	0.282	0.682	0.160	0.294	0.461	0.257	0.935	0.119
03	-1 (35)	1 (25)	0 (15)	0.160	0.260	0.644	0.126	0.347	0.457	0.277	0.906	0.084
04	1 (55)	1 (25)	0 (15)	0.154	0.291	0.679	0.152	0.364	0.482	0.350	0.969	0.082
05	-1 (35)	0 (15)	-1 (6)	0.151	0.281	0.701	0.105	0.319	0.465	0.293	0.946	0.075
06	1 (55)	0 (15)	-1 (6)	0.156	0.270	0.613	0.092	0.281	0.371	0.273	0.895	0.085
07	-1 (35)	0 (15)	1 (24)	0.155	0.261	0.611	0.115	0.279	0.387	0.292	0.959	0.089
08	1(55)	0 (15)	1 (24)	0.154	0.238	0.614	0.171	0.294	0.405	0.212	0.868	0.145
09	0 (45)	-1(5)	-1 (6)	0.171	0.306	0.623	0.088	0.332	0.414	0.316	0.922	0.077
10	0 (45)	1 (25)	-1 (6)	0.173	0.289	0.663	0.112	0.342	0.474	0.273	0.904	0.077
11	0 (45)	-1(5)	1 (24)	0.173	0.261	0.611	0.115	0.279	0.387	0.292	0.959	0.089
12	0 (45)	1 (25)	1 (24)	0.168	0.254	0.578	0.128	0.295	0.377	0.236	0.850	0.093
13	0 (45)	0 (15)	0 (15)	0.168	0.289	0.653	0.110	0.313	0.428	0.285	0.938	0.083
14	0 (45)	0 (15)	0 (15)	0.169	0.255	0.612	0.127	0.259	0.376	0.278	0.870	0.094
15	0 (45)	0 (15)	0 (15)	0.166	0.270	0.639	0.115	0.285	0.438	0.233	0.812	0.085
16	0 (45)	0 (15)	0 (15)	0.168	0.273	0.661	0.129	0.327	0.445	0.291	0.875	0.092

593 x_1 , x_2 , and x_3 are coded independent variables (outside the parentheses) for X₁ (temperature, °C), X₂ (time, min) and X₃ (ultrasound intensity, W.cm⁻²).

594 ^aResponse functions are express as mean from three (n = 3) determinations: β -GLU is β -glucosidase activity; DAI is daidzin; GLY is glycitin;
 595 GEN is genistin; MDAI is malonyldaidzin; MGLY is malonylglycitin; MGEN is malonylgenistin; ADAI is daidzein, and AGEN is genistein.
 596 Enzyme activity is expressed in UA. g⁻¹ of sample in dry basis and full fat. Isoflavones are expressed as μ mol of isoflavone. g⁻¹ of the sample in
 597 dry basis and full fat. Glycitein was not detected in any sample/assay.

598 **Table 2** – Regression coefficients and analysis of variance (ANOVA) of the mathematical
 599 models.

Parameters	Regression coefficients (β) ^a								
	β - GLU	DAI	MDAI	ADAI	GEN	MGEN	AGEN	GLI	MGLY
<i>Intercept</i>									
β_0	0.170	0.281	0.645	0.126	0.273	0.893	0.092	0.293	0.402
<i>Linear</i>									
β_1	0.003	0.007	0.010	0.015 ^b	0.011	0.020	0.020 ^b	0.006	-----
β_2	0.002	-----	-----	-----	0.013	0.010	-----	0.019 ^b	-----
β_3	-----	-	-	0.018 ^b	-	-0.061	0.010 ^b	-	-0.023 ^b
		0.026 ^b	0.035 ^b		0.052 ^b			0.028 ^b	
<i>Quadratic</i>									
β_{11}	-	-0.014	-----	-----	-----	0.034	0.010 ^b	-----	0.018
	0.019 ^b								
β_{22}	-----	0.017	0.027	0.007	0.016	0.031		0.033 ^b	0.051 ^b
β_{33}	-----	-0.021	-	-0.012	-	-0.049	-	-0.014	-0.022
			0.044 ^b		0.045 ^b		0.008 ^b		
<i>Interaction</i>									
β_{12}	-0.004	0.007	-----	-0.007	0.021	0.007	-----	0.018	-----
β_{13}	-0.004	0.013	0.046 ^b	0.019	0.022	0.040	0.018 ^b	0.024	0.042 ^b
β_{23}	-----	-----	-0.021	-0.012	0.033	0.028	-----	-----	-0.034 ^b
R^{2c}	0.728	0.801	0.848	0.913	0.876	0.647	0.973	0.728	0.912
Lack of fit (p) ^c	0.839	0.595	0.610	0.888	0.882	0.506	0.428	0.258	0.819

600 ^a β -GLU is β -glucosidase activity; DAI is daidzin; GLY is glycitin; GEN is genistin; MDAI is
 601 malonyldaidzin; MGLY is malonylglycitin; MGEN is malonylgenistin; ADAI is daidzein,
 602 and AGEN is genistein. Enzyme activity is express in UA.g⁻¹ of sample in dry basis and full
 603 fat. Isoflavones are express as μ mol of isoflavone.g⁻¹ of sample in dry basis and full fat.
 604 Glycitein was not detected in any sample/assay. ^bSignificant parameters ($p < 0.05$). β_1 , β_2 , and
 605 β_3 (subscript numbers) stands for temperature ($^{\circ}$ C), time (min), and ultrasound intensity
 606 ($W.cm^{-2}$), respectively. ^cDetermination coefficients (R^2) and lack of fit (p) of the adjusted
 607 models. (-----) non-significant terms removed from the models.

608 **Table 3** – Validation of the proposed models under optimized conditions ^a

Response function ^b	Predicted values	Experimental values	Relative standard deviation (%)
<i>β</i> -glucosidase	0.154 ± 0.024 ^A	0.171 ± 0.013 ^A	9.9
daidzin	0.272 ± 0.036 ^A	0.259 ± 0.016 ^A	5.0
glycitin	0.289 ± 0.049 ^A	0.289 ± 0.020 ^A	0
genistin	0.224 ± 0.070 ^A	0.266 ± 0.016 ^A	15.8
malonyldaidzin	0.687 ± 0.048 ^A	0.598 ± 0.013 ^B	14.9
malonylglycitin	0.492 ± 0.037 ^A	0.394 ± 0.018 ^B	24.9
daidzein	0.174 ± 0.031 ^A	0.148 ± 0.013 ^A	17.6
genistein	0.133 ± 0.007 ^A	0.122 ± 0.009 ^A	9.00

609 ^a X₁ = 55 °C; X₂ = 5 min, and X₃ = 19.5 W.cm⁻². Data represent mean values ± standard
610 deviation (n = 3). Means followed by different letters within a row show difference among
611 samples (*p* < 0.05).

612 ^b Enzyme activity is expressed in UA.g⁻¹ of sample in dry basis and full fat. Isoflavones are
613 expressed as μmol of isoflavone.g⁻¹ of sample in dry basis and full fat.

1 5.2 ARTIGO CIENTÍFICO 2

2 **Ultrasound soybean pre-treatment in maceration increases the content of isoflavones as**
3 **aglycones, total phenolics, antioxidant potential and anti-inflammatory activities**

4 Heloisa Gabriel Falcão^a; Mariah Benine Ramos Silva^a; Adriano Costa de Camargo^{a,b*}; Fereidoon
5 Shahidi^b; Marcelo Franchin^c; Pedro Luiz Rosalen^c; Severino Matias Alencar^d; Louise Emy
6 Kurozawa^e; Elza Iouko Ida^{a*}

7 ^aLondrina State University, Department of Food Science and Technology, 86051-990 Londrina,
8 Parana State, Brazil

9 ^bDepartment of Biochemistry, Memorial University of Newfoundland, St. John's, NL, Canada A1B
10 3X9

11 ^cDepartment of Physiological Sciences, Piracicaba Dental School, University of Campinas, CEP
12 13414-903, Piracicaba, São Paulo, Brazil

13 ^dDepartment of Agri-Food Industry, Food & Nutrition, “Luiz de Queiroz” College of Agriculture,
14 University of São Paulo, P.O. Box 9, CEP 13418-900 Piracicaba, SP, Brazil

15 ^eDepartment of Food Engineering, Faculty of Food Engineering, University of Campinas,
16 Campinas, SP, Brazil

17 * Correspondence should be addressed to adrianoesalq@gmail.com and elida@uel.br

18 **ABSTRACT**

19 Soybean isoflavones as aglycones usually exhibit greater biological activities than their conjugates.
20 The effect of ultrasound prior to maceration of soybean was investigated in this study. The total
21 phenolic content as well as the recovery of isoflavone aglycones was screened by using the Box-
22 Benhken design. Contrasting samples regarding to isoflavones aglicones and phenolic compounds
23 content were investigated for their antioxidant potential and anti-inflammatory activities using
24 RAW 264.7 macrophages transfected with the NF- κ B-pLUC gene. Ultrasound pre-treated soybeans
25 (55 °C, 15 min and 24 W/cm²) showed greater total phenolic content and isoflavone aglycones
26 compared to the control and this translated to higher antioxidant potential and anti-inflammatory
27 activities. The term "processed foods" has occasionally been considered controversial because it has
28 been confused with "ultra-processed foods", which may have a negative connotation. However, this
29 contribution demonstrates the beneficial effects of pre-treatment of soybeans which provides a
30 better feedstock for the functional food industry and as a functional ingredient.

31

32 **Key words:** sonication; hydrothermal processing; soybean flavonoids; antioxidant activity; anti-
33 inflammatory activity; emergent technology.

34

35 **Introduction**

36 Soybean is among the most important food commodities, mainly due to its high protein content.
37 Soybean lipids are also rich in unsaturated fatty acids (Messina, 2016) as well as bioactive
38 compounds such as polyphenols and tocopherols (Shahidi & de Camargo, 2016). Flavonoids, more
39 specifically isoflavones, are the most prominent group of phenolic compounds in soybean (Perez-
40 Vizcaino & Duarte, 2010). Isoflavones may exist as aglycones or in the conjugated forms.

41 The higher biological activity of isoflavone aglycones can be explained by their low molecular
42 weight, which facilitates their absorption in the lower gut. However, conjugated isoflavones are the
43 major phenolics in unprocessed soybean. In fact, the content of malonylglucoside isoflavones may
44 range from 70 to 90%, considering the isoflavone profile, while the content of β -glucoside
45 isoflavones varies from 10 to 26%. The contribution of isoflavone aglycones is in the range of 1 to
46 7% (Lima & Ida, 2014).

47 The isoflavone profile of soybeans can vary among different genotypes and may be influenced by
48 biotic and abiotic stress under field conditions (Britz, Schomburg, & Kenworthy, 2011). However,
49 hydrothermic treatment and ultrasound exposure (Falcão et al., 2018; Lima, Kurozawa, & Ida,
50 2014) also change the isoflavone profile before production of soybean products. Maceration and
51 ultrasound influence the activity of endogenous β -glucosidase, which is involved in the conversion
52 of conjugated isoflavones, thus generating their respective aglycones (Falcão et al., 2018; Lima et
53 al., 2014).

54 As a source of bioactive compounds, soybean consumption has been associated with health
55 benefits. These include prevention of cardiovascular diseases (Messina, 2016; Siow & Mann, 2010)
56 and lower risk of developing certain types of cancer and osteoporosis (Wada et al., 2013; Omoni &
57 Aluko, 2005). Furthermore, oxidative stress and inflammation are common to both diseases. Due to
58 their improved biological activity, investigations on the sources of isoflavones in the aglycone form
59 has been addressed in several studies (Larkin, Price, & Astheimer, 2008).

60 A recent report by our research team (Falcão et al., 2018) has supported the use of ultrasound prior
61 to maceration of soybean to increase its content of isoflavone aglycones as well as to decrease the
62 maceration time. However, the effect of ultrasound on the total phenolic content, and changes in
63 their isoflavone profile in terms of antioxidant potential and anti-inflammatory activity have not
64 been addressed. Therefore, the total phenolic content as well as the recovery of isoflavone
65 aglycones was studied in this work by using the Box-Benhken design. Furthermore, considering the
66 critical role of oxidative stress and inflammation in many diseases, the antioxidant potential of
67 unprocessed and ultrasound treated samples was evaluated for their radical scavenging activity and
68 their anti-inflammatory activity screened .

69 **Materials and methods**

70 *Materials*

71 Lipoxygenase-free BRS 257 soybean samples [*Glycine Max.* (L.) Merr] crop year 2015/2016 were
72 kindly provided by SL Alimentos (Londrina, Paraná, Brazil) and maintained cooled until the assays.
73 Malonylglycoside and acetylglycoside isoflavones were purchased from Wako Pure Chemical
74 Industries, Ltd. (Osaka, Japan). Meanwhile, β -glycoside isoflavones, isoflavone aglycones, *p*-
75 nitrophenyl- β -D-glucopiranoside (*p*-NPG), gallic acid, and trolox were procured from Sigma
76 Aldrich (St. Louis, MO, USA). Macrophage RAW264.7 cells were obtained from the cell bank of
77 Rio de Janeiro (ATCC, Rio de Janeiro, Brazil). The remaining chemicals and solvents were of
78 analytical or chromatographic grade.

79 *Experimental design and ultrasound treatment*

80 A Box-Behnken experimental design (Box & Behnken, 1960) was employed to evaluate the effects
81 of ultrasound treatment prior maceration on the total phenolic content and total isoflavone aglycone
82 of soybeans. Coded (x_1 , x_2 and x_3) and uncoded (X_1 = temperature, X_2 = exposure time and X_3 =
83 ultrasound intensity) independent variables are shown in Table 1. Different treatments, including 4

84 replications at the central point, were numbered from 1 to 16 [treatment 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10,
 85 11, 12, (central point, treatment 13, 14, 15, and 16)]. Soybean grains (50 g) in distilled water (1:1.5;
 86 m/v) were used in each assay. Ultrasound pre-treatment procedure and equipment have been
 87 described elsewhere (Falcão et al., 2018). The samples were heated in a MA127 water bath
 88 (MARCONI, Piracicaba, Brazil) until reaching the desired temperature, as defined in the
 89 experimental plan (Table 1). To keep the internal temperature of the material during the ultrasound
 90 treatment, soybean samples and the soaking water were transferred to a TE-2005 beaker coupled to
 91 a thermostatic water bath (Tecnal, Piracicaba, Brazil). A Q700 ultrasound (QSonica, Newtown, CT,
 92 USA) and a low-intensity probe sonicator were used. The frequency was 20 kHz and both the time
 93 of exposure (X_2) and intensities (X_3) employed were defined according to the experimental plan
 94 (Table 1). At the end of each treatment, the samples were cooled down in ice until reaching 25 °C.
 95 The water was drained and the samples were frozen and lyophilized using an Alpha 1–2 LD Plus
 96 freeze dryer (Martin Christ, Germany). Lyophilized grains were ground (MDR301, Cadence,
 97 Navegantes, Brazil) and the resultant flour (0.5 mm of granulometry) was stored at –22 °C until
 98 further analysis. The total phenolic content (TPC) and the total aglycone content (TAC) were the
 99 response functions.

100 The response functions were subjected to regression and variance analysis (ANOVA) to evaluate
 101 the effect of the intendent variables (linear and quadratic effects) as well as their interactions.
 102 Determination coefficients (R^2 and R^2 adjusted) and lack of fit (p) were calculated. Some non-
 103 significant effects were removed from the model after a first coefficient evaluation (β) following a
 104 new statistical analysis to obtain a better adjusted model by considering the experimental data
 105 (Granato, Calado, & Jarvis, 2014). The better adjusted R^2 ($\alpha = 0.05$) was used to explain the
 106 response function. The data was fitted to a second order model represented by the equation below.

$$107 \quad Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_{ii}^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_j^k \beta_{ij} x_i x_j \quad (1);$$

108 Where Y = response function (TPC or TAC) and x_i and x_j are the coded independent variables (i and
 109 j vary from 1 to k); β_0 = intercept coefficient; β_i , β_{ii} and β_{ij} are the estimated linear, quadratic, and

110 interaction coefficients of the model, respectively; and k = number of parameters of the model. In
111 the case of this study, $k = 3$. Adjusted models of TPC and TAC were used to obtain surface
112 response and desirability function graphics were generated using the software Statistica 10.0
113 (StatSoft, Tulsa, OK, USA).

114 *Analytical Methods*

115 *Extraction of phenolic compounds*

116 Ground flours were defatted with hexane (1:10; m/v) under agitation (MA 140/CFT, Marconi,
117 Piracicaba, SP, Brazil) at 305 rpm for 1 h. The material was vacuum filtered and stored at -22 °C.
118 The extracts were obtained as described by Handa, Couto, Vicensoti, Georgetti, and Ida (2014).
119 The solvent system was ethanol/acetone/water (1:1:1, v/v/v) (Yoshiara, Madeira, Delaroza, da
120 Silva, & Ida, 2012).

121 *Estimation of total phenolics*

122 The TPC was estimated according to the method described by de Camargo et al. (2015). The results
123 were expressed as gallic acid equivalents per gram of sample on a dry weight basis.

124 *Isoflavone profile ultra performance liquid chromatography*

125 The isoflavone profile was evaluated according to a previous study (Falcão et al., 2018). The
126 concentration was expressed as μmol of isoflavone per gram of sample ($\mu\text{mol.g}^{-1}$) on a dry weight
127 basis.

128 *Radical scavenging activity*

129 The radical scavenging activity towards the DPPH radical modified for microplate determination
130 (Melo et al., 2015), was employed to evaluate the effect of ultrasound on the antioxidant potential
131 of soybeans. Likewise, the radical scavenging activity towards the ABTS radical cation, adapted for

132 microplate (Melo et al., 2015), was used to confirm the effect of low-intensity ultrasound pre-
133 treatment prior to soaking. The results were expressed as μmol trolox equivalents per gram of
134 sample on a dry weight basis.

135 *Anti-inflammatory activity*

136 *Cell culture*

137 RAW 264.7 macrophages transfected with the NF- κ B-pLUC gene were cultured in RPMI medium
138 supplemented with 10% of fetal bovine serum (FBS), 100 U/mL of penicillin and 100 $\mu\text{g/mL}$ of
139 streptomycin. Cells were cultured on a CO₂ incubator at 37 °C with 5% humidity.

140 *Viability assay (MTT)*

141 Cell viability was determined in the presence of samples obtained from 8 and 6 assays in triplicate
142 by the MTT method (3-methyl-[4-(5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide).
143 Briefly, cells (10^5 cells/well) were adhered to 96-wells plates for 24 hours with supplemented
144 RPMI. After adhesion, supernatant was discarded and phenolic extracts were added at 1, 10 and 100
145 $\mu\text{g/mL}$ diluted in unsupplemented RPMI. Treatment was carried out for 24 hours, afterwards, the
146 supernatant was discarded and in its place was added 0.01% MTT diluted in unsupplemented RPMI
147 for 3 hours. Finally, the supernatant was discarded and 200 μL of 100% DMSO were added. The
148 lysate absorbance was measured at 550 nm (FlexStation 3, Molecular Devices, Sunnyvale, CA,
149 USA) and viability was determined by comparing the absorbance of the control non-treated group
150 with the treated groups.

151 *NF- κ B activation assay*

152 Cells were adhered to 24-well plates at 3×10^5 cells/well density for 24 hours with supplemented
153 RPMI. After adhesion, supernatant was discarded and non-toxic treatment of soybeans obtained
154 from 8 and 6 assays were added to the wells at 100 $\mu\text{g/mL}$. Treatment was diluted in

155 unsupplemented RPMI. After 30 minutes of treatment, *Escherichia coli* LPS was added to each
156 well to initiate an inflammatory stimulus (except in the control group). Final concentration of LPS
157 was 10 ng/mL and stimulated cells were incubated for 4 hours. Later, supernatant was discarded
158 and cells were lysed with a 50 μ L aliquot of cold TNT solution (Tween 20 and TRIS NaCl buffer)
159 on ice for 20 minutes. Finally, a 20 μ L aliquot of the lysate were added in a 96-well white opaque
160 plate with 25 μ L of the luciferin reagent (Promega, Madison, WI, USA). Luminescence was then
161 measured (FlexStation 3, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) (Franchin et al. 2016).

162 *Statistical analysis*

163 The student's t-test ($p < 0.05$) was used to validate the models by comparing experimental and
164 predicted values for the response functions of TAC and TPC. The concentration of individual
165 isoflavone, as well as the scavenging and anti-inflammatory activities were evaluated by one-way
166 analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's ($p < 0.05$).

167 **Results and discussion**

168 *Multi-response optimisation of the effects of soybean ultrasound pre-treatment prior to soaking in*
 169 *relation to the total aglycone content (TAC) and total phenolic content (TPC)*

170 Response surface methodology was employed to optimize the parameters used during soybean
 171 ultrasound pre-treatment in order to increase the recovery of TAC and TPC. Regression coefficients
 172 (β) and analysis of variance (ANOVA) of TAC and TPC are shown in Table 2. The coefficients
 173 related to temperature (β_1) and ultrasound intensity (β_3) as well as their interaction (β_1 and β_3) were
 174 positive with respect to TAC recovery. Some coefficients were not significant (β_1^2 and β_3^2),
 175 however, they were maintained due to their contribution to the model (higher adjustment, R^2). The
 176 linear (β_1), and quadratic coefficients (β_1^2) and the interaction ($\beta_1\beta_2$ and $\beta_1\beta_3$) were significant with
 177 respect to TPC. Likewise, nonsignificant coefficients (β_3 e $\beta_2\beta_3$) which also contributed to adjust the
 178 TPC model by increasing R^2 , were therefore maintained in the model.

179 The lack of fit was not significant ($p > 0.05$) for both models and, according to the R^2 , 85 and 84%
 180 of data fitted the model obtained for TAC and TPC, respectively. Thus, the models obtained [(TAC
 181 = $0.21 + 0.03 x_1^* + 0.02 x_1^2 + 0.03 x_3^* + 0.01 x_3^2 + 0.03 x_1x_3^*$) and (TPC = $2.96 + 0.11x_1^* + 0.18x_1^{2*}$
 182 + $0.07x_3 + 0.17x_1x_2^* + 0.15x_1x_3^* + 0.12x_2x_3$)] can be used for predictive purposes. The highest TAC
 183 recovery (0.32 $\mu\text{mol/g}$ per gram of sample) occurred when soybeans were subjected to ultrasound at
 184 $X_1 = 55^\circ\text{C}$ and $X_3 = 24 \text{ W/cm}^2$. In contrast, at a lower ultrasound intensity ($X_3 = 6 \text{ W/cm}^2$), but at
 185 the same temperature, a lower TAC (0.21 $\mu\text{mol/g}$) was recovered, showing a reduction of 34% and
 186 supporting an intensity-response of the ultrasound treatment (Fig. 1a).

187 As for the TPC recovery (Fig 1b), the highest yield (3.75 mg GAE/g per gram) was obtained when
 188 the test samples were subjected to ultrasound treatment at $X_1 = 55^\circ\text{C}$, $X_2 = 25 \text{ min}$ and $X_3 = 24$
 189 W/cm^2 , which lends support to the results obtained for TAC. Furthermore, a lower TPC recovery
 190 also occurred when a lower ultrasound intensity ($X_3 = 6 \text{ W/cm}^2$) was employed. Similar to ionizing
 191 radiation, ultrasound generates free radicals during processing. However, according to the literature

192 (de Camargo, Regitano-dArce, Gallo, & Shahidi; 2015), gamma-irradiation can induce a positive
193 effect in the phenolic profile in a dose-dependent manner. A concentration decrease of esterified
194 phenolics with concurrent increase in the fraction containing free phenolics may be explained by
195 hydrolysis of the sugar moiety, which is similar to that observed in the present study. Furthermore,
196 Teh and Birch (2014) applied heat during ultrasound assisted-extraction of phenolic compounds
197 from hemp, flax and canola seed cakes and observed a higher extraction yield.

198 According to Shahidi and Yeo (2016), the concentration of insoluble-bound phenolics in fruits,
199 vegetables and legume/seeds may reach 60%. These insoluble-bound compounds are linked to the
200 cell wall of plant materials (e.g. pectin, cellulose, arabinoxylan and structural proteins) via covalent
201 bonds and, therefore, must be chemically or enzymatically hydrolyzed to play their role as bioactive
202 compounds. The presence of isoflavones in the aglycone form has already been reported in some
203 soybean cultivars (Zilic', Akilloğlu, Serpen, Peric, & Gökmen, 2013). The conversion of soluble
204 isoflavones into their corresponding aglycones is well established. However, considering the
205 literature (Zilic', Akilloğlu, Serpen, Peric, & Gökmen, 2013) and our results, ultrasound-induced
206 extraction of insoluble-bound isoflavone aglycones may be contemplated.

207 The overall desirability function was used for simultaneous optimization of response variables.
208 According to our results (Fig. 1c), the highest recovery of TAC ($0.30 \mu\text{mol/g}$) was found at $X_1 = 55$
209 $^\circ\text{C}$, $X_2 = 5$ to 25 min and $X_3 = 19.5$ to 24 W/cm^2 . The treatment 8 ($X_1 = 55 \text{ }^\circ\text{C}$, $X_2 = 15 \text{ min}$ and X_3
210 $= 24 \text{ W/cm}^2$) falls within these parameters (Table 1). The TAC recovery of the aforementioned
211 assay was $0.32 \mu\text{mol/g}$, which is not different from that of the estimated optimum condition ($p =$
212 0.73). Likewise, treatment 8 (TPC = 3.62 mg GAE/g) did not show any difference ($p = 0.60$) when
213 compared to TPC obtained under the optimum condition (3.75 mg GAE/g). Therefore, considering
214 the overall desirability function and statistical analysis, our proposed model can be used for
215 predictive purposes.

216

217 Effects of soybean ultrasound pre-treatment prior to soaking

218 The sample obtained during the treatment 8 ($X_1 = 55\text{ }^\circ\text{C}$, $X_2 = 15\text{ min}$ and $X_3 = 24\text{ W/cm}^2$) showed
219 higher TAC and TPC. Accordingly, this sample was selected for further experiments. Likewise, a
220 sample subjected to ultrasound under the same conditions ($55\text{ }^\circ\text{C}$, 15 min) but at a lower ultrasound
221 intensity (6 W/cm^2) as well as a control (devoid of treatment) were investigated.

222 Isoflavone profile

223 The present study was designed to evaluate the effects of ultrasound soybean pre-treatment in
224 maceration with respect to the major phenolic compounds of soybean and potential outcomes in
225 terms of bioactivity. Daidzein, glycitein, and daidzin and their respective conjugated forms are the
226 major phenolic compounds in soybean and their products. Malonylglucoside isoflavones made the
227 major isoflavone contribution (64.43%), which was followed by β -glucoside isoflavones (29.13%)
228 and aglycones (6.47%). Furthermore, no acetyl- β -glucoside was present. The results of this study
229 are in line with those of Lima et al. (2014).

230 The contents of malonylglucoside and β -glucoside isoflavones decreased upon ultrasound
231 processing while a significant concurrent increase in their respective aglycones was observed. At
232 the higher ultrasound intensity (24 W/cm^2), the concentration of malonylglucoside and β -glucoside
233 isoflavones decreased by 15 and 26%, respectively. In contrast, the concentration of genistein and
234 daidzein increased by 95 and 16%, respectively. Furthermore, an ultrasound intensity dependent
235 increase of total aglycones was observed in the present study. The literature data also suggests that
236 ultrasound may be used to decrease allergens in soybean products (Yang et al., 2015). Therefore,
237 ultrasound treatment may provide a feedstock with higher content of bioactive aglycones with
238 lower potential in allergenic reactions.

239

240

241 Radical scavenging activity

242 Much has been discussed about food processing and its outcome in terms of nutritional quality of
243 food and/or the effects in terms of food bioactives and related health effects. However, it is well
244 known that specific chemical compounds respond differently to each process as well as the
245 conditions employed. In this study, regardless of the method (ABTS or DPPH), ultrasound pre-
246 treatment induced a positive effect by increasing the radical scavenging activity of the test material
247 by showing an intensity dependent response (Table 3) and both exhibited a higher antioxidant
248 potential than that of the control. In fact, the scavenging activity of samples treated with ultrasound
249 at 24 W/cm² was 50 and 27% higher than that of samples treated at 6 W/cm² towards ABTS radical
250 cation and DPPH radical, respectively. Furthermore, even at a lower intensity (6 W/cm²), the
251 respective antiradical activity was 79 and 41% higher than that of the control.

252 The higher antiradical activity of samples subjected to ultrasound at 24 W/cm² is supported by the
253 higher TPC as well as higher TAC (Fig. 1). This is in line with the literature with respect to the
254 chemistry of phenolic compounds. A recent study by Yoshiara et al. (2018) demonstrated that
255 cotyledons, epicotyls, radicles, and hypocotyls from germinated soybeans also showed higher
256 antiradical activity, which was related to their higher aglycones contents (e.g. genistein). However,
257 as far as we know, this has not been reported for soybeans subjected to ultrasound. Because
258 oxidative stress and inflammatory responses are common to several chronic ailments (Zhang &
259 Tsao, 2016) such as type 2 diabetes, cancer, and cardiovascular diseases, the antiradical capacity
260 was used here as a screening method as demonstrated by using cell models described below.

261 *Anti-inflammatory activity*

262 Samples obtained from treatments 6 and 8 were also evaluated for their anti-inflammatory
263 activities. Initially, we determined the toxicity of the phenolic extracts to the macrophages. The
264 tested concentrations were non-toxic when compared to the non-treated control group (Veh; Fig. 2B
265 and C), indicating no cytotoxic effects at concentrations equal or lower than 100 µg/mL ($p>0.05$).

266 Therefore, we have tested the higher non-toxic concentration (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) on the LPS-stimulated
267 NF- κB activation assay. All treatments reduced the LPS-induced NF- κB activation ($p < 0.05$). The
268 treatment with the phenolic extract obtained from treatment 6 reduced the NF- κB activation by 84%
269 (Fig. 3). Similarly, the sample obtained from treatment 8 rendered phenolic extracts that reduced
270 the NF- κB activation by 86% (Fig. 3). Interestingly, extracts obtained from untreated samples
271 (control) showed to be significantly ($p < 0.05$) less effective than the extracts obtained from soybeans
272 subjected to ultrasound (treatment 8), since it reduced the NF- κB activation by 77% (Fig. 3).

273 Macrophages are a heterogeneous group of immune cells that exert important immune functions in
274 response to an insulting agent, such as bacterial infections. In general, these cells are scattered all
275 over the body as resident cells that act as sentinels, triggering a cascade of inflammatory mediators
276 when in the presence of a strange organism (Davies, Jenkins, Allen, & Taylor, 2013). Therefore,
277 macrophages are one of the most important first line defense under physiological conditions.
278 However, the exacerbated number or activity of macrophages is closely related to the aggravation
279 of several immune diseases, and the NF- κB activation is one of the most important routes in these
280 cases (Wynn et al., 2013). Hence, the inhibition of the NF- κB activation is a promising target to
281 treat inflammatory diseases and natural molecules able to affect the NF- κB activation are
282 interesting pharmacologic strategies to treat these diseases (Lazarini et al., 2016). Our results
283 demonstrate that soybean ultrasound (treatment 8) increases the anti-inflammatory potential of the
284 soybean sample. Therefore, one can infer that ultrasound pre-treated soybeans samples may serve
285 as a better source of inflammatory molecules compared to the control which may be attributed to
286 their improved concentration of isoflavones as aglycones.

287 **Conclusion**

288 Ultrasound pre-treated soybeans showed increased total phenolic content and improved
289 concentration of isoflavones as aglycones. Phenolic extracts from treated samples also showed
290 higher antioxidant and anti-inflammatory activities compared to those obtained from untreated

291 samples. Oxidative stress and inflammatory responses are common to several chronic ailments such
292 as type 2 diabetes, cancer, and cardiovascular diseases. Therefore, ultrasound pre-treated soybeans
293 may be a better option to counteract and/or prevent these diseases. However, due to the novelty of
294 this study, further confirmation *in vivo* is deemed necessary. Lastly, the term "processed foods" has
295 been the subject of controversy and has been confused with "ultra-processed foods", but this
296 contribution demonstrated that ultrasound pre-treatment benefits the raw material. At this stage, it is
297 possible to suggest that ultrasound pre-treated soybeans has a good potential to be employed in the
298 functional foods industry as a functional ingredient.

299

300 **Acknowledgments**

301 H. G. Falcão (Ph.D. fellowship), M. B. R. Silva (Ph.D fellowship), and A. C. de Camargo
302 (Postdoctoral fellowship) acknowledge CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de
303 Nível Superior – Brazil). M. Franchin (process 2016/15563-9) and P. L. Rosalen (process
304 2017/09898-0) acknowledge FAPESP (São Paulo Research Foundation). One of us (F. Shahidi)
305 thanks the Natural Science and Engineering Research Council (NSERC) of Canada for partial
306 financial support. E. Ida is a CNPq research fellow (process #305397/2015-0).

307 **REFERENCES**

- 308 Benvenuto, M., Mattera, R., Taffera, G., Giganti, M. G., Lido, P., Masuelli, L., ... Bei, R. (2016).
309 The potential protective effects of polyphenols in asbestos-mediated inflammation and
310 carcinogenesis of mesothelium. *Nutrients*, 8, 275–298.
- 311 Britz, S. J., Schomburg, C. J., & Kenworthy, W. J. (2011). Isoflavones in seeds of field-grown
312 soybean : Variation among genetic lines and environmental effects. *Journal of the American*
313 *Oil Chemists' Society*, 88, 827–832.
- 314 Chung, M. J., Sung, N., Park, C., Kweon, D., Mantovani, A., Moon, T.-W., ... Park, K.-H. (2008).
315 Antioxidative and hypocholesterolemic activities of water-soluble puerarin glycosides in
316 HepG2 cells and in C57 BL / 6J mice. *European Journal of Pharmacology*, 578, 159–170.
- 317 de Camargo, A. C., Regitano-dArce, M. A. B., Gallo, C. R., & Shahidi, F. (2015). Gamma-
318 irradiation induced changes in microbiological status , phenolic profile and antioxidant
319 activity of peanut skin. *Journal of Functional Foods*, 12, 129–143.
- 320 de Lima, F. S., & Ida, E. I. (2014). Optimisation of soybean hydrothermal treatment for the
321 conversion of β -glucoside isoflavones to aglycones. *LWT - Food Science and Technology*, 56,
322 232–239.
- 323 de Lima, F. S., Kurozawa, L. E., & Ida, E. I. (2014). The effects of soybean soaking on grain
324 properties and isoflavones loss. *LWT - Food Science and Technology*, 59, 1274–1282.
- 325 Falcão, H. G., Handa, C. L., Silva, M. B. R., de Camargo, A. C., Shahidi, F., Kurozawa, L. E., &
326 Ida, E. I. (2018). Soybean ultrasound pre-treatment prior to soaking affects β -glucosidase
327 activity, isoflavone profile and soaking time. *Food Chemistry*, 269, 404–412.
- 328 Franchin, M., Rosalen, P. L., Cunha, M. G. da, Silva, R. L., Colón, D. F., Bassi, G. S., ... Cunha, T.
329 M. (2016). Cinnamoyloxy-mammeisin isolated from *geopropolis attenuates inflammatory*

- 330 process by inhibiting cytokine production: Involvement of MAPK, AP-1, and NF- κ B.
331 *Journal of Natural Products*, 79, 1828–1833.
- 332 García-Lafuente, A., Guillamón, E., Villares, A., Rostagno, M. A., & Martínez, A. J. (2009).
333 Flavonoids as anti-inflammatory agents : implications in cancer and cardiovascular disease.
334 *Inflammation Research*, 58, 537–552.
- 335 Granato, D., Calado, V. M. de A., & Jarvis, B. (2014). Observations on the use of statistical
336 methods in Food Science and Technology. *Food Research International*, 55, 137–149.
- 337 Handa, C. L., Couto, U. R., Vicensoti, A. H., Georgetti, S. R., & Ida, E. I. (2014). Optimisation of
338 soy flour fermentation parameters to produce β -glucosidase for bioconversion into aglycones.
339 *Food Chemistry*, 152, 56–65.
- 340 Jambrak, A. R., Lelas, V., Mason, T. J., Krešić, G., & Badanjak, M. (2009). Physical properties of
341 ultrasound treated soy proteins. *Journal of Food Engineering*, 93, 386–393.
- 342 Larkin, T., Price, W. E., & Astheimer, L. E. E. (2008). The key importance of soy isoflavone
343 bioavailability to understanding health benefits. *Critical Reviews in Food Science and*
344 *Nutrition*, 552, 538–552.
- 345 Lazarini, J. G., Franchin, M., Infante, J., Paschoal, J. A. R., Freires, I. A., de Alencar, S. M., &
346 Rosalen, P. L. (2016). Anti-inflammatory activity and polyphenolic profile of the
347 hydroalcoholic seed extract of *Eugenia leitonii*, an unexplored Brazilian native fruit. *Journal*
348 *of Functional Foods*, 26, 249–257.
- 349 Melo, P. S., Massarioli, A. P., Denny, C., dos Santos, L. F., Franchin, M., Pereira, G. E., ...
350 Alencar, S. M. (2015). Winery by-products: Extraction optimization, phenolic composition
351 and cytotoxic evaluation to act as a new source of scavenging of reactive oxygen species.
352 *Food Chemistry*, 181, 160–169.

- 353 Messina, M. (2016). Soy and health update : Evaluation of the clinical and epidemiologic literature.
354 *Nutrients*, 8, 754
- 355 Omoni, A. O., & Aluko, R. E. (2005). Soybean foods and their Benefits: Potential mechanisms of
356 action. *Nutrition Reviews*, 63, 272-283.
- 357 Nipornram, S., Tochampa, W., & Rattanatraiwong, P. (2018). Optimization of low power
358 ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from mandarin (*Citrus reticulata*
359 Blanco cv . Sainampung) peel. *Food Chemistry*, 241, 338–345.
- 360 Pan, M., Lai, C., & Ho, C. (2010). Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids. *Food &*
361 *Function*, 1, 15–31.
- 362 Paucar-Menacho, L. M., Berhow, M. A., Marcos, J., Mandarino, G., Gonzalez, E., Mejia, D., & Kil,
363 Y. (2010). Optimisation of germination time and temperature on the concentration of
364 bioactive compounds in Brazilian soybean cultivar BRS 133 using response surface
365 methodology. *Food Chemistry*, 119, 636–642.
- 366 Perez-Vizcaino, F., & Duarte, J. (2010). Molecular aspects of medicine flavonols and
367 cardiovascular disease. *Molecular Aspects of Medicine*, 31, 478–494.
- 368 Quinhone Júnior, A., & Ida, E. I. (2015). Profile of the contents of different forms of soybean
369 isoflavones and the effect of germination time on these compounds and the physical
370 parameters in soybean sprouts. *Food Chemistry*, 166, 173–178.
- 371 Rahman, J., de Camargo, A. C., & Shahidi, F. (2017). Phenolic and polyphenolic profiles of chia
372 seeds and their *in vitro* biological activities. *Journal of Functional Foods*, 35, 622–634.
- 373 Rostagno, A., Palma, M., & Barroso, C. (2003). Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones.
374 *Journal of Chromatography A*, 1012, 119–128.

- 375 Shahidi, F., & de Camargo, A. C. (2016). Tocopherols and tocotrienols in common and emerging
376 dietary sources: Occurrence, applications, and health benefits. *International Journal of*
377 *Molecular Sciences*, *17*, 1–29.
- 378 Shahidi, F., & Yeo, J. (2016). Insoluble-bound phenolics in food. *Molecules*, *21*, 1–22.
- 379 Siow, R. C. M., & Mann, G. E. (2010). Dietary isoflavones and vascular protection: Activation of
380 cellular antioxidant defenses by SERMs or hormesis? *Molecular Aspects of Medicine*, *31*,
381 468–477.
- 382 Siti, H. N., Kamisah, Y., & Kamsiah, J. (2015). The role of oxidative stress, antioxidants and
383 vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). *Vascular Pharmacology*, *71*, 40–
384 56.
- 385 Szabó, O. E., & Csiszár, E. (2013). The effect of low-frequency ultrasound on the activity and
386 efficiency of a commercial cellulase enzyme. *Carbohydrate Polymers*, *98*, 1483–1489.
- 387 Teh, S., & Birch, E. J. (2014). Ultrasonics sonochemistry effect of ultrasonic treatment on the
388 polyphenol content and antioxidant capacity of extract from defatted hemp, flax and canola
389 seed cakes. *Ultrasonics Sonochemistry*, *21*, 346–353.
- 390 Villares, A., Rostagno, M. A., García-Lafuente, A., Guillamón, E., & Martínez, J. A. (2011).
391 Content and profile of isoflavones in soy-based foods as a function of the production process.
392 *Food and Bioprocess Technology*, *4*, 27–38.
- 393 Wada, K., Nakamura, K., Tamai, Y., Tsuji, M., Kawachi, T., Hori, A., & Takeyama, N. (2013). Soy
394 isoflavone intake and breast cancer risk in Japan: From the Takayama study. *International*
395 *Journal of Cancer*, *133*, 952–960.
- 396

- 397 Wynn, T. A., Chawla, A., & Pollard, J. W. (2013). Macrophage biology in development,
398 homeostasis and disease. *Nature*, *496*, 445-55.
- 399 Yang, C. S., Ho, C., Zhang, J., Wan, X., Zhang, K., & Lim, J. (2018). Antioxidants: differing
400 meanings in food science and health science. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,
401 *66*, 3063–3068.
- 402 Yang, H., Gao, J., Yang, A., & Chen, H. (2015). The ultrasound-treated soybean seeds improve
403 edibility and nutritional quality of soybean sprouts. *Food Research International*, *77*, 704–
404 710.
- 405 Yoshiara, L. Y., Madeira, T. B., Delarozza, F., da Silva, J. B., & Ida, E. I. (2012). Optimization of
406 soy isoflavone extraction with different solvents using the simplex-centroid mixture design.
407 *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, *63*, 978–986.
- 408 Yoshiara, L. Y., Mandarino, J. M. G., Carrão-Panizzi, M. C., Madeira, T. B., da Silva, J. B., de
409 Camargo, A. C., ... Ida, E. I. (2018). Germination changes the isoflavone profile and
410 increases the antioxidant potential of soybean. *Journal of Food Bioactives*, *3*, 144-150.
- 411 Yu, Z. L., Zeng, W. C., Zhang, W. H., Liao, X. P., & Shi, B. (2014). Effect of ultrasound on the
412 activity and conformation of α -amylase, papain and pepsin. *Ultrasonics Sonochemistry*, *21*,
413 930–936.
- 414 Zhang, H., & Tsao, R. (2016). Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-
415 inflammatory effects. *Current Opinion in Food Science*, *8*, 33-42.
- 416 Zilic', S., Akıllıoglu, H. G., Serpen, A., Peric, P., & Gökmen, V. (2013). Comparisons of phenolic
417 compounds , isoflavones , antioxidant capacity and oxidative enzymes in yellow and black
418 soybeans seed coat and dehulled bean. *European Food Research and Technology*.
- 419

420 **Table 1**
 421 Box Behnken design with coded (x) and uncoded (X) independent variables used for the ultrasound
 422 pre-treatment of soybeans and their response functions

Treatment	Assays conditions						Response functions	
	Coded variables			Uncoded variables			TAC ($\mu\text{mol/g}$) ^a	TPC (mg GAE/g) ^a
	x_1	x_2	x_3	X_1	X_2	X_3		
1	-1	-1	0	35	5	15	0.19	3.18
2	1	-1	0	55	5	15	0.28	2.99
3	-1	1	0	35	25	15	0.21	2.85
4	1	1	0	55	25	15	0.23	3.34
5	-1	0	-1	35	15	6	0.18	3.04
6	1	0	-1	55	15	6	0.18	3.03
7	-1	0	1	35	15	24	0.20	3.04
8	1	0	1	55	15	24	0.32	3.62
9	0	-1	-1	45	5	6	0.16	3.15
10	0	1	-1	45	25	6	0.19	2.78
11	0	-1	1	45	5	24	0.20	2.91
12	0	1	1	45	25	24	0.22	3.01
13	0	0	0	45	15	15	0.19	2.90
14	0	0	0	45	15	15	0.22	2.95
15	0	0	0	45	15	15	0.20	3.03
16	0	0	0	45	15	15	0.22	----

423 x_1 , x_2 , and x_3 are coded independent variables for X_1 (temperature, °C), X_2 (exposure time, min) and X_3 (ultrasound
 424 intensity, W/cm²), respectively.

425 ^a Data represent mean values (n = 3). TAC: total aglycone content (daidzein + genistein) and TPC: total phenolic
 426 content. Isoflavones are expressed as μmol of TAC/gram of sample on a dry weight basis. TPC is expressed as
 427 mg of gallic acid equivalents/gram of sample on a dry weight basis.

428 **Table 2**429 Estimated coefficients and the analysis of variance for response functions of total aglycone contents
430 (TAC) and total phenolic contents (TPC)

Parameters	Estimated coefficients (β) ^a		Significance of the coefficients ^b	
	TAC	TPC	TAC	TPC
<i>Intercept</i>				
β_0	0.207426	2.961381	0.000014	0.000067
<i>Linear</i>				
β_1	0.027149*	0.108574*	0.013097	0.040709
β_2	-----	-----	-----	-----
β_3	0.029429*	0.072593	0.010464	0.084795
<i>Quadratic</i>				
β_1^2	0.022887	0.175045*	0.050857	0.033921
β_2^2	-----	-----	-----	-----
β_3^2	-0.011976	-----	0.196751	-----
<i>Interaction</i>				
$\beta_1 \beta_2$	-----	0.171071*	-----	0.033185
$\beta_1 \beta_3$	0.028876*	0.148093*	0.028240	0.043566
$\beta_2 \beta_3$	-----	0.116720	-----	0.067494
Lack of fit (p) ^c	N.S.	N.S.	0.34	0.23
R^2 ^c			0.85	0.84
R^2 adjusted ^c			0.78	0.72
<i>MS Pure Error</i>			0.0002098	0.004087

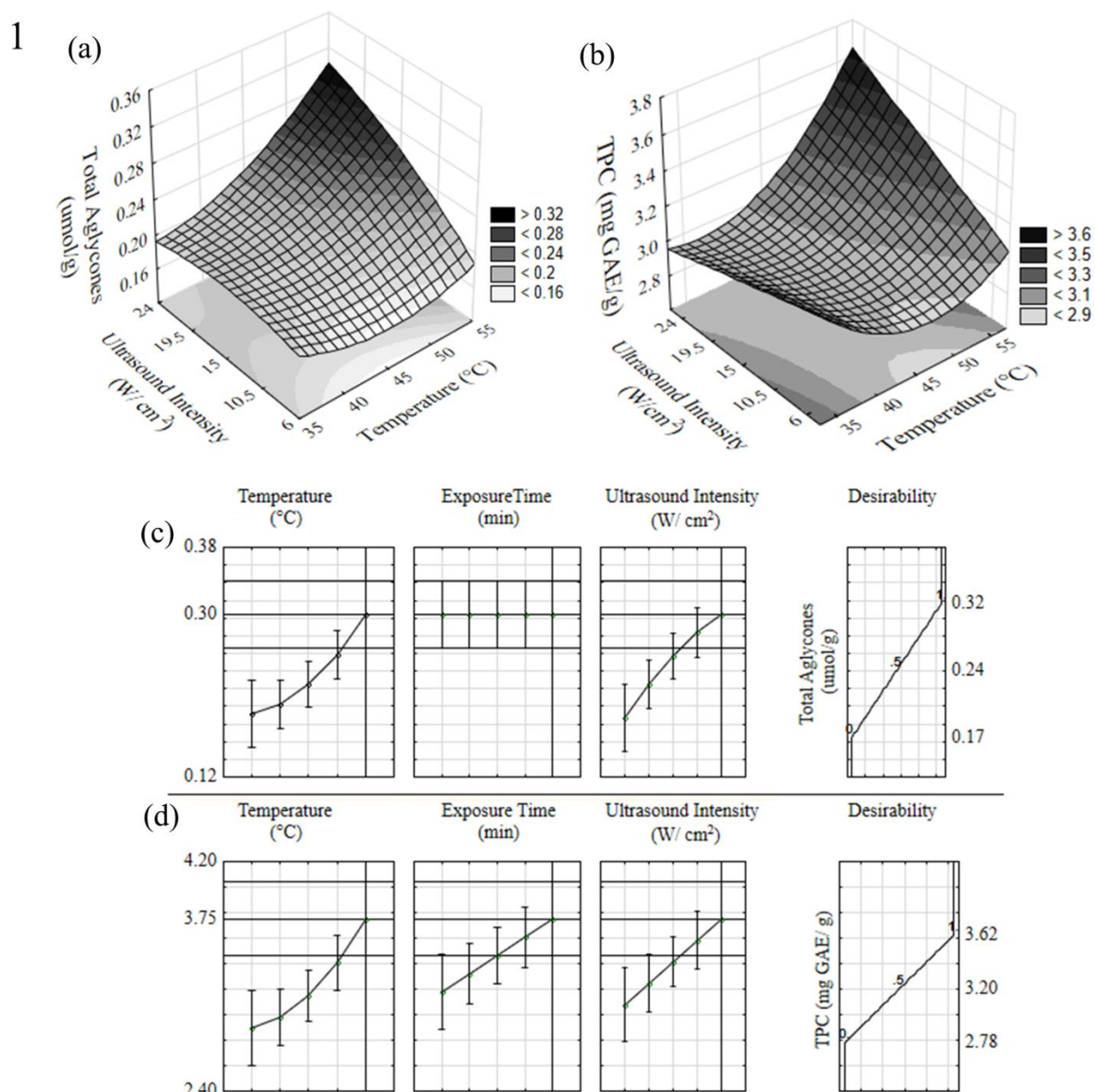
431 ^a Estimated coefficients for: TAC = daidzein + genistein. TAC is expressed as μmol of TAC/gram of
432 sample on dry weight basis. TPC is expressed as mg of gallic acid equivalents/gram of sample on dry
433 weight basis. ^b Significant at 5%. ^c Determination coefficients (R^2 and R^2 adjusted) and lack of fit (p)
434 of the adjusted models. β_1 , β_2 , and β_3 (subscript numbers) stands for temperature ($^{\circ}\text{C}$), exposure time
435 (min), and ultrasound intensity (W/cm^2), respectively. (-----) non-significant terms removed from
436 the models. N.S. No significant coefficients.

437 **Table 3**
 438 Isoflavone contents ($\mu\text{mol /g DW}$) and antiradical activity ($\mu\text{mol TE/g DW}$) as affected by
 439 ultrasound soybean pre-treatment in maceration

	Treatment		
	Control	6 W/cm ² *	24 W/cm ² *
<i>Isoflavone contents</i>			
daidzin	0.344 ± 0.045a	0.264 ± 0.004a	0.238 ± 0.002a
glycitin	0.311 ± 0.006a	0.281 ± 0.011b	0.294 ± 0.002ab
genistin	0.353 ± 0.004a	0.276 ± 0.006b	0.212 ± 0.002c
total β -glucosides	1.008 ± 0.043a	0.821 ± 0.001b	0.744 ± 0.002b
malonyldaidzin	0.683 ± 0.004a	0.638 ± 0.024ab	0.614 ± 0.008b
malonylglycitin	0.434 ± 0.041a	0.371 ± 0.010a	0.405 ± 0.006a
malonylgenistin	1.113 ± 0.002a	0.910 ± 0.004b	0.878 ± 0.016b
total malonylglucosides	2.230 ± 0.043a	1.919 ± 0.038b	1.898 ± 0.018b
daidzein	0.148 ± 0.003a	0.092 ± 0.002b	0.171 ± 0.012a
genistein	0.075 ± 0.003b	0.085 ± 0.001b	0.146 ± 0.005a
total aglycones	0.224 ± 0.001b	0.177 ± 0.003c	0.317 ± 0.016a
Total isoflavones	3.461 ± 0.087a	2.917 ± 0.039b	2.958 ± 0.032b
<i>Antiradical activity</i>			
DPPH	2165 ± 286c	3048 ± 167b	3634 ± 244a
ABTS	120.0 ± 14.2c	214.8 ± 3.08b	275.3 ± 13.0a

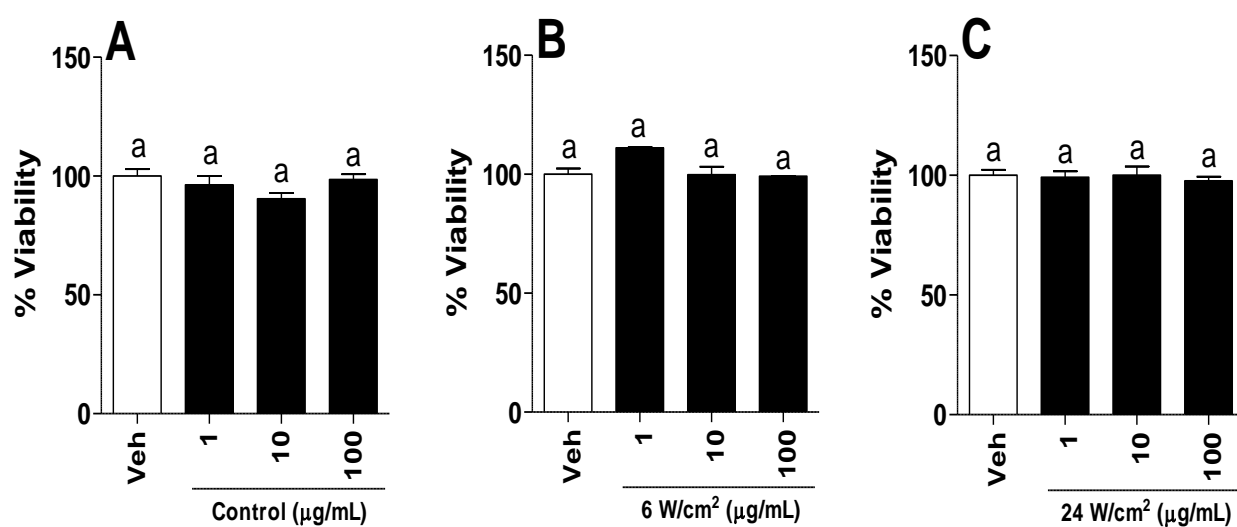
440 Data represent mean values for each sample \pm standard deviation (n = 2). Means followed by
 441 the same letters within a row are not significantly different ($\alpha = 0.05$). *Ultrasound pre-
 442 treatment at 55°C and 15 min. Glycitein was not detected in any samples. DW, dry weigh;
 443 TE, Trolox equivalent.
 444

445 **Figure captions**
 446



447

448 **Fig. 1** – Responses Surface plotting as a function of temperature (X_1), and ultrasound
 449 intensity (X_3) from ultrasound soybeans pre-treatment: (a) Total aglycone content (TAC) =
 450 daidzein + genistein; and (b) TPC is total phenolic content . (c) Profile for predicted values
 451 and desirability in the condition of maximum responses for TAC [μmol of TAC/gram of
 452 sample on a dry weight basis]; and (d) TPC [mg of gallic acid equivalents/gram of sample on
 453 a dry weight basis].

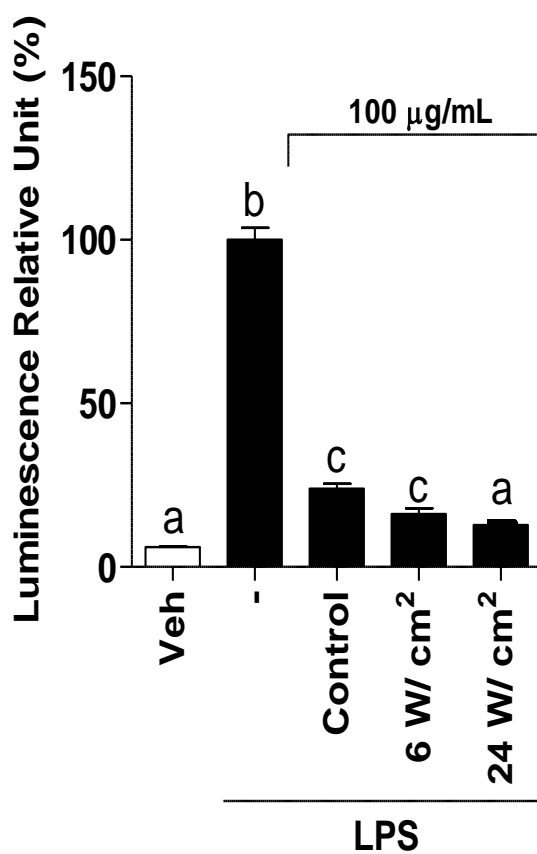


454

455 **Fig. 2** – Cell viability by MTT assay of macrophages with the samples at different
456 concentrations or vehicle (veh) for 24 h (37 °C, 5% of CO₂). The data were expressed as the
457 mean (n = 3) ± SD. Letters different indicate statistical difference ($p < 0.05$, Tukey's test).

458

459



460

461 **Fig. 3** – NF-κB activation assay in macrophages pre-treated with the samples at the
462 concentration of 100 μg/ mL or vehicle (veh), 30 min prior to stimulation with LPS (10
463 ng/mL). Letters different indicate statistical difference ($p < 0.05$, Tukey's test).

464

6. CONCLUSÕES

Os efeitos das condições do pré-tratamento com ultrassom na maceração da soja indicaram que a atividade de β -glicosidases e conteúdos de daidzina, malonildaidzina, daidzeína, genistina, genisteína, glicitina e malonilglicitina apresentaram diferentes efeitos linear, quadrático e de interação.

A temperatura e intensidade de ultrassom apresentaram efeitos significativos no aumento do teor das isoflavonas agliconas (daidzeína e genisteína) e a intensidade de ultrassom sobre a redução do teor das isoflavonas β -glicosídicas (daidzina e genistina).

A otimização multi-resposta das condições do pré-tratamento da soja possibilitou obter soja macerada com alto conteúdo de isoflavonas na forma de agliconas.

As melhores condições otimizadas do pré-tratamento com ultrassom na maceração da soja foi estabelecida e ocorreu a 55°C por 5 minutos e intensidade de ultrassom de 19,5W.cm².

A soja macerada e otimizada demonstrou ser uma matéria-prima promissora devido ao seu menor tempo de maceração (2 h) e baixa intensidade de ultrassom para obtenção de soja com maior teor de umidade, menor dureza e teor significativo de isoflavonas na forma aglicona.

As condições do pré-tratamento com ultrassom na maceração da soja aumentou o teor de isoflavonas agliconas totais e compostos fenólicos totais e os grãos com maior teor destes compostos apresentaram maior capacidade antioxidante e atividade anti-inflamatória.

O pré-tratamento com ultrassom na maceração da soja pode ser utilizado como uma tecnologia com grande potencial para obter grãos com elevado teor de compostos bioativos e com reduzido tempo de maceração que pode ser empregado como um ingrediente funcional na indústria de alimentos.

ANEXO 1 – Autorização da editora Elsevier para incluir na tese a versão impressa do artigo intitulado “Soybean ultrasound pre-treatment prior to soaking affects β -glucosidase activity, isoflavone profile and soaking time”.



Permissions Helpdesk <permissionshelpdesk@elsevier.com>
Qui 25/10/2018, 18:16
Você



Dear Heloisa,

As an Elsevier journal author, you retain the right to Include the article in a thesis or dissertation (provided that this is not to be published commercially) whether in full or in part, subject to proper acknowledgment; see <https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright/personal-use> for more information. As this is a retained right, no written permission from Elsevier is necessary.

If I may be of further assistance, please let me know.

Best of luck with your thesis and best regards,
Laura

Laura Stingelin
Permissions Helpdesk Associate
ELSEVIER | Global E-Operations Books
+1 215-239-3867 office
l.stingelin@elsevier.com
Contact the Permissions Helpdesk
+1 800-523-4069 x3808 | permissionshelpdesk@elsevier.com

From: Heloisa Gabriel Falcão <helo_falcao_88@hotmail.com>
Sent: Wednesday, October 24, 2018 1:33 PM
To: Permissions Helpdesk <permissionshelpdesk@elsevier.com>
Subject: Request Permission - use in doctoral thesis

*** External email: use caution ***

Dear

We published an article in Food Chemistry Journal 269 (2018) 404–412, in July 2018 entitled: "Soybean ultrasound pre-treatment prior to soaking affects β -glucosidase activity, isoflavone profile and soaking time."

I am writing to obtain permission to include this print work in my doctoral Thesis.

As Elsevier holds to copyright of this work, i would like to know how I can obtain this written approval so that I can include this study in my Thesis.

Regards

Heloísa Gabriel Falcão

ANEXO 2 – Comprovante de submissão do artigo intitulado “Ultrasound soybean pre-treatment in maceration increases the content of isoflavones as aglycones, total phenolics, antioxidant potential and anti-inflammatory activities”.

Elsevier Editorial System(tm) for Food
Chemistry + OA Mirror
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Ultrasound soybean pre-treatment in maceration increases the content of isoflavones as aglycones, total phenolics, antioxidant potential and anti-inflammatory activities

Article Type: Research Article (max 7,500 words)

Keywords: sonication; hydrothermal processing; soybean flavonoids; antioxidant activity; anti-inflammatory activity; emergent technology

Corresponding Author: Mr. Adriano Costa de Camargo, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: University of São Paulo

First Author: Heloisa G Falcão

Order of Authors: Heloisa G Falcão; Mariah Benine B Ramos Silva; Adriano Costa de Camargo, Ph.D.; Fereidoon Shahidi; Marcelo Franchin; Pedro L Rosalen; Severino M Alencar; Louise E Kurozawa; Elza I Ida

Abstract: Soybean isoflavones as aglycones usually exhibit greater biological activities than their conjugates. The effect of ultrasound prior to maceration of soybean was investigated in this study. The total phenolic content as well as the recovery of isoflavone aglycones was screened by using the Box-Benhken design. Contrasting samples were investigated for their antioxidant potential and anti-inflammatory activities using RAW 264.7 macrophages. Ultrasound pre-treated soybeans (55 °C, 25 min and 24 W/cm²) showed greater total phenolic content and isoflavone aglycones compared to the control and this translated to higher antioxidant potential and anti-inflammatory activities. The term "processed foods" has occasionally been considered controversial because it has been confused with "ultra-processed foods", which may have a negative connotation. However, this contribution demonstrates the beneficial effects of pre-treatment of soybeans which provides a better feedstock for the functional food industry and as a functional ingredient.