Universidade Estadual de Londrina

JANAÍNA DE CARVALHO ANDRADE

EFEITOS DOS PARÂMETROS DE PROCESSAMENTO TÉRMICO DE FARINHA DE SOJA INTEGRAL SOBRE A CONVERSÃO DE ISOFLAVONAS E INATIVAÇÃO DOS INIBIDORES DE TRIPSINA

Londrina
2015

JANAÍNA DE CARVALHO ANDRADE

EFEITOS DOS PARÂMETROS DE PROCESSAMENTO TÉRMICO DE FARINHA DE SOJA INTEGRAL SOBRE A CONVERSÃO DE ISOFLAVONAS E INATIVAÇÃO DOS INIBIDORES DE TRIPSINA

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

Orientador: Profa. Dra. Elza Iouko Ida

Londrina
2015

Catalogação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

A553e Andrade, Janaína de Carvalho.
Efeitos dos parâmetros de processamento térmico de farinha de soja integral sobre a conversão de isoflavonas e inativação dos inibidores de tripsina / Janaína de Carvalho Andrade. – Londrina, 2015.
72 f. : il.

Orientador: Elza Iouko Ida.
Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) − Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2015.
Inclui bibliografia.

1. Soja – Processamento – Teses. 2. Soja – Produtos – Teses. 3. Isoflavonas – Teses. 4. Farinha de soja – Teses. 5. Inibidores da tripsina – Teses. 6. Soja – Teor proteico – Teses. I. Ida, Elza Iouko. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. III. Título.

CDU 664.6/.7

JANAÍNA DE CARVALHO ANDRADE

EFEITOS DOS PARÂMETROS DE PROCESSAMENTO TÉRMICO DE FARINHA DE SOJA INTEGRAL SOBRE A CONVERSÃO DE ISOFLAVONAS E INATIVAÇÃO DOS INIBIDORES DE TRIPSINA

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

BANCA EXAMINADORA

_____

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

_____

Profa Dra Mara Lúcia Luiz Ribeiro
Universidade Estadual de Londrina – UEL

_____

Dr Marcelo Alvares de Oliveira
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa

Londrina, 27 de março de 2015

Dedico

A Deus, pela luz guia presente em cada instante da minha vida. Aos meus pais, Ana Maria e Messias, pela educação formal, moral e espiritual. Aos meus irmãos, Jonas e Vinícius, e sobrinhos, Beatriz e Miguel, por trazerem leveza e alegria aos meus dias.
Ao meu amor Sérgio, pela parceria incondicional.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Elza Iouko Ida, pela presença e orientação constantes, sem o que não seria possível a execução e conclusão deste trabalho. Muito obrigada pelos ensinamentos, dedicação e paciência.

Aos meus amados amigos, Mariah Benine e Lucas Caldeirão, pela companhia diária e apoio em todos os momentos. Vocês fizeram com que este período da minha vida fosse ainda mais feliz.

Aos colegas Alécio Quinhone Júnior, Cíntia Ladeira Handa, Daniele C. B. Honorato e Tahis R. Baú, pelo carinho e colaboração. Em especial, ao Fernando Sanches de Lima, pela generosidade com que compartilhou tempo e conhecimento.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da UEL, pela contribuição ao meu desenvolvimento intelectual e pessoal. Em especial ao Prof. Dr. Fábio Yamashita pelo apoio no tratamento dos dados e Prof. Dra. Louise Emy Kurozawa e Pós-Doutoranda Josemeyre B. da Silva, pelo apoio na execução do projeto.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Soja, Londrina-PR, em especial ao pesquisador José Marcos Gontijo Mandarino, pela doação de sementes da cultivar de soja utilizada e apoio na execução do projeto.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de estudos.

À Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná e CNPq, por meio do Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX), pelo apoio financeiro parcial na execução deste projeto.

ANDRADE, J. C. **Efeitos dos parâmetros de processamento térmico de farinha de soja integral sobre a conversão de isoflavonas e inativação dos inibidores de tripsina.** 2015. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2015.

RESUMO

O processamento térmico é uma das operações mais utilizadas, tanto na indústria quanto no preparo de produtos da soja em pequena escala. É capaz de alterar as isoflavonas, que são destacadas pelos seus benefícios à saúde, e os inibidores de tripsina, conhecidos por seu efeito anti-nutricional. O objetivo deste trabalho foi investigar a influência do tratamento térmico da farinha de soja integral (FSI) sobre a conversão de isoflavonas e inativação dos inibidores de tripsina, visando à obtenção de FSI com maior conversão de isoflavonas e reduzida atividade de inibidores de tripsina. Os grãos de soja foram moídos e a FSI foi submetida ao tratamento em estufa, utilizando o delineamento experimental 32 cujas variáveis independentes foram a temperatura e tempo de tratamento térmico e as funções respostas foram o teor das diferentes formas de isoflavonas e a atividade residual de inibidores de tripsina. As diferentes formas de isoflavonas foram quantificadas por cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE). A atividade de inibidores de tripsina foi determinada utilizando o substrato benzoyl-DL-arginine 4-nitroanilide hydrochloride (BAPNA) e quantificada por espectrofotometria. Modelos matemáticos foram estabelecidos e poderão ser utilizados na definição do tratamento térmico para obtenção de FSI com conversão de isoflavonas e redução na atividade de inibidores de tripsina. O tratamento térmico da FSI em estufa alterou o teor e perfil das diferentes formas de isoflavonas, sendo que a 200oC por 20 min ocorreu maior conversão das isoflavonas malonilglicosídeos em acetilglicosídeos, β-glicosídeos e agliconas, bem como maior redução na atividade de inibidores de tripsina.

Palavras-chave: Isoflavonas. Inibidores de tripsina. Farinha de soja. Calor seco.

ANDRADE, J. C. **Effects of thermal processing parameters of whole soybean flour on the conversion of isoflavones and inactivation of trypsin inhibitors.** 2015. 72 p. Dissertation (Master´s Degree in Food Science) – Londrina State University. Londrina, 2015.

ABSTRACT

The thermal treatment process is one of the most used operations, both in industry and in the small-scale preparation of soy products. It is able to change the isoflavones, highlighted for their health benefits, and trypsin inhibitors, known for their anti-nutritional effect. The aim of this work was to evaluate the effect of the thermal treatment of whole soybean flour (WSF) on the conversion of isoflavones and the inactivation of trypsin inhibitors, in order to obtain WSF with higher conversion of isoflavones and reduced activity of trypsin inhibitors. Soybeans were ground and whole soybean flour (WSF) was obtained and subjected to heat treatment in an oven according to a 32 experimental design, whose independent variables were temperature and time of heat treatment and the response functions were determined as the contents of different isoflavone forms and the residual activity of trypsin inhibitors. Isoflavones were quantified by ultra performance liquid chromatography (UPLC). The trypsin inhibitor activity was determined using benzoyl-DL-arginine 4-nitroanilide hydrochloride substrate (BAPNA) and by spectrophotometry. The thermal treatment in the oven altered the content and profile of the different isoflavone forms. At 200°C for 20 min, there was a higher conversion of malonylglycosides to acetylglycosides, β-glycosides and aglycones and a significant reduction in the activity of trypsin inhibitors. Mathematical models were established to estimate the process parameters in obtaining the WSF with isoflavone conversion and reduction in trypsin inhibitor activity.

Key-words: Isoflavones. Trypsin inhibitors. Soybean flour. Dry heat.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Forma química dos flavonoides.....17
Figura 2 – Estrutura das isoflavonas agliconas 18
Figura 3 – Estrutura das isoflavonas glicosídeos 18
Figura 4 – Fluxograma de produção de farinha de soja 23
Figura 5 – Influência do calor seco ou úmido na conversão e degradação de quatro formas de isoflavonas 25

ARTIGO: TRATAMENTO TÉRMICO DA FARINHA DE SOJA INTEGRAL SOBRE A CONVERSÃO DE ISOFLAVONAS E INATIVAÇÃO DE INIBIDORES DE TRIPSINA

Figura 1 – Superfície de resposta e perfil de desejabilidade para malonildaidzina, sendo x_1 = temperatura e x_2 = tempo 66
Figura 2 – Superfície de resposta e perfil de desejabilidade para daidzina, sendo x_1 = temperatura e x_2 = tempo 67
Figura 3 – Superfície de resposta e perfil de desejabilidade para malonilgenistina, sendo x_1 = temperatura e x_2 = tempo 68
Figura 4 – Superfície de resposta e perfil de desejabilidade para genistina, sendo x_1 = temperatura e x_2 = tempo 69
Figura 5 – Superfície de resposta e perfil de desejabilidade para acetilgenistina, sendo x_1 = temperatura e x_2 = tempo 70
Figura 6 – Superfície de resposta e perfil de desejabilidade para % residual de inibidores de tripsina, sendo x_1 = temperatura e x_2 = tempo 71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Teor de nutrientes e fitoquímicos da soja em base seca 15
Tabela 2 – Variáveis independentes e níveis codificados de variação 31
Tabela 3 – Delineamento 3^2 com as variáveis originais e codificadas para obtenção da farinha de soja integral 32

ARTIGO: TRATAMENTO TÉRMICO DA FARINHA DE SOJA INTEGRAL SOBRE A CONVERSÃO DE ISOFLAVONAS E INATIVAÇÃO DE INIBIDORES DE TRIPSINA

Tabela 1 – Teor das diferentes formas de isoflavonas na farinha de soja integral sem tratamento térmico 64
Tabela 2 – Variáveis originais e codificadas e funções respostas das diferentes formas de isoflavonas e inibidores de tripsina na farinha de soja integral tratada 65

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 10

2 OBJETIVOS 12

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 13
3.1 ASPECTOS GERAIS DA SOJA 13
3.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA SOJA 14
3.2.1 Isoflavonas da soja 16
3.2.2 Atividade da β-glicosidase 19
3.2.3 Inibidores de tripsina da soja 21
3.3 ASPECTOS DO PROCESSAMENTO DA SOJA 22
3.3.1 Farinha de Soja 23
3.4 EFEITOS DO PROCESSAMENTO TÉRMICO SOBRE AS ISOFLAVONAS 24
3.5 EFEITOS DO PROCESSAMENTO TÉRMICO SOBRE OS INIBIDORES DE TRIPSINA 28

4 MATERIAL E MÉTODOS 30
4.1 MATÉRIAS-PRIMAS E REAGENTES 30
4.2 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 30
4.2.1 Obtenção da Farinha de Soja Integral 30
4.2.2 Planejamento Experimental 30
4.3 MÉTODOS ANALÍTICOS 33
4.3.1 Determinação da composição química da farinha de soja integral 33
4.3.2 Determinação dos teores de isoflavonas 33
4.3.4 Determinação da atividade de inibidores de tripsina 34

REFERÊNCIAS 36

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 41
5.1 ARTIGO: TRATAMENTO TÉRMICO DA FARINHA DE SOJA INTEGRAL SOBRE A CONVERSÃO DE ISOFLAVONAS E INATIVAÇÃO DE INIBIDORES DE TRIPSINA 41

6 CONCLUSÃO 72

1 INTRODUÇÃO

No atual cenário mundial a soja tem se tornado cada vez mais importante economicamente, alcançando a cada ano recordes na produção e comercialização. É a cultura agrícola brasileira que mais cresceu nas últimas três décadas e a safra 2012/13 mostrou o Brasil com produção equivalente à dos Estados Unidos (BRASIL, 2015a; USDA, 2015b).

Apesar desses números promissores, o uso da soja ainda é muito limitado ao óleo vegetal e farelo desengordurado, este último destinado principalmente à alimentação animal. Entretanto, o aumento do conhecimento sobre os benefícios dessa leguminosa à saúde humana pode estimular e incentivar o desenvolvimento de novos produtos que utilizem a soja como ingrediente e assim, diversificar o seu uso na alimentação.

Dentre os componentes da soja, as isoflavonas e as proteínas são os principais responsáveis por efeitos benéficos à saúde, tais como redução de riscos de incidência de câncer de próstata, cólon e pulmão, prevenção de doenças cardíacas e osteoporose, diabetes e alívio dos sintomas da menopausa (VITALE et al., 2013; DONG et al., 2013; FILIBERTO et al., 2013; PARK et al., 2013; WADA et al., 2013). As isoflavonas têm ainda atraído atenção em função de suas propriedades antioxidante, anti-inflamatória e antialérgica, e a soja é a maior fonte conhecida destes compostos (LIU, 2004; VILLARES et al., 2011).

Geralmente, o conteúdo de isoflavonas em produtos de soja é menor do que na soja grão em função de transformações físicas e químicas, inclusive as causadas pelo processamento térmico. O mesmo é esperado para a farinha de soja integral, que é um produto pouco processado, rico em proteína e que tem sido muito utilizado como ingrediente na indústria de alimentos (JONHSON; WHITE; GALLOWAY, 2008; VILLARES et al., 2011).

As isoflavonas da soja estão divididas em quatro formas químicas denominadas de agliconas (daidzeína, gliciteína e genisteína), β-glicosídeos (daidzina, glicitina e genistina), malonilglicosídeos (6”-O-malonildaidzina, 6”-O-malonilglicitina e 6”-O-malonildaidzina) e acetilglicosídeos (6”-O-acetildaidzina, 6”-O-acetilglicitina e 6”-O-acetil genistina) (WANG; MURPHY, 1994; LIU, 2004).

A malonilgenistina é a isoflavona predominante no grão de soja e pode ser convertida em acetilgenistina ou genistina após secagem ou extração em

água quente respectivamente, sendo que o calor úmido é mais favorável à conversão e degradação do que o calor seco (CHIEN et al., 2005). Sob efeito do calor seco e abaixo de 200^{o}C, as agliconas são mais estáveis do que os β-glicosídeos (YUE; ABDALLAH; XU, 2010). Durante o processo de torra, ocorre o aumento no teor de agliconas e β-glicosídeos, enquanto que há redução no teor de malonilglicosídeos (LEE et al., 2013). O nível de energia térmica aplicado e o conteúdo de umidade desempenham papéis importantes no conteúdo e no perfil das isoflavonas nos produtos de soja não fermentados (LEE; LEE, 2009).

A diferença entre as formas químicas de isoflavonas pode afetar sua biodisponibilidade (MATHIAS et al., 2006). As agliconas, por exemplo, são absorvidas mais facilmente do que os glicosídeos conjugados, pois sua baixa massa molecular facilita a difusão. As formas conjugadas necessitam ser hidrolisadas previamente antes da absorção (VILLARES et al., 2011). O estudo das condições que levam a interconversões das isoflavonas pode auxiliar no entendimento da relação entre a forma química e os efeitos benéficos à saúde resultantes da ingestão desses compostos.

Além das isoflavonas, a soja possui outros componentes bioativos, como os inibidores de tripsina, aos quais têm sido atribuídos efeitos nutricionais adversos resultantes do consumo de soja. Para promover um aumento da qualidade nutricional da proteína da soja é necessária a inativação térmica desses compostos (LIU, 2004).

Os métodos mais eficazes para inativação de fatores antinutricionais em farelos de cereais incluem o calor seco e o calor úmido (KAUR et al., 2012). O incremento, tanto na umidade quanto na temperatura, promove uma inativação mais rápida desses inibidores (DIPIETRO; LIENER, 1989; MIURA et al., 2005). Na matriz da farinha de soja, os inibidores de tripsina podem ser inativados em 30 min com banho em ebulição (DIPIETRO; LIENER, 1989).

O processamento térmico é uma das operações mais utilizadas tanto na indústria quanto no preparo em pequena escala de produtos de soja, e este afeta diretamente não só as formas de isoflavonas como a inativação de inibidores de tripsina. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar a influência de diferentes tratamentos térmicos da farinha de soja integral sobre a conversão de isoflavonas e inativação dos inibidores de tripsina.

2 OBJETIVOS

Investigar a influência do tratamento térmico da farinha de soja integral sobre a conversão de isoflavonas e inativação dos inibidores de tripsina.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ASPECTOS GERAIS DA SOJA

Evidências históricas e geográficas indicaram que a soja é originária do norte da China, e há pelo menos 4.000 anos a soja e seus derivados têm sido utilizados na alimentação dos orientais como fonte de proteína e energia (LIU, 2004; RIAZ, 2006).

Sua introdução na Europa e América do Norte só aconteceu no século XVIII e, desde então, o avanço nas tecnologias de cultivo, processamento e uso da soja levou a um crescimento importante da produção global e a novas aplicações da soja na alimentação humana e animal (LIU, 2004).

No cenário mundial das últimas décadas, a soja tem se tornado cada vez mais importante economicamente, alcançando a cada ano recordes na produção e comercialização. A soja é a cultura agrícola brasileira que mais cresceu nas últimas três décadas e corresponde a 49% da área plantada em grãos (BRASIL, 2015a).

Segundo dados do USDA (2015b), o Brasil é o segundo produtor mundial do grão (safra 2012/13) com produção de 82 milhões de toneladas, posicionando-se após os Estados Unidos, com 82,79 milhões de toneladas. O Brasil se destacou como maior exportador mundial, atingindo 41,9 milhões de toneladas, superando os Estados Unidos, com 35,85 milhões de toneladas. Tanto da produção brasileira quanto da americana, mais de 40% da soja foi destinada ao esmagamento doméstico. As estimativas da safra 2013/14 mostraram a produção brasileira de 86,7 milhões de toneladas.

Os dados do USDA (2015b) vão ao encontro dos dados de BRASIL (2015b) que, em números absolutos, mostraram a produção brasileira de soja aumentada em mais de 4 milhões de toneladas entre 2013 e 2014. Este aumento foi 2,5 vezes maior do que o apresentado para a mandioca, que aparece como a segunda cultura agrícola com maior variação absoluta na produção.

A distribuição da produção da soja nos estados da federação brasileira (média 2005-2009) apresenta o estado do Mato Grosso com 30% da produção nacional, seguido do Paraná com 19%, Rio Grande do Sul com 13% e Goiás com 12% (USDA, 2015a).

Apesar dos números promissores no Brasil e no mundo, o uso da soja ainda é muito limitado ao óleo vegetal e farelo desengordurado, sendo o farelo destinado principalmente à alimentação animal.

No entanto, a partir do século XX, evidências científicas indicaram que o consumo regular de produtos de soja pode reduzir o risco de incidência de câncer de próstata, cólon e pulmão, prevenir doenças cardíacas e osteoporose, diabetes e aliviar sintomas da menopausa. Dentre os componentes da soja, as isoflavonas e as proteínas aparecem como os principais responsáveis por tais efeitos (VITALE et al., 2013; DONG et al., 2013; FILIBERTO et al., 2013; PARK et al., 2013, WADA et al., 2013; LIU, 2004). Portanto, o aumento do conhecimento sobre os benefícios à saúde humana pode estimular e incentivar o desenvolvimento de novos produtos utilizando a soja como ingrediente e assim, diversificar o seu uso na alimentação.

3.2 Composição Química da Soja

O valor nutritivo da soja é indiscutível. Entre os cereais e outras leguminosas, a soja é que possui o mais alto teor de proteínas, com 40%. Contém todos os aminoácidos essenciais, porém baixo teor de aminoácidos sulfurados, sendo a metionina o maior limitante. A soja também possui, entre as leguminosas, o segundo maior conteúdo lipídico, em torno de 20%, perdendo apenas para o amendoim. Ainda, a soja possui outras substâncias com valor nutritivo, tais como vitaminas, minerais e uma variedade de substâncias em menores concentrações. Dentre as substâncias em menor concentração, destacam-se os inibidores de tripsina, fitatos, oligossacarídeos e isoflavonas, conhecidos por sua natureza bioativa (LIU, 1997; 2004).

Liu (2004) afirmou que a composição química do grão de soja é dependente de fatores genéticos (variedade, maturidade) e ambientais (localização geográfica, clima e stress ambiental, armazenagem) (Tabela 1).

Tabela 1. Teor de nutrientes e fitoquímicos da soja em base seca.

Nutrientes e Fitoquímicos	Teor
Proteínas (%)	30 – 50
Aminoácidos não essenciais (%)	20 – 27
Aminoácidos essenciais (%)	14 – 18
Carboidratos (%)	26 – 38
Óleo (%)	12 – 30
Cinzas (%)	4,6 – 5,9
Inibidores de tripsina (%)	2 – 3
Fitatos (%)	1,0 – 1,5
Isoflavonas (%)	0,1 – 0,4
Saponinas (%)	0,1 – 0,3
Fitoesteróis (mg/g)	0,3 – 0,6
Vitaminas (mg/g)	0,2 – 0,3

Fonte: LIU, 2004, adaptada.

A proteína da soja é particularmente valorizada porque sua composição em aminoácidos complementa a dos cereais. Ou seja, apesar da limitação em metionina e cisteína, a soja é rica em lisina o suficiente para complementar a deficiência deste aminoácido nos cereais (SNYDER; KWON, 1987).

A proteína da soja era julgada com valor nutricional mais baixo do que as proteínas de origem animal. A qualidade da proteína era avaliada pela taxa de eficiência proteica (PER), baseada na taxa de crescimento de ratos em laboratório. Porém, os ratos requerem 50% mais metionina do que os humanos, fazendo com que este método não seja o mais apropriado. As entidades americanas World Health Organization (WHO) e Food and Drug Administration (FDA) adotaram então um novo método denominado de digestibilidade proteica corrigida pela pontuação de aminoácidos (PDCAAS). Este método utiliza uma pontuação para os aminoácidos, uma comparação entre o perfil de aminoácidos da proteína e o requerido pelo organismo humano, e um fator de digestibilidade. Utilizando este método, os produtos proteicos da soja recebem pontuações entre 0,95 e 1,00, o maior valor possível, indicando uma elevada qualidade de proteína (RIAZ, 2006).

Dos carboidratos presentes na soja, 10% são carboidratos solúveis. Dentre estes estão a rafinose e a estaquiose, açúcares complexos que não são

digeridos e absorvidos como nutrientes. Tais açúcares são então metabolizados por microrganismos presentes no trato gastrointestinal humano, resultando na produção de gases e consequente flatulência, o que pode gerar desconforto no consumo. Porém, as bactérias responsáveis por metabolizar esses açúcares (*Bifidas*) são consideradas importantes na manutenção da saúde humana, e estão associadas à redução da incidência de câncer de cólon e outras desordens intestinais. De acordo com Larkin, Price e Astheimer (2007), o crescimento e a atividade de bactérias probióticas pode ser seletivamente estimulado pela ingestão de componentes prebióticos na dieta. Os prebióticos podem ser definidos como ingredientes alimentares não digeríveis, que afetam beneficamente a saúde dos consumidores, por estimularem o crescimento de um número limitado de bactérias do intestino grosso (ZIEMER; GIBSON, 1998).

O óleo da soja contém cerca de 80% de ácidos graxos insaturados, com predominância do ácido linoleico, seguido do oleico e linolênico. O ácido linoleico, que corresponde a 50% deste total, é um ácido graxo essencial que pode ajudar a controlar os níveis de colesterol no sangue. A presença de ácido linolênico, 8% do total, está associada à relativa instabilidade do óleo da soja à oxidação, porém também está associado ao controle do risco de doenças cardiovasculares (RIAZ, 2006; SNYDER; KWON, 1987).

3.2.1 Isoflavonas da soja

As isoflavonas fazem parte de um grupo de compostos denominado flavonoides, cuja cadeia básica é formada por dois anéis benzeno ligados por uma cadeia de três carbonos, que pode ou não formar um anel pirano (LIU, 2004) (Figura 1).

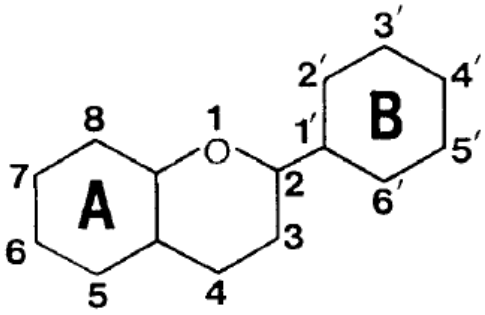
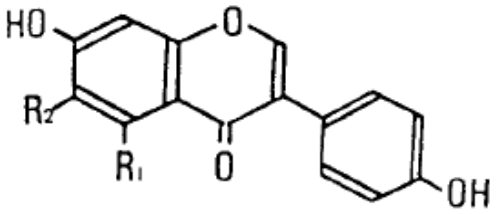


Figura 1. Forma química dos flavonoides.
Fonte: LIU, 2004.

As isoflavonas tem atraído muita atenção em função de suas propriedades antioxidante, anti-inflamatória e antialérgica. Esses compostos são produzidos principalmente por espécies da sub-família *Papilionoideae* da família *Leguminosae* e são encontradas nos grãos de soja, tremoço, fava, grão de bico e outras leguminosas (VILLARES et al., 2011).

A soja é a maior fonte conhecida de isoflavonas, possuindo 1 - 4 $mg.g^{-1}$ em base seca. As isoflavonas da soja possuem três formas primárias, conhecidas como agliconas: daidzeína, genisteína e gliciteína. Cada uma dessas formas primárias pode também existir na forma β-glicosídeos (daidzina, genistina e glicitina) ou em outras duas formas glicosídeos conjugados denominadas de acetildaidzina e malonildaidzina, acetilgenistina e malonilgenistina, acetilglicitina e malonilglicitina (LIU, 2004). Ao todo são, portanto, doze formas químicas distintas (Figuras 2 e 3).

A atividade das isoflavonas no organismo é dependente da sua absorção e biodisponibilidade, que são por sua vez determinadas pela sua natureza química em termos de solubilidade e susceptibilidade da degradação por microrganismos no trato gastrointestinal. Assim sendo, a forma aglicona é prontamente absorvida, enquanto que as demais precisam ser hidrolisadas a agliconas e então absorvidas (VILLARES et al., 2011).



Agliconas

R_1	R_2	Compostos
H	H	**daidzeína**
OH	H	**genisteína**
H	OCH_3	**gliciteína**

Figura 2. Estrutura das isoflavonas agliconas.
Fonte: LIU, 2004, adaptada.

Glicosídeos

R_1	R_2	R_3	Compostos
H	H	H	**daidzina**
OH	H	H	**genistina**
H	OCH_3	H	**glicitina**
H	H	$COCH_3$	**acetildaidzina**
OH	H	$COCH_3$	**acetilgenistina**
H	OCH_3	$COCH_3$	**acetilglicitina**
H	H	$COCH_2COOH$	**malonildaidzina**
OH	H	$COCH_2COOH$	**malonilgenistina**
H	OCH_3	$COCH_2COOH$	**malonilglicitina**

Figura 3. Estrutura das isoflavonas glicosídeos.
Fonte: LIU, 2004, adaptada.

Os componentes principais do grão de soja são o tegumento (revestimento externo de todo o conjunto), os cotilédones (órgãos de reserva) e o eixo embrionário, onde se situa o hipocótilo (porção do embrião que dará origem à haste da planta). A maior parte das isoflavonas está concentrada no hipocótilo, onde

daidzeína, gliciteína e seus glicosídeos correspondem a mais de 95% do total de isoflavonas. A gliciteína e seus glicosídeos ocorrem exclusivamente no hipocótilo, enquanto que a genisteína e seus glicosídeos estão presentes tanto no hipocótilo quanto no cotilédone, sendo predominante neste último (LARKIN; PRICE; ASTHEIMER, 2008).

Em geral, na soja e em produtos a base de soja, os derivados de genisteína estão presentes em níveis mais altos do que daidzeína e gliciteína (WANG; MURPHY, 1994; LARKIN; PRICE; ASTHEIMER, 2008; VILLARES et al., 2011). As formas agliconas estão presentes no grão de soja em baixas quantidades, ou seja, de 1 a 3 % do total de isoflavonas (GÓES-FAVONI, 2002; RIBEIRO et al., 2007). Nos produtos da soja, os não fermentados apresentam teor de isoflavonas totais de duas a três vezes superior aos fermentados, com predominância das formas conjugadas (WANG; MURPHY, 1996; LIMA; IDA, 2014; QUINHONI; IDA, 2015). Os fermentados apresentam alto teor de agliconas devido à ação das enzimas β-glicosidases dos microrganismos fermentadores, associadas às β-glicosidases endógenas da soja, que promovem a hidrólise das formas glicosídicas das isoflavonas presentes (MURPHY; BARUA; HAUCK, 2002).

Muitas indústrias processadoras de soja têm desenvolvido linhas de produtos com altos teores de isoflavonas para serem utilizados como ingredientes. Alguns fatores têm contribuído para o crescimento deste mercado, como a crescente preocupação dos consumidores com a saúde, pesquisas científicas associando as isoflavonas com benefícios à saúde e o baixo consumo de produtos de soja (LIU, 2004).

3.2.2 Atividade da β-glicosidase

As β-glicosidases fazem parte de um grupo heterogêneo de enzimas capazes de hidrolisar as ligações β-glicosídicas, liberando o resíduo glicosil terminal não redutor de oligossacarídeos e outros conjugados de glicose. Essas enzimas são encontradas em toda a gama de organismos vivos, desempenhando as mais diversas funções em processos biológicos, tais como a degradação de biomassa celulósica, a hidrólise de glicolipídios e a modificação de metabólitos secundários. Em plantas, a atividade da β-glicosidase está relacionada à atividade de fitormônios, mecanismos de defesa, desenvolvimento de flores e pigmentação, lignificação e

decomposição da parede celular. Algumas β-glicosidases de plantas tem alta especificidade pelo substrato, tais como aquelas que atuam sobre saponinas, flavonas e isoflavonas (CAIRNS; ESEN, 2010; HSIEH; GRAHAN, 2001).

Hsieh e Grahan (2001) purificaram uma determinada β-glicosidase extraída de raiz de soja, com especificidade para os β-glicosídeos e malonilglicosídeos das isoflavonas genisteína e daidzeína. A enzima apresentou pH e temperatura ótimos de 6 e 30^{o}C, com atividade mantida em 87% após 45 min a 50^{o}C. Esta enzima hidrolisou diretamente as formas malonil e os β-glicosídeos. Ismail e Hayes (2005) encontraram resultados diferentes estudando β-glicosidases de origem microbiana (*E. coli*) – também presentes no trato gastrointestinal - e vegetal (amêndoa). As enzimas provenientes de *E. coli* e amêndoa hidrolisaram apenas os β-glicosídeos e, portanto, a transformação das formas conjugadas de isoflavonas em β-glicosídeos, durante o processamento de produtos de soja, deve aumentar o valor nutricional desses produtos.

Carrão-Panizzi, Simão e Kikuchi (2003) submeteram grãos de soja a tratamentos hidrotérmicos a 40, 50 e 60^{o}C por 12 e 18 h. O tratamento a 50^{o}C por 12 h foi o mais efetivo para obtenção das agliconas, sendo que a 60^{o}C no mesmo intervalo de tempo houve redução das agliconas como consequência da inativação das β-glicosidases. Resultados diferentes foram relatados por Carrão-Panizzi, Góes-Favoni e Kikuchi (2004), mediante tratamentos hidrotérmicos de grãos de soja a 45, 60 e 85^{o}C por 5, 30 e 60 min, onde no tratamento por 60 min a 60^{o}C foi obtido aumento significativo no teor de agliconas. Em contrapartida, a 85^{o}C houve diminuição das agliconas, provavelmente pela inativação das β-glicosidases. Tais trabalhos demonstraram que a ação dessas enzimas é dependente do tempo e temperatura de tratamento de grãos de soja.

Góes-Favoni, Carrão-Panizzi e Beléia (2010) observaram que a massa molar de malonilglicosídeos e β-glicosídeos reduziram após maceração de grãos de soja a 50^{o}C por 12 h, enquanto que as agliconas daidzeína e genisteína, as quais não foram detectadas no grão antes da maceração, aumentaram.

Handa et al. (2014) investigaram o efeito do pH e temperatura de incubação na fermentação em estado sólido, utilizando farinha de soja desengordurada. A maior atividade de β-glicosidase produzida pelos microrganismos *Aspergillus oryzae e Monascus purpureus* foi a 30^{o}C e pH 6.

Lima e Ida (2014) submeteram grãos de soja a diferentes condições de tempo e temperatura de maceração, em solução tampão pH 6, sendo que a 55^{o}C por 6 h foi obtido máximo teor de agliconas, mínimo teor de β-glicosídeos e baixa atividade de β-glicosidase.

3.2.3 Inibidores de tripsina da soja

Os inibidores de tripsina são encontrados em vários alimentos. Esses compostos têm sido estudados em plantas pertencentes às famílias *Leguminoseae, Solanaceae* e *Gramineae*, já que a maioria de suas espécies é importante fonte de alimento, dentre as quais se destacam as leguminosas. As leguminosas fornecem 10% das proteínas da dieta, sendo utilizadas principalmente na alimentação animal (Liu, 2004).

Os inibidores de tripsina mais comuns em leguminosas atuam sobre um grupo de enzimas proteolíticas, as serinaproteases, que incluem a tripsina e a quimotripsina. Os inibidores formam complexos estáveis com essas enzimas digestivas, reduzindo as suas atividades (SAVAGE; MORRISON, 2003).

Existem dois tipos primários de inibidores de tripsina na soja, o inibidor de Kunitz (KI), que atua sobre a tripsina, e o inibidor de Bowman-Birk (BBI), que atua sobre a tripsina e a quimotripsina. Os inibidores de tripsina se ligam à tripsina no intestino, causando aumento na secreção de colecistoquinina, que por sua vez aumenta a secreção pancreática de tripsinogênio, levando à hipertrofia do pâncreas. A inibição do crescimento ocorre em função da perda de aminoácidos resultante do aumento na secreção enzimática (LIU, 1997).

O KI se liga ao sítio ativo da enzima, assim como o substrato, causando a hidrólise das ligações peptídicas entre os sítios reativos do inibidor ou substrato. Porém, no KI existem pontes dissulfeto entre os sítios reativos, fazendo com que, após a hidrólise, o inibidor modificado seja mantido na mesma conformação, formando um complexo estável enzima – KI (SAVAGE; MORRISON, 2003).

KUMAR et al. (2003) estudaram os efeitos do local do cultivo sobre a atividade de lipoxigenases e inibidores de tripsina em diferentes cultivares de soja. Observaram que o genótipo e a interação genótipo x local de cultivo influenciaram a atividade dos inibidores de tripsina.

Além do efeito antinutricional manifestado pelo BBI, resultados de recentes investigações químicas sugerem que este possui um efeito potente no combate ao câncer. Os mecanismos de ação parecem incluir sua atividade inibitória de tripsina e quimotripsina e a inibição de efeitos inicializadores da carcinogênese (FANG et al., 2012).

3.3 Aspectos do Processamento da Soja

A soja é utilizada na alimentação humana basicamente sob duas formas: produtos fermentados e não fermentados. Os fermentados de soja mais conhecidos na alimentação ocidental incluem miso, natto, molho de soja e tempeh. Os não fermentados incluem a soja fresca, os brotos de soja, o extrato aquoso de soja, tofu e os derivados da soja ricos em proteína, normalmente utilizados como ingredientes em outros produtos. São eles a farinha de soja (56% de proteína), o concentrado proteico de soja (65% de proteína) e o isolado proteico de soja (acima de 90% de proteína).

O conteúdo de isoflavonas em alimentos processados de soja é menor do que na soja grão, em função de transformações físicas e químicas, e a mudança no perfil das isoflavonas se deve à diferença de estabilidade de suas formas químicas aos parâmetros de processo (VILLARES et al., 2011).

Os inibidores de tripsina da soja possuem natureza proteica e estão localizados junto às principais proteínas de armazenamento no cotilédone. É esperado, portanto, que sejam fracionados com as proteínas durante o processamento da soja para elaboração de ingredientes alimentares (MIURA et al, 2005).

A farinha de soja integral é o produto proteico de soja menos processado, passando apenas pelos processos de descascamento e moagem. A farinha desengordurada passa ainda pelo processo de extração do óleo por solvente. As farinhas são encontradas na forma de enzima ativa ou inativa, sendo que as últimas passam também por processo térmico para inativação enzimática. O concentrado e isolado proteicos de soja são obtidos a partir da lixiviação ou extração dos compostos solúveis em água ou álcool presentes na farinha (JONHSON; WHITE; GALLOWAY, 2008).

3.3.1 Farinha de Soja

Os processos comumente utilizados para obtenção da farinha de soja estão representados na Figura 4.

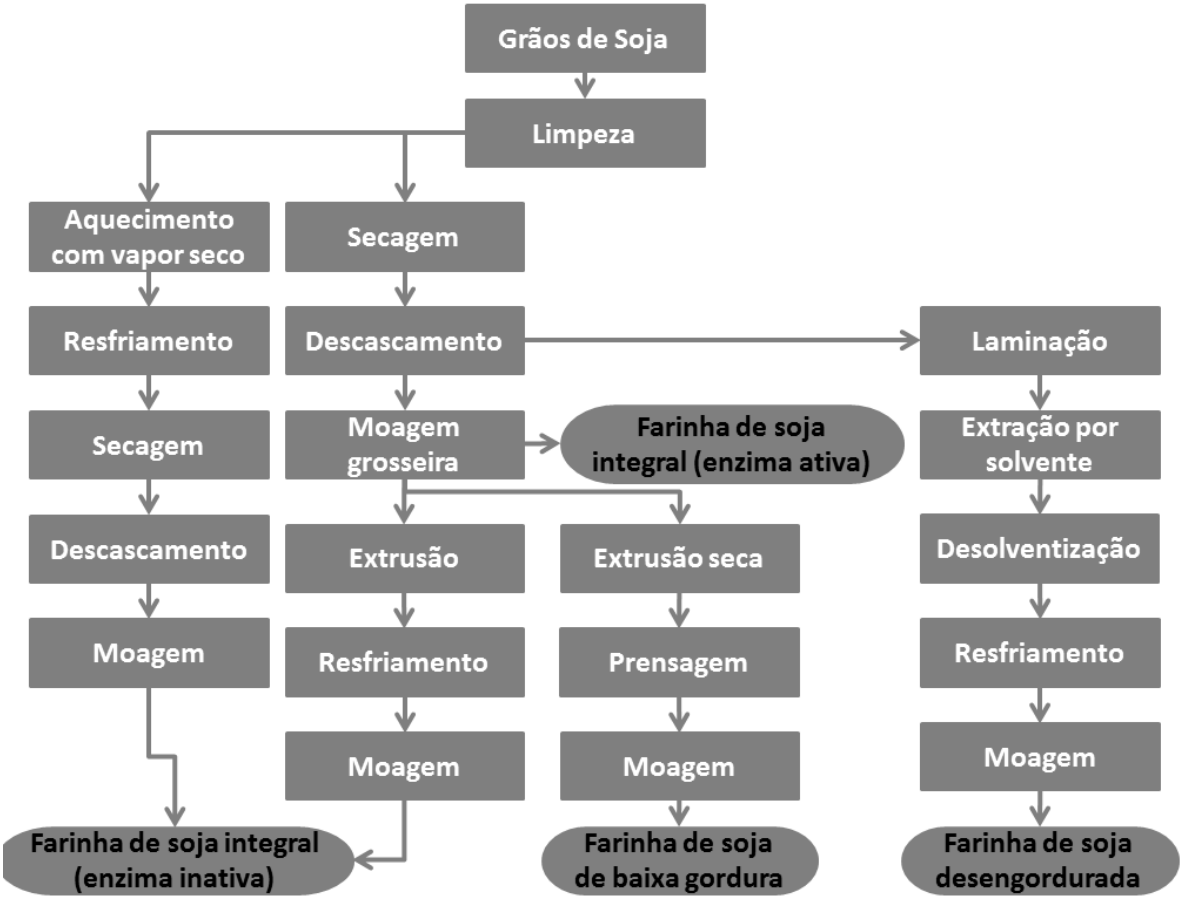


Figura 4. Fluxograma de produção de farinha de soja.
Fonte: RIAZ, 2006; JONHSON; WHITE; GALLOWAY, 2008, adaptado.

Na produção dos diversos tipos de farinhas, o processo mais simples é aquele utilizado para obtenção da farinha de soja integral, sem passar por inativação enzimática. Este tipo de farinha é muito utilizado na panificação, onde a enzima lipoxigenase presente atua no branqueamento da farinha de trigo e no condicionamento da massa. Na produção da farinha de soja integral com inativação enzimática, há uma etapa de tratamento térmico com vapor. O tratamento térmico também pode ser feito via extrusão, seca ou úmida. Este tipo de farinha contém atividade de lipoxigenase mais baixa e também odor e sabor menos acentuado. A etapa de extrusão seca também é utilizada na produção da farinha de soja de baixa

gordura (semi-integral), que passa em seguida por prensagem, restando na farinha de 6 – 8% de óleo, dependendo das condições de processamento. A produção da farinha de soja desengordurada utiliza a extração por solvente. Como as isoflavonas não são solúveis em hexano, não é esperado uma alteração significativa de seu conteúdo durante o desengorduramento da farinha (RIAZ, 2006; JONHSON; WHITE; GALLOWAY, 2008).

Os processos de secagem utilizam temperatura em torno de 70 – 75^{o}C. O processo de extrusão úmida aplica temperatura em torno de 130^{o}C, e a extrusão seca atinge 160^{o}C devido ao calor interno causado por fricção. No processo de extração por solvente ocorre o superaquecimento do solvente sob pressão e temperatura acima de 100^{o}C (RIAZ, 2006; JONHSON; WHITE; GALLOWAY, 2008).

3.4 Efeitos do Processamento Térmico sobre as Isoflavonas

O processamento térmico é uma das operações mais utilizadas tanto na indústria quanto no preparo em pequena escala de produtos de soja. Há vários estudos que comprovam que a temperatura interfere tanto no conteúdo total quanto na distribuição das diferentes formas químicas das isoflavonas.

Chien et al. (2005) citaram que o tipo de isoflavona presente no grão de soja em maior quantidade é a malonilgenistina, a qual pode ser convertida em acetilgenistina ou genistina após secagem ou extração em água quente, respectivamente. O efeito do calor seco e úmido nas quatro formas de genistina foi avaliado em sistema modelo utilizando temperaturas de 100, 150 e 200^{o}C, por até 180 min. A conversão e degradação das formas de genistina foi mais influenciada pelo calor úmido do que o seco (Figura 5).

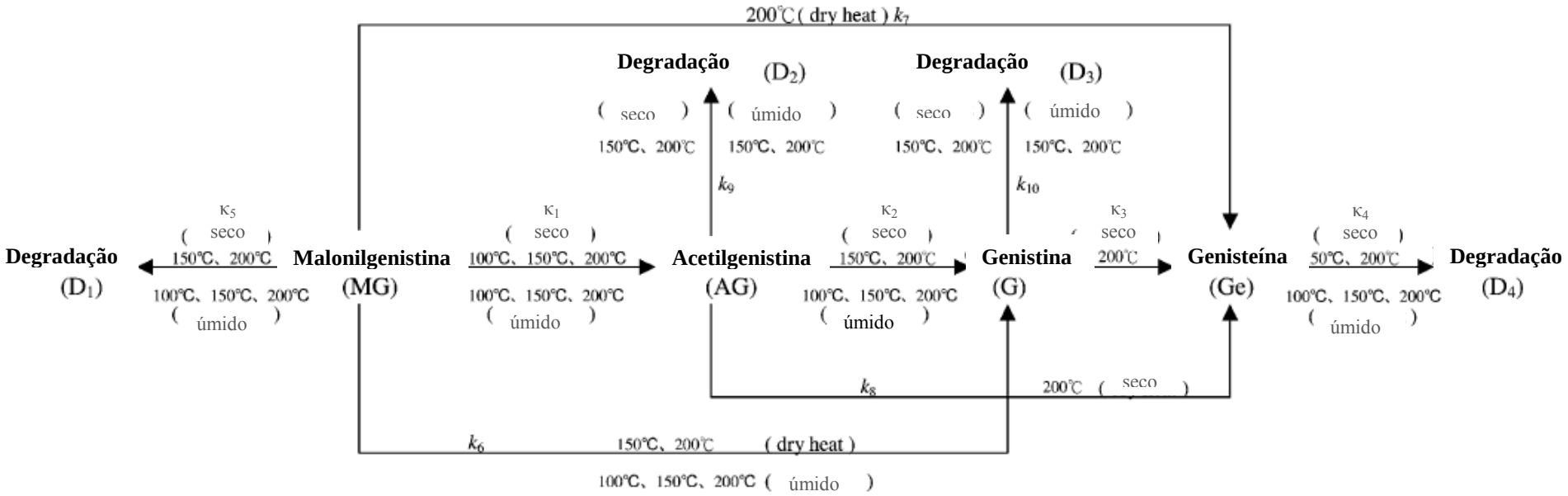


Figura 5. Influência do calor seco ou úmido na conversão e degradação de quatro formas de isoflavonas

Fonte: CHIEN et al, 2005, adaptado.

Lee e Lee (2009) observaram que a tostagem do grão de soja a 200^{o}C acarretou uma redução de 25% do total de isoflavonas após 21 min de tratamento. Os malonilglicosídeos reduziram de 76% para 3%, enquanto os acetilglicosídeos aumentaram de 6% para 43%, os β-glicosídeos de 15% para 42% e as agliconas de 3% para 12%. Já o tratamento de grãos de soja embebidos em água mantidos em estufa a 100^{o}C por 120 min, não resultou em perdas significativas no total de isoflavonas. No entanto, os malonilglicosídeos reduziram de 76% para 34%, enquanto os β-glicosídeos aumentaram de 16% para 55% e as agliconas de 2% para 6%. Foi observado que o nível de energia térmica aplicada e o conteúdo de umidade nas amostras desempenharam papéis importantes nas alterações, tanto no conteúdo total quanto no perfil das isoflavonas nos alimentos de soja não fermentados. A perda maior determinada no processo de tostagem foi atribuída à temperatura mais alta aplicada neste tratamento em relação ao tratamento em estufa.

O efeito do calor seco na degradação das isoflavonas foi investigado por Yue, Abdallah e Xu (2010), os quais observaram que abaixo de 200^{o}C as agliconas possuem maior estabilidade térmica do que as formas glicosídicas. Além disso, foi observado que abaixo de 150^{o}C, a estabilidade térmica das diferentes formas de isoflavonas seguiu a ordem crescente: glicitina < genistina < daidzina < gliciteína < genisteína < daidzeína.

Lee et al. (2013) investigaram transformações em compostos fenólicos de grãos de soja sob diferentes condições de torra. Constataram que, entre 160^{o}C e 200^{o}C por 10 min, o teor de malonilglicosídeos reduziu enquanto que o teor de β-glicosídeos e agliconas aumentou. Após 10 min à 200^{o}C, foi observado ligeira redução no teor de isoflavonas totais.

Ungar, Osundahunsi e Shimoni (2003) estudaram a estabilidade de soluções modelo de isoflavonas incubadas a alta temperatura e concluíram que a taxa de degradação de genisteína e daidzeína foi maior em pH 9 do que em pH 7.

Mathias et al. (2006) também estudaram os efeitos do pH e temperatura (banho Maria) sobre soluções das isoflavonas conjugadas de genistina e daidzina. Sob condições alcalinas, a acetildaidzina mostrou a maior perda dentre todos os conjugados estudados, e a 80^{o}C os conjugados de daidzina apresentaram maior perda do que os conjugados de genistina. A

100^{o}C, em toda faixa de pH estudada, os conjugados de daidzina apresentaram maior perda que os conjugados de genistina. Os autores atribuíram esses resultados à diferença química das moléculas, sendo que a forma química acetildaidzina é a mais simples e menos estável do que aquelas mais complexas, como a acetilgenistina com o seu grupo hidroxila e as formas malonil com o grupo carboxila.

Segundo Stintzin, Hoffman e Carle (2006) a degradação de agliconas em solução a 150^{o}C, em pH próximo ao neutro, é moderada e similar entre si. Já em pH ácido (pH 3,1), o conteúdo das agliconas foi fortemente alterado, sendo que a daidzeína foi menos estável do que a gliciteína e a genisteína nas primeiras 3 h de tratamento.

O efeito do pH sobre a concentração de agliconas no processamento hidrotérmico da soja em grão e da farinha da soja, a 50^{o}C por 15 h, foi investigado por Sutil et al. (2008). Foi observado maior teor de agliconas na farinha do que no grão. E maior teor, tanto no grão quanto na farinha, em valores de pH 6,0 – 7,5. Os autores atribuíram os resultados ao fato de que, com a trituração, há uma maior interação entre a enzima β-glicosidase e as isoflavonas glicosídeos, facilitando a sua transformação em agliconas e que em pH próximo a 6,0, a β-glicosidase possui uma atividade catalítica maior, provocando então o efeito observado tanto no grão de soja quanto na farinha.

Foi reportado por Barbosa, Lajolo e Genovese (2006) que no processo de obtenção de isolado proteico de soja, na etapa de extração de proteínas, a temperatura não alterou o conteúdo total de isoflavonas, mas alterou o seu perfil. O teor de agliconas aumentou de 3% (a 4^{o}C) para 20% (a 50^{o}C), enquanto que o teor de isoflavonas glicosídicas decresceu proporcionalmente. Neste mesmo intervalo de temperatura, as formas malonil não tiveram alterações consideráveis.

Também no processo de obtenção de isolado proteico de soja, Lin, Krishnan e Wang (2006) verificaram que durante a precipitação de proteínas e etapa final de lavagem em temperaturas de 0 a 50^{o}C, o teor de isoflavonas totais foi mais elevado à temperatura mais baixa, enquanto que o teor de agliconas foi mais elevado à temperatura mais alta. Em geral, nos processos que envolvem aumento de temperatura, ocorre a clivagem do grupo carboxila e as formas malonil se transformam em acetilglicosídeos ou

glicosídeos. Se esta temperatura se aproxima dos 45°C, temperatura ótima da enzima β-glicosidase, as formas glicosídicas são transformadas em agliconas (VILLARES et al., 2011).

3.5 Efeitos do Processamento Térmico sobre os Inibidores de Tripsina

Os efeitos antinutricionais resultantes do consumo de soja crua, tem sido atribuídos à presença de inibidores de tripsina e baixa digestibilidade de proteína. Para promover um aumento da qualidade nutricional da proteína da soja, é necessária a inativação térmica desses compostos (LIU, 2004).

Baintner (1981) estudou os efeitos do calor seco (em estufa por 1 h) e úmido (em banho Maria por 10 min) sobre os inibidores de tripsina da farinha de soja. Com calor seco, observou-se inicialmente a redução de inibidores de quimotripsina, a partir de 145°C a redução de inibidores de quimotripsina e tripsina e a 165°C a inibição praticamente total dos inibidores. Com calor úmido, observou-se que entre 65°C e 100°C ocorreu uma redução mais pronunciada do inibidor de quimotripsina e, após 100°C, uma redução mais pronunciada do inibidor tripsina.

DiPietro e Liener (1989) investigaram o efeito da inativação térmica (banho em ebulição) sobre KI e BBI purificados, quando comparados aos inibidores obtidos diretamente de extrato de farinha de soja. Foi demonstrado que o BBI purificado se mostrou mais termoestável que o KI purificado e que os inibidores do extrato. O BBI reteve 75% da atividade anti-tripsina após 360 min, o KI perdeu praticamente toda a atividade após 180 min e os inibidores do extrato perderam sua atividade após 30 min de tratamento. Concluiu-se que este comportamento foi esperado, já que na matriz da farinha de soja, rica em proteína, os inibidores de tripsina podem formar interações não covalentes proteína-proteína, assim como trocar ligações dissulfeto com grupos tióis livres presentes, de forma a facilitar a inativação dos inibidores. Neste mesmo trabalho foi investigado o efeito da inativação térmica (banho Maria) na farinha de soja, em diferentes condições de temperatura (75 a 95°C) e umidade (5 a 15%), e concluiu-se que o incremento, tanto na umidade quanto na temperatura, promoveu uma inativação mais rápida.

Osman, Reid e Weber (2002) estudaram a inativação térmica de inibidores de tripsina da soja (KI e BBI) purificados em diferentes pH. Foi observado que, em fervura a 100^{o}C, após 360 min em pH neutro, a atividade residual anti-tripsina do BBI permaneceu maior que 60% e do KI em 25%. Em autoclave (121^{o}C e 15 psi), após 60 min, obtiveram atividade residual anti-tripsina de 50% para o BBI enquanto que o KI foi quase que totalmente inativado (96%). Concluiu-se que o BBI é mais termoestável que o KI. Foi observado ainda que em pH básico (pH 11) ambos inibidores foram facilmente inativados, perdendo a atividade anti-tripsina (90%) após 40 min a 100^{o}C.

Miura et al. (2005) testaram farinhas de 10 e 16% de umidade, aquecidas em banho a 95^{o}C, em cinco períodos de 15 a 100 min. Foi observado que o acréscimo de 6% na umidade da farinha aumentou cerca de 5 vezes a eficiência de inativação dos inibidores de tripsina em cada tratamento.

Kaur et al. (2012) estudaram a redução de fatores anti-nutricionais em farelos de cereais aplicando calor seco, úmido e microondas. Aplicando calor úmido, a 110^{o}C por 25 min, observaram redução de até 83% na atividade de inibidores de tripsina. No tratamento com calor seco, no mesmo tempo e temperatura, obteve-se 80% de redução na atividade desses inibidores. No tratamento em microondas, 2450 MHz por 2,5 min, a redução foi de 78%.

Os trabalhos citados demonstram a relevância dos parâmetros temperatura, tempo e umidade sobre a eficiência da inativação térmica dos inibidores de tripsina presentes nos produtos da soja.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATÉRIAS-PRIMAS E REAGENTES

Foram utilizados como matéria-prima os grãos de soja da cultivar BRS 257, safra 2013, cultivados na região de Mauá da Serra, PR. Esta cultivar convencional possui características para alimentação humana em função da ausência das enzimas lipoxigenases. Estes grãos foram fornecidos pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Soja, Londrina-PR.

Para determinação das isoflavonas foram utilizados os padrões 6''-O-Acetilglicosídeos e 6''-O-Malonilglicosídeos (Wako Pure Chemical Industries, Ltda., Osaka, Japan) e β-Glicosídeos e Agliconas (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA). Para determinação dos inibidores de tripsina foram utilizados os padrões da enzima tripsina e o substrato benzoyl-DL-arginine 4-nitroanilide hydrochloride - BAPNA (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA). Os outros reagentes utilizados foram de grau analítico ou grau cromatográfico. As análises foram realizadas nos laboratórios da Universidade Estadual de Londrina e Embrapa Soja, Londrina-PR.

4.2 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

4.2.1 Obtenção da Farinha de Soja Integral

Os grãos de soja foram previamente selecionados e moídos com refrigeração (TECNAL, TE 631, Brasil) a 27.000 rpm por 1 min para obter a farinha de soja integral (FSI). Esta farinha foi utilizada para determinação da composição química e avaliação dos efeitos do tratamento térmico.

4.2.2 Planejamento Experimental

Foi utilizado o delineamento 3^2 com 9 ensaios e adicionado de 2 replicatas no ponto central, totalizando 11 ensaios realizados aleatoriamente. As variáveis investigadas foram temperatura (X_1= 100, 150 e 200°C) e tempo

(X_2= 10, 15 e 20 min) e as funções respostas avaliadas na farinha de soja integral tratada (FSI_{trat}) foram: Dai = daidzina, Gli = glicitina, Gen = genistina, MDai = malonildaidzina, MGli = malonilglicitina, MGen = malonilgenistina, ADai = daidzeína, AGli = gliciteína, AGen = genisteína, AcDai = acetildaidzina, AcGli = acetilglicitina, AcGen = acetilgenistina e % de $IT_{residual}$ = atividade de inibidores de tripsina. A tabela 2 apresenta as variáveis independentes codificadas com os níveis de variação e a tabela 3 o planejamento experimental. Para cada ensaio foi utilizado 40 g da FSI pesada em placa de vidro e fechada. Em seguida foi colocada em estufa (Nova Ética, 402-5W, série 10916/08, Brasil) previamente estabilizada nas temperaturas (X_1) e tempos (X_2), conforme o planejamento. Os níveis máximos utilizados de 200^{o}C e 20 min foram estabelecidos após ensaios preliminares, cujos níveis acima destas condições foram indesejáveis devido a alteração da integridade da amostra. Ao final de cada tratamento a amostra foi imediatamente resfriada em gelo até atingir a temperatura de 25^{o}C. As amostras foram embaladas a vácuo e conservadas à – 22^{o}C até a realização das análises.

Tabela 2. Variáveis independentes e níveis codificados de variação.

Variáveis	Níveis Codificados		
	-1	0	1
X_1 = Temperatura (^{o}C)	100	150	200
X_2 = Tempo (min)	10	15	20

Tabela 3. Delineamento 3^2 com as variáveis originais e codificadas para obtenção da farinha de soja integral.

Variáveis originais e codificadas		
Ensaios	x_1	x_2
	(X_1, ^oC)	(X_2, min)
1	-1 (100)	-1 (10)
2	-1 (100)	0 (15)
3	-1 (100)	1 (20)
4	0 (150)	-1 (10)
5	0 (150)	0 (15)
6	0 (150)	1 (20)
7	1 (200)	-1 (10)
8	1 (200)	0 (15)
9	1 (200)	1 (20)
10	0 (150)	0 (15)
11	0 (150)	0 (15)

O seguinte modelo matemático foi utilizado para verificar os ajustes dos dados obtidos aos dados experimentais: $Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \varepsilon$; sendo Y = funções respostas; β_i= coeficientes de regressão; x_i= variáveis independentes; ε= resíduo (erro experimental).

A partir das funções respostas foi realizada análise de regressão para avaliar o efeito das variáveis independentes e suas interações. A análise de variância (ANOVA) e coeficiente de determinação (R^2) foram realizados para verificar o ajuste do modelo aos dados experimentais. A partir do modelo ajustado proposto foram construídos gráficos de superfície de resposta. O conceito de desejabilidade foi empregado para otimizar as condições de tratamento térmico da farinha de soja integral, no sentido de haver a maior conversão de isoflavonas e baixa atividade dos inibidores de tripsina.

Após obtenção da condição experimental ótima de tratamento térmico da farinha de soja integral (máxima conversão de isoflavonas e baixo teor de inibidores de tripsina), o modelo proposto foi confirmado comparando os valores estimados com os valores experimentais.

Todos os cálculos e gráficos foram realizados utilizando o software Statistica 8.0 (StatSoft Inc, 2007).

4.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.3.1 Determinação da composição química da farinha de soja integral

A composição química da farinha de soja integral foi determinada por meio de análises do teor de proteínas, lipídeos, umidade, cinzas e carboidratos por diferença, utilizando as metodologias descritas pelo Instituto Adolfo Lutz (2008) e os resultados expressos em %.

4.3.2 Determinação dos teores de isoflavonas

As amostras foram desengorduradas com hexano na proporção 1:10 (g:mL) em agitação contínua por 1h à 25^{o}C, seguido de filtração a vácuo. A extração das isoflavonas foi realizada em triplicata, a partir de 0,3 g de amostra desengordurada, utilizando 6 ml de solução extratora contendo água ultra pura : acetona : etanol (1:1:1), conforme Yoshiara et al. (2012). As amostras foram agitadas a cada 15 min por 1h à 25^{o}C. Em seguida, as amostras foram mantidas em banho ultrasônico por 15 min e submetidas à centrifugação (2.100 rpm por 15 min à 4^{o}C) e filtração em membrana de 0,22 µm. As isoflavonas foram separadas e quantificadas por CLUE (cromatografia líquida de ultra eficiência) conforme Handa et al. (2014). O cromatógrafo (Acquity UPLC Sistem, Waters, MA, USA) utilizado foi equipado com coluna de fase reversa (BEH C 18, 50 mm x 2,1 mm, 1,7 µm; Waters) e detector com arranjo diodo (DAD-Waters) ajustado para o comprimento de onda de 260 nm. As alíquotas em triplicata (1,4 µL) foram injetadas automaticamente no equipamento. Foram utilizadas como fase móvel solução de ácido acético pH 3 (eluente A) e acetonitrila (eluente B), em fluxo de 0,7 mL.min^{-1} à 35^{o}C. Foi utilizado o gradiente de eluição não linear, iniciando com 90% A e 10% B, atingindo 100% B após 8 min. Em 9 min o gradiente de eluição retornou ao inicial, resultando em tempo total de corrida de 10 min. A identificação de cada forma química de isoflavona nos cromatogramas gerados foi realizada por

comparação com os espectros de absorção e tempos de retenção dos seus respectivos padrões individuais. As curvas de calibração foram elaboradas com concentrações de 0,1, 0,05, 0,01, 0,005, 0,001 e 0,0005 $mg.mL^{-1}$, para cada padrão de isoflavona. A quantificação das isoflavonas foi realizada por integração das áreas dos picos e padronização externa (área x concentração) usando os padrões individuais de referência. Como as diferentes formas de isoflavonas possuem massa molar diferente, os resultados foram expressos em $\mu mol.g^{-1}$ em base seca, média ± desvio padrão.

4.3.4 Determinação da atividade de inibidores de tripsina

A atividade dos inibidores de tripsina foi determinada pelo método oficial da AOCS (2009). A extração dos inibidores foi realizada em 1 g de amostra desengordurada, adicionando 50 mL de solução de hidróxido de sódio 0,01 M, seguido de agitação por 3 h à 25^{o}C. O pH do extrato foi então ajustado com hidróxido de sódio 0,1 M para 9,3. O extrato foi diluído com água ultra pura (2 mL do extrato para 100 mL de solução). A reação foi conduzida em triplicata adicionando em cada tubo de ensaio 2 mL do extrato diluído e 2 mL da solução de tripsina, seguido de agitação e banho Maria a 37^{o}C. Um tubo do branco foi preparado sem adição da solução de tripsina e um tubo padrão foi preparado adicionando água destilada no lugar do extrato, totalizando assim 5 tubos de ensaio para cada amostra. Após 10 min de reação, foi adicionado 5 mL de solução de BAPNA, pré-aquecida à 37^{o}C. Após 10 min foi adicionado 1 mL de ácido acético 30% para interromper a reação, e completado o volume do tubo do branco com 2 mL de tripsina. Em seguida as soluções foram filtradas em papel de filtro Whatman n^{o} 3 e imediatamente feita a leitura da absorvância no espectrofotômetro ajustado para 410 nm.

Uma unidade de tripsina (1UT) foi definida arbitrariamente como um aumento de 0,01 unidades de absorbância, a 410 nm, para 10 mL de mistura reativa, sob as condições utilizadas neste ensaio. A unidade de inibidores de tripsina (UIT) foi então calculada pela diferença de absorbância entre o tubo padrão e o tubo de amostra. Os níveis de inibidores de tripsina foram expressos como $UIT.g^{-1}$ de amostra em base seca, média ± desvio padrão. O percentual residual de inibidores de tripsina (% de $IT_{residual}$) foi

expresso pela relação entre a quantidade de UIT do ensaio e de UIT da amostra sem tratamento, multiplicado por 100.

REFERÊNCIAS

AMERICAN OIL CHEMIST'S SOCIETY. **Sampling and analysis of oilseed by-products**. Trypsin Inhibitor Activity. AOCS Official Method Ba 12-75. AOCS, 2009.

BAINTNER, K. Trypsin-Inhibitor and Chymotrypsin-Inhibitor Studies with Soybean Extracts. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 29, p. 203-204, 1981.

BARBOSA, A. C. L.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Influence of temperature, pH and ionic strength on the production of isoflavone-rich soy protein isolates. **Food Chemistry**, v. 98, p. 757-766, 2006.

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/soja>. Acesso em 09. fev. 2015a.

BRASIL. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Estatística da Produção Agrícola Maio de 2013 Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/default.shtm>. Acesso em 09. fev. 2015b.

CAIRNS, J. R. K.; ESEN, A.. β-Glucosidases. **Cellular and Molecular Life Science,** v. 67, p. 3389–3405, 2010

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 Agropecuária Brasileira**. v. 38, n. 8, p. 897-902, 2003.

CARRÃO-PANIZZI, M. C.; GÓES-FAVONI, S. P.; KIKUCHI, A. Hydrothermal treatments in the development of isoflavone aglycones in soybean (Glycine max (L.) Merrill) grains. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 47, n. 2, p. 225-232, 2004.

CHIEN, J. T.; HSIEH, H. C.; KAO, T. H.; CHEN, B. H. Kinetic model for studying the conversion and degradation of isoflavones during heating. **Food Chemistry**, v. 91, p. 425-434, 2005.

DI PIETRO, C.M.; LIENER, I.E. Heat inactivation of the Kunitz and Bowman-Birk soybean protease inhibitors. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.37, p.39-44, 1989.

DONG, X.; XU, W.; SIKES, R. A.; WU, C. Combination of low dose of genistein and daidzein has synergistic preventive effects on isogenic human prostate cancer cells when compared with individual soy isoflavone. **Food Chemistry**, v. 141, p. 1923–1933, 2013.

FANG, E. F.; LEUNG, H. H.; FANG, Y; NG T. B. The Health Benefits of Soybeans and Bowman-Birk Inhibitor Concentrate. **Medicinal and Aromatic Plants,** 1: e138. doi:10.4172/2167-0412.1000e138, 2012.

FILIBERTO, A. C.; MUMFORD, S. L; POLLACK, A. Z.; ZHANG, C.; YEUNG, E. H.; PERKINS, N. J.; WACTAWSKI-WENDE, J.; SCHISTERMAN, E. F. Habitual dietary isoflavone intake is associated with decreased C-reactive protein concentrations among healthy premenopausal women. **The Journal of Nutrition**, v. 143, p. 900–906, 2013.

GÓES-FAVONI, S. P. **Desenvolvimento de Farinha de Soja [Glycine max (L.) Merrill] com Maior Teor de Genisteína**. 2002. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos), Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brasil, 2002.

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

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

HSIEH, M. C.; GRAHAM, T. L. Partial purification and characterization of a soybean -glucosidase with high specific activity towards isoflavone conjugates. **Phytochemistry**, v. 58, p. 995-1005, 2001.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos fisico-químicos para análise de alimentos**. 5. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

ISMAIL, B.; HAYES, K.. b-Glycosidase activity towards different glycosidic forms of isoflavones. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4918-4924, 2005.

JOHNSON, L. A.; WHITE, P. J.; GALLOWAY, R. **Soybeans: Chemistry, Production, Processing, and Utilization.** AOAC Press, Urbana, Illinois, 2008.

KAUR, S.; SHARMA, S.; DAR, BN.; SINGH, B. Optimization of process for reduction of antinutritional factors in edible cereal brans. **Food Science and Technology International,** v. 18, p. 445-454, 2012.

KUMAR, V.; RANI, A.; TINDWANI, C.; JAIN, M. Lipoxygenase isozymes and trypsin inhibitor activities in soybean as influenced by growing location. **Food Chemistry,** v. 83, p. 79–83, 2003.

LARKIN, T.A.; PRICE, W.E.; ASTHEIMER, L.B. Increased probiotic yogurt or resistant starch intake does not affect isoflavone bioavailability in subjects consuming a high soy diet. **Nutrition**, v.23, n.20, p.709-718, 2007.

LARKIN, T.A.; PRICE, W. E.; ASTHEIMER, L.B. The Key Importance of Soy Isoflavone Bioavailability to Understanding Health Benefits. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, p. 538-552, 2008.

LEE, S.; LEE, J. Effects of oven-drying, roasting, and explosive puffing process on isoflavone distributions in soybeans. **Food Chemistry,** v. 112, p. 316–320, 2009.

LEE, J. H.; LEE, B. W.; KIM, B.; KIM, H. T.; KO, J. M.; BAEK, I.; SEO, W. T.; KANG, Y. M.; CHO, K. M. Changes in Phenolic Compounds (Isoflavones and Phenolic acids) and Antioxidant Properties in High-Protein Soybean (Glycine max L., cv. Saedanbaek) for Different Roasting Conditions. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry,** v. 56, p. 605–612, 2013.

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

LIN, J.; KRISHNAN, P. G.; WANG, C. Retention of isoflavonas and saponins during the processing of soy protein isolates. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 83, p. 59–63., 2006

LIU, K. **Soybeans: chemistry, technology and utilization.** New York: Chapman & Hall, 1997.

LIU, K. **Soybeans as Functional Foods and Ingredients**. AOCS, 2004.

MATHIAS, K.; ISMAIL, B.; CORVALAN, C.M.; HAYES, K. D. Heat and pH Effects on the Conjugated Forms of Genistin and Daidzin Isoflavones. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v. 54, p. 7495-7502, 2006.

MIURA, E. M. Y.; SILVA, R. S. S. S.; MIZUBUTI, I. Y.; IDA, E. I. Cinética de Inativação de Inibidores de Tripsina e de Insolubilização de Proteínas de Diferentes Cultivares de Soja. **Revista Brasileira de Zootecnica,** v.34, n.5, p.1659-1665, 2005.

MURPHY, P. A.; BARUA, K.; HAUCK, C. C. Solvent Extraction in the determination of isoflavones in sou foods. **Journal of Chromatography.** v.777, p.129-138, 2002.

OSMAN, M. A.; REID, P. M.; WEBER, C. W. Thermal inactivation of tepary bean (Phaseolus acutifolius), soybean and lima bean protease inhibitors: effect of acidic and basic pH. **Food Chemistry.** v.78, p. 419–423, 2002.

PARK, M.-H.; JU, J.-W.; PARK, M.-J.; HAN, J.-S. Daidzein inhibits carbohydrate digestive enzymes in vitro and alleviates postprandial hyperglycemia in diabetic mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 712, p. 48–52, 2013.

QUINHONE JÚNIOR, A.; IDA, E. I. Profile of the contents of different forms of soybean isoflavonas and the effect of germination time on these compounds

and the physical parameters in soybean sprouts. **Food Chemistry***,* v. 166, p. 173–178, 2015.

RIAZ, M. N. **Soy Applications in Food.** CRC Press, Boca Ranton, USA, 2006.

RIBEIRO, M. L.; MANDARINO, J. M. G; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; OLIVEIRA M. C.; CAMPO, C. B.; NEPOMUCENO, A. L; IDA E. I. Isoflavone content and β-glucosidase activity in soybean cultivars of different maturity groups*.* **Journal of Food Composition and Analysis***.* v. 20, p. 19–24, 2007.

SAVAGE, G. P.; MORRISON S. C. **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**. Trypsin Inhibitors, p. 5878-5884, Oxford: Academic Press, 2003.

SNYDER, H.E.; KWON, T.W. **Soybean utilization.** New York: Van Nostrand Reinhold Company, 1987. 346p.

STATSOFT, Inc. 2007. **STATISTICA (data analysis software system)**, version 8.0. www.statsoft.com.

STINTZIN, F. C.; HOFFMAN, M.; CARLE, R. Thermal degradation kinetics of isoflavone aglycones from soy and red clover**. Molecular Nutrition and Food Research,** v. 50, p. 373 – 377, 2006.

SUTIL, G. A.; MANDARINO, J. M. G.; LAURINDO, J. B.; BENASSI, V.; GÓES-FAVONI, S. P.; PETRUS, J. C. C. Effect of hydrothermal treatment and pH on the formation of aglycones in soybean**. European Food Research and Technolology,** v. 227, p. 1729-1731, 2008.

UNGAR, Y.; OSUNDAHUNSI, O. F.; SHIMONI, E. Thermal stability of genistein and daidzein and its effect on their antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v. 51, p. 4394-4399, 2003.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). Economic Research Service. **Soybeans and Oil Crops.** Trade. Major Foreign Soybean Exporters and Importers. Disponível em: < http://www.ers.usda.gov/topics/crops/soybeans-oil-crops/trade.aspx#foreign>. Acesso em 09. fev. 2015a.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). Office of the Chief Economist. **World Agricultural Suply and Demand Estimate.** 2015. World Soybean Supply & Use, p. 28. Disponível em: <http://www.usda.gov/oce/commodity/wasde/latest.pdf >. Acesso em 09. fev. 2015b.

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

VITALE, D. C.; PIAZZA, C.; MELILLI, B.; DRAGO, F.; SALOMONE, S. Isoflavones: estrogenic activity, biological effect and bioavailability. **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 38, p. 15–25, 2013.

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

WANG, H. J.; MURPHY, P. A. Isoflavone composition of American and Japanese soybeans in Iowa: effects of variety, crop year, and location. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 1674-1677, 1994.

WANG, H. J.; MURPHY, P. A. Mass balance study of isoflavonas during soybean processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 2377-2383, 1996.

YOSHIARA, L. Y., MADEIRA, T. B., DELAROZA, F., 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. 9, P. 978-986, 2012.

YUE, X.; ABDALLAH, A. M.; XU, Z. Thermal dynamic properties of isoflavones during dry heating. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, p. 1878-1882, 2010.

ZIEMER, C.J.; GIBSON, G.R. An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. **International Dairy Journal**, v.8, p.473-479, 1998.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos estão redigidos na forma de artigo científico que será submetido para publicação.

5.1 ARTIGO: TRATAMENTO TÉRMICO DA FARINHA DE SOJA INTEGRAL SOBRE A CONVERSÃO DE ISOFLAVONAS E INATIVAÇÃO DE INIBIDORES DE TRIPSINA

TRATAMENTO TÉRMICO DA FARINHA DE SOJA INTEGRAL SOBRE A CONVERSÃO DE ISOFLAVONAS E INATIVAÇÃO DE INIBIDORES DE TRIPSINA

ANDRADE, J. C.; MANDARINO, J. M. G.; KUROZAWA, L. E.; IDA, E. I.*

Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 86051-990, Londrina, Paraná, Brasil; *email: elida@uel.br

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do tratamento térmico da farinha de soja integral sobre a conversão de isoflavonas e inativação de inibidores de tripsina. Grãos de soja foram moídos e obtida a farinha de soja integral (FSI) que foi submetida ao tratamento em estufa por 10, 15 e 20 min a 100, 150 e 200^{o}C conforme o delineamento experimental 3^2. As funções respostas determinadas foram o teor de diferentes formas de isoflavonas e atividade residual de inibidores de tripsina. As diferentes formas de isoflavonas foram quantificadas por cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE). A atividade de inibidores de tripsina foi determinada utilizando o substrato benzoyl-DL-arginine 4-nitroanilide hydrochloride (BAPNA) e por espectrofotometria. Foram estabelecidos modelos matemáticos que estimaram os parâmetros do processo de obtenção de FSI com conversão de isoflavonas e redução na atividade de inibidores de tripsina. O tratamento térmico da FSI em estufa alterou o teor e perfil das diferentes formas de isoflavonas, sendo que a 200^{o}C por 20 min

ocorreu maior conversão das isoflavonas malonilglicosídeos em acetilglicosídeos, β-glicosídeos e agliconas, bem como maior redução na atividade de inibidores de tripsina.

Palavras-chave: Processamento térmico. Calor seco. Tostagem. Isoflavonas da soja. Inibidores de tripsina.

1 INTRODUÇÃO

Dentre os componentes da soja, as isoflavonas têm sido amplamente investigadas (Vitale et al., 2013), devido aos efeitos benéficos à saúde humana, que estão associados com a redução da incidência de doenças cardiovasculares, alguns tipos de câncer, Alzheimer, sintomas de menopausa (Dong et al., 2013; Filiberto et al., 2013; Park, et al., 2013; Wada et al., 2013), diabetes mellitus tipos 1 e 2 (Choi et al., 2008; Park et al., 2013), dentre outras doenças. As isoflavonas da soja estão divididas em quatro formas químicas denominadas de agliconas (daidzeína, gliciteína e genisteína), β-glicosídeos (daidzina, glicitina e genistina), malonilglicosídeos (6”-O-malonildaidzina, 6”-O-malonilglicitina e 6”-O-malonildaidzina) e acetilglicosídeos (6”-O-acetildaidzina, 6”-O-acetilglicitina e 6”-O-acetil genistina) (Wang e Murphy, 1994; Liu, 2004).

Em geral, o conteúdo de isoflavonas em alimentos processados de soja, como na farinha de soja integral, é menor do que no grão, em função de transformações físicas e químicas, incluindo aquelas causadas pelo processamento térmico (Jonhson; White; Galloway, 2008; Villares et al., 2011). A malonilgenistina é a isoflavona predominante no grão de soja e pode ser

convertida em acetilgenistina ou genistina após secagem ou extração em água quente, respectivamente, sendo que o calor úmido é mais favorável à conversão e degradação do que o calor seco (Chien et al., 2005). Sob efeito do calor seco e abaixo de 200^{o}C, as agliconas são mais estáveis do que os β-glicosídeos (Yue, Abdallah e Xu, 2010). Durante o processo de torra, ocorre o aumento no teor de agliconas e β-glicosídeos, enquanto que há redução no teor de malonilglicosídeos (Lee et al., 2013). O nível de energia térmica aplicado e o conteúdo de umidade desempenham papéis importantes no teor e no perfil das isoflavonas nos produtos de soja não fermentados (Lee e Lee, 2009).

A diferença entre as formas químicas de isoflavonas pode afetar sua biodisponibilidade (Mathias et al., 2006). As agliconas, por exemplo, são absorvidas mais facilmente do que os glicosídeos conjugados, pois sua baixa massa molecular facilita a difusão. As formas conjugadas necessitam ser hidrolisadas previamente antes da absorção (Villares et al., 2011). O estudo das condições que levam às interconversões das isoflavonas pode auxiliar no entendimento da relação entre a forma química e os efeitos benéficos à saúde resultantes da ingestão desses compostos.

Além das isoflavonas, a soja possui outros componentes bioativos, como os inibidores de tripsina, aos quais têm sido atribuídos efeitos antinutricionais resultantes do consumo de soja. Para promover um aumento da qualidade nutricional da proteína da soja é necessária a inativação térmica desses compostos (Liu, 2004). Os métodos mais eficazes para inativação de fatores antinutricionais em farelos de cereais incluem o calor seco e o calor úmido (Kaur et al. 2012). O incremento, tanto na umidade quanto na

temperatura, promove uma inativação mais rápida desses inibidores (DiPietro e Liener, 1989; Miura et al., 2005). Na matriz da farinha de soja, os inibidores de proteases podem ser inativados em 30 min com banho em ebulição (DiPietro e Liener, 1989).

Considerando que o processamento térmico é uma das operações mais utilizadas na indústria de alimentos e que este afeta diretamente as transformações das diferentes formas de isoflavonas, assim como a inativação dos inibidores de tripsina, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do tratamento térmico da farinha de soja integral sobre a conversão de isoflavonas e inativação de inibidores de tripsina.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Matéria-prima e Reagentes

Foram utilizados como matéria-prima grãos de soja da cultivar BRS 257, safra 2013, produzidos na região de Mauá da Serra, Paraná, Brasil. Estes grãos foram fornecidos pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Soja (Londrina-PR). Esta cultivar convencional possui características para alimentação humana em função da ausência das enzimas lipoxigenases.

Para determinação das isoflavonas foram utilizados os padrões 6''-O-Acetilglicosídeos e 6''-O-Malonilglicosídeos (Wako Pure Chemical Industries, Ltda., Osaka, Japan) e β-Glicosídeos e Agliconas (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA). Para determinação dos inibidores de tripsina foram utilizados os

padrões de tripsina e o substrato benzoyl-DL-arginine 4-nitroanilide hydrochloride - BAPNA (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA). Os outros reagentes utilizados foram de grau analítico ou grau cromatográfico.

2.2 Obtenção da Farinha de Soja Integral

Os grãos de soja foram previamente selecionados e triturados (moinho com refrigeração TECNAL, TE 631, Brasil) a 27.000 rpm por 1 min para obter a farinha de soja integral (FSI). Esta farinha foi embalada a vácuo e conservada a - 22^{o}C até a determinação da composição química e avaliação dos efeitos do tratamento térmico.

2.3 Efeito do Tratamento Térmico da Farinha de Soja Integral

Para avaliar os efeitos do tratamento térmico da FSI sobre o teor de diferentes formas de isoflavonas e inibidores de tripsina, foi utilizado o delineamento experimental 3^2 com 9 ensaios e adicionado de 2 replicatas no ponto central, totalizando 11 ensaios que foram realizados aleatoriamente. As variáveis investigadas foram temperatura (X_1= 100, 150 e 200°C) e tempo (X_2= 10, 15 e 20 min) e as funções respostas avaliadas na FSI tratada (FSI_{trat}) foram expressas pelo teor de daidzina (Dai), glicitina (Gli), genistina (Gen), malonildaidzina (MDai), malonilglicitina (MGli), malonilgenistina (MGen), daidzeína (ADai), gliciteína (AGli), genisteína (AGen), acetildaidzina (AcDai), acetilglicitina (AcGli), acetilgenistina (AcGen) e % de atividade residual de inibidores de tripsina (% de $IT_{residual}$). Para cada ensaio foram utilizadas 40 g da

FSI pesadas em placa de vidro (100 x 15 mm) e fechadas. Em seguida, o material foi colocado em estufa (Nova Ética, 402-5W, série 10916/08, Brasil) previamente estabilizada nas temperaturas (X_1) e tempos (X_2) conforme o delineamento. Os níveis máximos utilizados de 200^{o}C e 20 min foram estabelecidos após ensaios preliminares. Os níveis acima destas condições foram indesejáveis devido a alteração da integridade da amostra. Ao final de cada tratamento, a amostra foi imediatamente resfriada em gelo até atingir a temperatura de 25^{o}C. As amostras foram embaladas a vácuo e conservadas à – 22^{o}C até a realização das análises.

2.4 Determinação da Composição Química

A composição química da FSI foi determinada por meio de análises do teor de proteínas, lipídeos, umidade, cinzas e carboidratos por diferença, utilizando as metodologias descritas pelo Instituto Adolfo Lutz (2008) e os resultados expressos em %.

2.5 Determinação do Teor das Diferentes Formas de Isoflavonas

As amostras foram desengorduradas com hexano na proporção 1:10 (g:mL) e agitação contínua por 1h à 25^{o}C, seguido de filtração a vácuo. A extração das isoflavonas foi realizada em triplicata, a partir de 0,3 g de amostra desengordurada com 6 mL de solução extratora contendo água ultra pura : acetona : etanol (1:1:1), conforme Yoshiara et al. (2012). As amostras foram agitadas a cada 15 min por 1h a 25^{o}C. Em seguida, foram mantidas em banho

ultrasônico por 15 min, centrifugadas (2.100 rpm por 15 min à 4^{o}C) e filtradas com membrana de 0,22 µm. As isoflavonas foram separadas e quantificadas por cromatografia líquida de ultra desempenho (CLUE), conforme Handa et al. (2014). A identificação de cada forma química de isoflavona foi realizada por comparação com os espectros de absorção e tempos de retenção dos seus respectivos padrões individuais. As curvas de calibração foram construídas a partir de concentrações de 0,1, 0,05, 0,01, 0,005, 0,001 e 0,0005 mg de cada padrão de isoflavona por mL de solução. A quantificação das isoflavonas foi realizada por integração das áreas dos picos e padronização externa (área x concentração) usando os padrões individuais de referência. Como as diferentes formas de isoflavonas possuem massas molares distintas, a média e o desvio padrão foram expressos em µmol de isoflavonas/g de amostra em base seca.

2.6 Atividade de Inibidores de Tripsina

A atividade dos inibidores de tripsina foi determinada pelo método oficial da AOCS (2009), utilizando 1 g de amostra desengordurada e extração com 50 mL de solução de hidróxido de sódio 0,01 M, seguido de agitação por 3h à 25^{o}C.

Uma unidade de tripsina (1UT) foi definida arbitrariamente como um aumento de 0,01 unidade de absorbância, a 410 nm, para 10 mL de mistura reativa (2 mL alíquota, 2 mL solução de tripsina, 5 mL solução de BAPNA e 1 mL de solução de ácido acético para interromper a reação), sob as condições utilizadas neste ensaio (banho Maria a 37^{o}C por 10 min). A unidade de inibidores de tripsina (UIT) foi calculada pela diferença de absorbância entre o

tubo padrão e o tubo de amostra. Os níveis de inibidores de tripsina foram expressos como $UIT.g^{-1}$ de amostra em base seca. O percentual residual de inibidores de tripsina (% de $IT_{residual}$) foi expresso pela relação entre a quantidade de UIT do ensaio e UIT da amostra sem tratamento, multiplicado por 100.

2.7 Análise Estatística

A metodologia de superfície de resposta foi utilizada para analisar a região de máxima conversão de isoflavonas e mínimo residual de inibidores de tripsina. Os modelos foram obtidos por meio de análise de variância (ANOVA, p=0,05) e análise de regressão utilizando o software Statistic 8.0 (Statsoft, Tulsa, OK, USA) e construídos os gráficos de superfície de resposta e desejabilidade. O modelo para cada função resposta foi expresso na forma da equação $Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \varepsilon$, onde Y é a função resposta, x_1 e x_2 são os níveis das variáveis codificadas, β são os coeficientes estimados pela regressão e ε é o erro.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização da Farinha de Soja Integral

Os constituintes químicos da FSI foram quantificados apresentando em base seca 36,84 ± 0,06% de proteína, 22,48 ± 0,12% de lipídeos, 5,30 ± 0,05% de cinzas e 35,46 ± 0,09% de carboidratos estimados por diferença. Esses

teores foram similares à FSI descrita por Liu (2004). O teor de inibidores de tripsina da FSI foi de 24.390 ± 298 UIT.g^{-1}, inferior ao descrito na FSI por Liu (2004). Segundo Kumar et al. (2003), a cultivar e a interação entre cultivar e local de cultivo influenciam o teor de inibidores de tripsina.

O teor de isoflavonas totais da FSI foi de 5,93 ± 0,14 μmol/g (Tabela 1), sendo que 64% foram constituídos por malonilglicosídeos (38% malonilgenistina, 22% malonildaidzina e 4% malonilglicitina). Esta predominância de malonilglicosídeos também foi observada em cultivares de soja BRS 257 (Lima e Ida, 2014) e BRS 284 (Quinhoni Júnior e Ida, 2015). A isoflavona genisteína correspondeu a 2% das isoflavonas totais e foi a única aglicona detectada na FSI. Resultados similares foram descritos em 18 cultivares de soja, cujo teor de isoflavonas totais apresentou 65% de malonilgenistina e malonildaidizina e 2% de agliconas (Ribeiro et al., 2007). Os acetilglicosídeos não foram detectados na FSI. Segundo Villares et al. (2011), os acetilglicosídeos são produzidos a partir da clivagem do grupo carboxila dos malonilglicosídeos em processos que envolvem calor e baixa disponibilidade de água. Os β-glicosídeos da FSI representaram 34% das isoflavonas totais (18% de genistina e 16% de daidzina) e a glicitina não foi detectada. Wang e Murphy (1994) observaram que em grãos de soja de diferentes cultivares, o teor de isoflavonas totais variou entre 2,62 e 8,97 μmol/g e o teor de glicitina e derivados foi baixo.

3.2 Efeito do Tratamento Térmico da Farinha de Soja Integral sobre o Teor das Diferentes Formas de Isoflavonas

O efeito das variáveis independentes temperatura (X_1) e tempo (X_2) na FSI, sobre as funções respostas das diferentes formas de isoflavonas, está apresentado na Tabela 2. De acordo com os parâmetros de regressão e análise de variância (ANOVA) para a MDai, as variáveis x_1 e x_2 apresentaram efeitos linear e quadrático negativos e significativos, bem como a interação x_1x_2 ($p<0,05$). A falta de ajuste do modelo não foi significativa ($p>0,05$) e 99% (R^2) dos dados experimentais foram explicados pelo modelo: $MDai = 1,17 - 0,25x_1 - 0,123x_1^2 - 0,108x_2 - 0,038x_2^2 - 0,125x_1x_2$. A superfície de resposta e os parâmetros de desejabilidade (Figura 1) indicaram que a MDai foi mínima (0,53 µmol/g de FSI) quando $x_1 = 1$ ($X_1 = 200^oC$) e $x_2 = 1$ ($X_2 = 20$ min). Nestas condições, a MDai reduziu 59,23% quando comparada com o teor de malonildaidzina da FSI (1,30 ± 0,04 µmol/g) sem tratamento térmico (Tabela 1). A redução das formas malonildaidzina e malonilgenistina também foi observada por Lee e Lee (2009) em grãos de soja submetidos em uma estufa a 100°C por 120 min. Observaram também que no processo de torra a 200°C por 21 min, o teor de malonilglicosídeos foi reduzido e mais acentuado do que em estufa a 100°C por 120 min.

A AcDai não foi avaliada na FSI_{trat} devido a não detecção nos ensaios de 1 a 4 e nas replicatas do ponto central. Entretanto, AcDai foi detectada nos ensaios 7, 8 e 9 a 200°C, cujo teor aumentou conforme o aumento do tempo (10, 15 e 20 min) ($p<0,05$). O tratamento térmico da FSI_{trat} nesta condição de maior temperatura (200°C) favoreceu a conversão da isoflavona malonildaidzina (Figura 1) em acetildaidzina (Tabela 2). O mesmo também foi observado por Villares et al. (2011) sobre os acetilglicosídeos que são produzidos a partir dos malonilglicosídeos em processos com calor seco.

Os parâmetros de regressão e análise de variância (ANOVA) para a Dai indicaram que a variável x_1 apresentou efeito linear positivo e significativo ($p<0,05$). Embora os efeitos linear e quadrático da variável x_2 não tenham sido significativos ($p=0,065$ e $p=0,058$ respectivamente), os mesmos foram mantidos na equação visando melhorar o ajuste do modelo aos dados experimentais. A falta de ajuste do modelo não foi significativa ($p>0,05$) e 92% (R^2) dos dados experimentais foram explicados pelo modelo: $Dai = 0,892 + 0,077x_1 + 0,035x_2 – 0,054x_2^2$. A superfície de resposta e os parâmetros de desejabilidade (Figura 2) indicaram que a Dai foi máxima (0,97 µmol/g de FSI) quando $x_1 = 1$ ($X_1 = 200^oC$) e $x_2 = 0,5$ ($X_2 = 17,5$ min). No gráfico de desejabilidade observa-se que não houve diferença quando $0,5 < x_1 < 1$ ou $175^oC < X_1 < 200^oC$ e $- 0,5 < x_2 < 1$ ou $12,5 \text{ min} < X_2 < 20$ min. Estes resultados indicaram que na FSI_{trat} obtida neste intervalo de tempo e temperatura a Dai aumentou 6,59% quando comparada com o teor de daidzina da FSI (0,91 ± 0,03 µmol/g) sem tratamento térmico (Tabela 1). O aumento de β-glicosídeos e agliconas também foi observado em grãos de soja torrados a 200^oC por 10 min, como consequência da redução de malonilglicosídeos (Lee et al., 2013).

A ADai na FSI_{trat} não foi avaliada devido a não detecção nos ensaios 1, 2, 4, 6 e 8. Destaca-se que a presença da aglicona daidzeína foi observada a 100^oC por 20 min (ensaio 3), 150^oC por 15 min (ensaios 5, 10 e 11) e a 200^oC por 10 min (ensaio 7) ou 20 min (ensaio 9). Nestas condições, possivelmente ocorreu a conversão de isoflavonas daidzina, acetildaidzina e malonildaidzina em aglicona daidzeína. Sendo que a ADai foi maior (0,23 ± 0,01 µmol/g) no ensaio 9, no qual foi aplicado maior temperatura e tempo para obtenção da FSI_{trat} ($p<0,05$). Entretanto, Yue et al. (2010), utilizando soluções modelo e

calor seco acima de 150°C após 30 min, observaram uma taxa de conversão de 21,8% e 22,2% de β-glicosídeos daidzina e genistina, respectivamente, em suas correspondentes formas agliconas daidzeína e genisteína.

Os parâmetros de regressão e análise de variância (ANOVA) para a função resposta MGen, indicaram que as variáveis x_1 e x_2 e interação x_1x_2 apresentaram efeitos linear negativo e significativo ($p<0,05$). A variável x_1 também apresentou efeito quadrático negativo e significativo ($p<0,05$). A falta de ajuste do modelo não foi significativa ($p>0,05$) e 99% (R^2) dos dados experimentais foram explicados pelo modelo: $MGen = 1,989 - 0,405x_1 - 0,238x_1^2 - 0,208x_2 - 0,202x_1x_2$. A superfície de resposta e os parâmetros de desejabilidade (Figura 3) indicaram que a MGen foi mínima (0,94 µmol/g de FSI) quando $x_1 = 1$ ($X_1 = 200°C$) e $x_2 = 1$ ($X_2 = 20$ min). Nestas condições, a MGen reduziu 58,04% quando comparada com o teor de malonilgenistina da FSI (2,24 ± 0,05 µmol/g) sem tratamento térmico (Tabela 1). Efeito similar foi observado para a MDai (Figura 1).

A AcGen não foi avaliada na FSI_{trat} devido à não detecção nos ensaios de 1 a 4. Entretanto, a AcGen foi detectada nas replicatas do ponto central (150°C por 15 min) e, nos ensaios de 6 a 9 (200°C), a AcGen aumentou conforme o aumento do tempo (10, 15 e 20 min) ($p<0,05$). A conversão da isoflavona malonilgenistina em acetilgenistina ocorreu na FSI_{trat} a partir do tratamento térmico a 150°C por 15 min. Destaca-se que esta temperatura aplicada na FSI_{trat} foi menor do que a temperatura mínima (200°C) para conversão de malonildaidzina em acetildaidzina. A conversão de malonilgenistina em acetilgenistina também foi investigada por Chien et al. (2005), que avaliaram sistemas modelo das quatro formas de isoflavonas

genistina aplicando calor seco em diferentes condições de tempo e temperatura. Os autores observaram que, quando a malonilgenistina foi submetida a 100^{o}C por 120 min, ocorreu a formação de acetilgenistina, enquanto que a 150^{o}C, o teor de malonilgenistina reduziu e os de acetilgenistina e genistina aumentaram. A 200^{o}C, a malonilgenistina foi convertida a acetilgenistina, genistina e genisteína. Entretanto, foi observado que em grãos de soja torrados entre 160^{o}C e 200^{o}C e entre 5 e 15 min, não ocorreu a formação de acetilglicosídeos (Lee et al., 2013).

Os parâmetros de regressão e análise de variância (ANOVA) para a Gen indicaram que as variáveis x_1 e x_2 e interação x_1x_2 apresentaram efeitos linear positivo e significativo ($p<0,05$). A falta de ajuste do modelo não foi significativa ($p>0,05$) e 98% (R^2) dos dados experimentais foram adequadamente ajustados ao modelo: $Gen = 1,07 + 0,087x_1 + 0,047x_2 + 0,053x_1x_2$. A superfície de resposta e os parâmetros de desejabilidade (Figura 4) indicaram que a Gen foi máxima (1,26 µmol/g de FSI) quando $x_1 = 1$ (X_1 = 200^{o}C) e $x_2 = 1$ (X_2 = 20 min). No gráfico de desejabilidade, observa-se que não houve diferença quando $0,5 < x_2 < 1$ ou 17,5 min $< X_2 <$ 20 min. Estes resultados indicaram que na FSI_{trat} obtida neste intervalo de tempo e temperatura de 200^{o}C, a Gen aumentou 16,67% quando comparada com a genistina da FSI (1,08 ± 0,02 µmol/g) sem tratamento térmico (Tabela 1). Destaca-se que este aumento foi maior do que o observado para a Dai (Figura 2).

Os parâmetros de regressão e análise de variância (ANOVA) para a função resposta AGen indicaram que a variável x_1 apresentou efeito quadrático negativo e significativo, enquanto que a variável x_2 apresentou efeito linear

positivo e significativo ($p<0,05$). Embora o efeito da interação x_1x_2 não tenha sido significativo ($p=0,088$), o mesmo foi mantido na equação visando melhorar o ajuste do modelo aos dados experimentais. A falta de ajuste do modelo não foi significativa ($p>0,05$) e 81% (R^2) dos dados experimentais foram adequadamente explicados pelo modelo: $AGen = 0,172 - 0,018x_1^2 + 0,01x_2 - 0,01x_1x_2$. Entretanto, observa-se na superfície de resposta e parâmetros de desejabilidade (Figura 5) que a AGen na FSI_{trat} não diferiu em todo o intervalo de tempo e temperatura investigado ($p>0,05$). Em relação à FSI sem tratamento térmico, a AGen permaneceu estável.

A MGli não foi avaliada devido a não detecção no ensaio 9. Neste ensaio, o tratamento térmico a 200°C por 20 min ocasionou possivelmente uma degradação da malonilglicitina, dado que esta forma química foi detectada na FSI sem tratamento. A conversão em acetilglicitina, glicitina ou gliciteína não foi observada uma vez que as AcGli, Gli e AGli não foram detectadas (Tabela 2). Considerando que a FSI sem tratamento térmico apresentou o teor de malonilglicitina de 0,26 ± 0,00 μmol/g, observou-se que os outros ensaios, quando comparados à FSI sem tratamento térmico, não apresentaram diferenças significativas ($p>0,05$).

A partir de MDai e MGen foi estimado que as regiões de teor mínimo ocorreram quando $x_1 = 1$ e $x_2 = 1$ ou $X_1 = 200$°C e $X_2 = 20$ min. Nesta mesma condição, Dai, Gen e AGen apresentaram regiões de máximo teor que correspondeu ao ensaio 9 (Tabela 2). Neste ensaio, os β-glicosídeos (Dai e Gen), os malonilglicosídeos (MDai e MGen), os acetilglicosídeos (AcDai e AcGen) e as agliconas (ADai e AGen) representaram respectivamente 42%, 26%, 25% e 7% do teor de isoflavonas totais (5,77± 0,10 μmol/g). Portanto,

observou-se uma redução de 2,5 vezes no teor de malonilglicosídeos, um aumento de 1,2 vezes e 3,5 vezes no teor de β-glicosídeos e de agliconas, respectivamente, bem como a formação de daidzeína, acetildaidzina e acetilgenistina, uma vez que estas isoflavonas não foram detectadas na FSI sem tratamento (Tabela 1).

A partir dos modelos, as respectivas funções respostas estimadas MDai, Dai, MGen, Gen e AGen foram confirmadas na condição do ensaio 9 (x_1 = 1 e x_2 = 1 ou X_1 = 200°C e X_2 = 20 min). Comparando com as funções respostas experimentais (Tabela 2), observou-se que os valores obtidos foram próximos e com desvios aceitáveis entre ± 0,01 e ± 0,08 (μmol/g), indicando que os modelos foram adequados para predição das funções respostas MDai, Dai, MGen, Gen e AGen no tratamento térmico da FSI.

3.3 Efeito do Tratamento Térmico da Farinha de Soja Integral sobre a Atividade dos Inibidores de Tripsina

O efeito das variáveis independentes temperatura (X_1) e tempo (X_2) na FSI, sobre a função resposta % de $IT_{residual}$ está apresentado na Tabela 2. De acordo com os parâmetros de regressão e análise de variância (ANOVA) para a % de $IT_{residual}$, a variável x_1 apresentou efeito linear negativo e significativo ($p<0,05$). Embora o efeito linear da variável x_2 não tenha sido significativo ($p=0,069$), o mesmo foi mantido na equação visando melhorar o ajuste do modelo aos dados experimentais. A falta de ajuste do modelo não foi significativa ($p>0,05$) e 85% (R^2) dos dados experimentais foram explicados pelo modelo: % de $IT_{residual}$ = 71,4 – 28,58x_1 – 10,15x_2. A superfície de resposta

e os parâmetros de desejabilidade (Figura 6) indicaram que a % de $IT_{residual}$ foi mínima (32,67% de FSI) quando $x_1 = 1$ e $x_2 = 1$ ou $X_1 = 200^oC$ e $X_2 = 20$ min. No gráfico de desejabilidade, observa-se que não houve diferença quando $0 < x_1 < 1$ ou $150^oC < X_1 < 200^oC$ e independente da variável x_2. Resultados similares foram observados por Baintner (1981), em FSI submetida à estufa a 165^oC por 1 h, onde a atividade dos inibidores de tripsina foi reduzida drasticamente. Entretanto, o tratamento hidrotérmico do extrato de feijão tepary a 100^oC por 1 h inativou totalmente os inibidores de tripsina (Osman et al., 2002). Os farelos de cereais submetidos à temperatura de 100^oC por 25 min com calor úmido (vapor) e com calor seco em estufa com circulação de ar, resultaram em 17% e 20% de $IT_{residual}$, respectivamente (Kaur et al., 2012).

A partir do modelo, a função resposta estimada de % de $IT_{residual}$ também foi confirmada na condição do ensaio 9 ($x_1 = 1$ e $x_2 = 1$ ou $X_1 = 200^oC$ e $X_2 = 20$ min). Comparando com a função resposta experimental (Tabela 2), observou-se que o valor obtido foi próximo e com desvio aceitável de ± 0,33 (% de FSI).

4 CONCLUSÃO

O tratamento térmico da FSI em estufa alterou o teor e perfil das diferentes formas de isoflavonas. O tratamento da FSI a 200^oC por 20 min ocasionou maior conversão das isoflavonas malonilglicosídeos em acetilglicosídeos, β-glicosídeos e agliconas, bem como maior redução na atividade de inibidores de tripsina. Na FSI submetida a 200^oC por 20 min, ocorreu uma redução de 2,5 vezes no teor de malonilglicosídeos, um aumento de 1,2 vezes e 3,5 vezes no teor de β-glicosídeos e de agliconas,

respectivamente, bem como a formação de daidzeína, acetildaidzina e acetilgenistina, sendo que a atividade residual de inibidores de tripsina foi de 33,67%. Modelos matemáticos foram estabelecidos e poderão ser utilizados na definição de parâmetros de processo para obtenção de FSI com conversão de isoflavonas e redução na atividade de inibidores de tripsina. Desta forma, para obter uma FSI com máxima conversão de isoflavonas e mínimo residual de inibidores de tripsina, recomenda-se utilizar o calor seco a 200^{o}C por 20 min.

AGRADECIMENTOS

À Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio financeiro ao Programa PRONEX/CNPq. Ida, E. I. agradece pela bolsa de produtividade do CNPq.

REFERÊNCIAS

AMERICAN OIL CHEMIST'S SOCIETY. *Sampling and analysis of oilseed by-products*. Trypsin Inhibitor Activity. AOCS Official Method Ba 12-75. AOCS, 2009.

BAINTNER, K. Trypsin-Inhibitor and Chymotrypsin-Inhibitor Studies with Soybean Extracts. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, v. 29, p. 203-204, 1981.

CHIEN, J. T.; HSIEH, H. C.; KAO, T. H.; CHEN, B. H. Kinetic model for studying the conversion and degradation of isoflavones during heating. *Food Chemistry*, v. 91, p. 425-434, 2005.

CHOI, M. S.; JUNG, U. J.; YEO, J.; KIM, M. J.; LEE, M. K. Genistein and daidzein prevent diabetes onset by elevating insulin level and altering hepatic gluconeogenic and lipogenic enzyme activities in non-obese diabetic (NOD) mice. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, v. 24, p. 74–81, 2008.

DI PIETRO, C.M.; LIENER, I.E. Heat inactivation of the Kunitz and Bowman-Birk soybean protease inhibitors. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, v.37, p.39-44, 1989.

DONG, X.; XU, W.; SIKES, R. A.; WU, C. Combination of low dose of genistein and daidzein has synergistic preventive effects on isogenic human prostate cancer cells when compared with individual soy isoflavone. *Food Chemistry*, v. 141, p. 1923–1933, 2013.

FILIBERTO, A. C.; MUMFORD, S. L; POLLACK, A. Z.; ZHANG, C.; YEUNG, E. H.; PERKINS, N. J.; WACTAWSKI-WENDE, J.; SCHISTERMAN, E. F. Habitual dietary isoflavone intake is associated with decreased C-reactive protein concentrations among healthy premenopausal women. *The Journal of Nutrition*, v. 143, p. 900–906, 2013.

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

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. *Métodos fisico-químicos para análise de alimentos.* 5. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

JOHNSON, L. A.; WHITE, P. J.; GALLOWAY, R. *Soybeans: Chemistry, Production, Processing, and Utilization.* AOAC Press, Urbana, Illinois, 2008.

KAUR, S.; SHARMA, S.; DAR, BN.; SINGH, B. Optimization of process for reduction of antinutritional factors in edible cereal brans. *Food Science and Technology International.* v. 18, p. 445-454, 2012.

KUMAR, V.; RANI, A.; TINDWANI, C.; JAIN, M. Lipoxygenase isozymes and trypsin inhibitor activities in soybean as influenced by growing location. *Food Chemistry.* v. 83, p. 79–83, 2003.

LEE, S.; LEE, J. Effects of oven-drying, roasting, and explosive puffing process on isoflavone distributions in soybeans. *Food Chemistry***.** v. 112, p. 316–320, 2009.

LEE, J. H.; LEE, B. W.; KIM, B.; KIM, H. T.; KO, J. M.; BAEK, I.; SEO, W. T.; KANG, Y. M.; CHO, K. M. Changes in Phenolic Compounds (Isoflavones and Phenolic acids) and Antioxidant Properties in High-Protein Soybean

(Glycine max L., cv. Saedanbaek) for Different Roasting Conditions. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry.* v. 56, p. 605–612, 2013.

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

LIU, K. *Soybeans as Functional Foods and Ingredients*. AOCS, 2004.

MATHIAS, K.; ISMAIL, B.; CORVALAN, C.M.; HAYES, K. D. Heat and pH Effects on the Conjugated Forms of Genistin and Daidzin Isoflavones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* v. 54, p. 7495-7502, 2006.

MIURA, E. M. Y.; SILVA, R. S. S. S.; MIZUBUTI, I. Y.; IDA, E. I. Cinética de Inativação de Inibidores de Tripsina e de Insolubilização de Proteínas de Diferentes Cultivares de Soja. *Revista Brasileira de Zootecnia,* v.34, n.5, p.1659-1665, 2005.

OSMAN, M. A.; REID, P. M.; WEBER, C. W. Thermal inactivation of tepary bean (Phaseolus acutifolius), soybean and lima bean protease inhibitors: effect of acidic and basic pH. *Food Chemistry,* v.78, p. 419–423, 2002.

PARK, M.-H.; JU, J.-W.; PARK, M.-J.; HAN, J.-S. Daidzein inhibits carbohydrate digestive enzymes in vitro and alleviates postprandial hyperglycemia in diabetic mice. *European Journal of Pharmacology,* v. 712, p. 48–52, 2013.

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

RIBEIRO, M. L.; MANDARINO, J. M.; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; OLIVEIRA M. C.; CAMPO, C. B.; NEPOMUCENO, A. L; IDA E. I. Isoflavone content and β-glucosidase activity in soybean cultivars of different maturity groups*. Journal of Food Composition and Analysis.* v. 20, p. 19–24, 2007.

VITALE, D. C.; PIAZZA, C.; MELILLI, B.; DRAGO, F.; SALOMONE, S. Isoflavones: estrogenic activity, biological effect and bioavailability. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics,* v. 38, p. 15–25, 2013.

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

WADA, K.; NAKAMURA, K.; TAMAI, Y.; TSUJI, M.; KAWACHI, T.; HORI, A.; TAKEYAMA, N.; TANABASHI, S.; MATSUSHITA, S.; TOKIMITSU, N.;

NAGATA, C. Soy isoflavone intake and breast cancer risk in Japan: from the Takayama study. *International Journal of Cancer*, v. 133, p. 952–960, 2013.

WANG, H. J.; MURPHY, P. A. Isoflavone composition of American and Japanese soybeans in Iowa: effects of variety, crop year, and location. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 42, p. 1674-1677, 1994.*

YOSHIARA, L. Y., MADEIRA, T. B., DELAROZA, F., SILVA, J. B., & IDA, E. I. Optimization of soy isoflavone extraction with different solvents using the simplex-centroid mixture design. *International Journal of Food Science and Nutrition,* V. 9, P. 978-986, 2012.

YUE, X.; ABDALLAH, A. M.; XU, Z. Thermal dynamic properties of isoflavones during dry heating. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 45, p. 1878-1882, 2010.

Tabela 1 – Teor das diferentes formas de isoflavonas* na farinha de soja integral sem tratamento térmico.

Malonilglicosídeos		Acetilglicosídeos		β-Glicosídeos		Agliconas	
Malonildaidzina	1,30 ± 0,04	Acetildaidzina	nd	Daidzina	0,91 ± 0,03	Daidzeína	nd
Malonilglicitina	0,26 ± 0,00	Acetilglicitina	nd	Glicitina	nd	Gliciteína	nd
Malonilgenistina	2,24 ± 0,05	Acetilgenistina	nd	Genistina	1,08 ± 0,02	Genisteína	0,14 ± 0,00

* expresso em $\mu mol.g^{-1}$, base seca, nd = não detectado

Tabela 2 – Variáveis originais e codificadas e funções respostas das diferentes formas de isoflavonas e inibidores de tripsina na farinha de soja integral tratada.

Variáveis originais e codificadas			Funções respostas (μmol.g^{-1}, base seca)												
			Malonilglicosídeos			Acetilglicosídeos			B-Glicosídeos			Agliconas			Inibidores de Tripsina
Ensaios	x_1 (X_1, °C)	x_2 (X_2, min)	MDai	MGli	MGen	AcDai	AcGli	AcGen	Dai	Gli	Gen	ADai	AGli	AGen	% de $IT_{residual}$
1	-1 (100)	-1 (10)	1,19 ± 0,04	0,26 ± 0,00	2,25 ± 0,05	nd	nd	nd	0,83 ± 0,03	nd	1,06 ± 0,02	nd	nd	0,14 ± 0,00	107,27 ± 1,87
2	-1 (100)	0 (15)	1,35 ± 0,13	0,33 ± 0,05	2,08 ± 0,05	nd	nd	nd	0,77 ± 0,07	nd	0,93 ± 0,02	nd	nd	0,14 ± 0,00	96,66 ± 2,61
3	-1 (100)	1 (20)	1,22 ± 0,09	0,27 ± 0,00	2,23 ± 0,06	nd	nd	nd	0,84 ± 0,05	nd	1,03 ± 0,01	0,21 ± 0,00	nd	0,19 ± 0,00	110,04 ± 3,58
4	0 (150)	-1 (10)	1,29 ± 0,03	0,30 ± 0,01	2,11 ± 0,03	nd	nd	nd	0,72 ± 0,02	nd	0,93 ± 0,01	nd	nd	0,17 ± 0,00	87,31 ± 1,48
5	0 (150)	0 (15)	1,10 ± 0,07	0,27 ± 0,00	2,01 ± 0,01	nd	nd	0,08 ± 0,00	0,95 ± 0,04	nd	1,13 ± 0,01	0,20 ± 0,01	nd	0,17 ± 0,00	68,35 ± 0,88
6	0 (150)	1 (20)	1,08 ± 0,04	0,27 ± 0,02	1,71 ± 0,04	nd	nd	0,08 ± 0,00	0,78 ± 0,03	nd	1,06 ± 0,02	nd	nd	0,17 ± 0,00	46,42 ± 0,57
7	1 (200)	-1 (10)	0,94 ± 0,07	0,25 ± 0,00	1,88 ± 0,04	0,38 ± 0,02	nd	0,18 ± 0,01	0,93 ± 0,07	nd	1,14 ± 0,03	0,19 ± 0,00	nd	0,16 ± 0,00	55,92 ± 0,76
8	1 (200)	0 (15)	0,85 ± 0,01	0,27 ± 0,01	1,20 ± 0,02	0,48 ± 0,01	nd	0,37 ± 0,00	0,90 ± 0,01	nd	1,08 ± 0,01	nd	nd	0,14 ± 0,00	53,47 ± 1,74
9	1 (200)	1 (20)	0,47 ± 0,03	nd	1,05 ± 0,01	0,76 ± 0,06	nd	0,69 ± 0,02	1,07 ± 0,03	nd	1,32 ± 0,02	0,23 ± 0,01	nd	0,17 ± 0,00	33,13 ± 0,53
10	0 (150)	0 (15)	1,10 ± 0,05	0,27 ± 0,00	2,12 ± 0,03	nd	nd	nd	0,92 ± 0,04	nd	1,14 ± 0,01	0,21 ± 0,00	nd	0,18 ± 0,00	67,45 ± 1,58
11	0 (150)	0 (15)	1,15 ± 0,09	0,27 ± 0,00	2,09 ± 0,05	nd	nd	0,06 ± 0,00	0,99 ± 0,09	nd	1,16 ± 0,02	0,21 ± 0,00	nd	0,18 ± 0,00	60,72 ± 2,53

MDai = malonildaidzina, MGli = malonilglicitina, MGen = malonilgenistina, AcDai =acetildaidzina, AcGli = acetilglicitina, AcGen = acetilgenistina, Dai = daidzina, Gli = glicitina, Gen = genistina, ADai = daidzeína, AGli = gliciteína, AGen = genisteína, % $IT_{residual}$ = % residual de atividade de inibidores de tripsina, nd = não detectado.

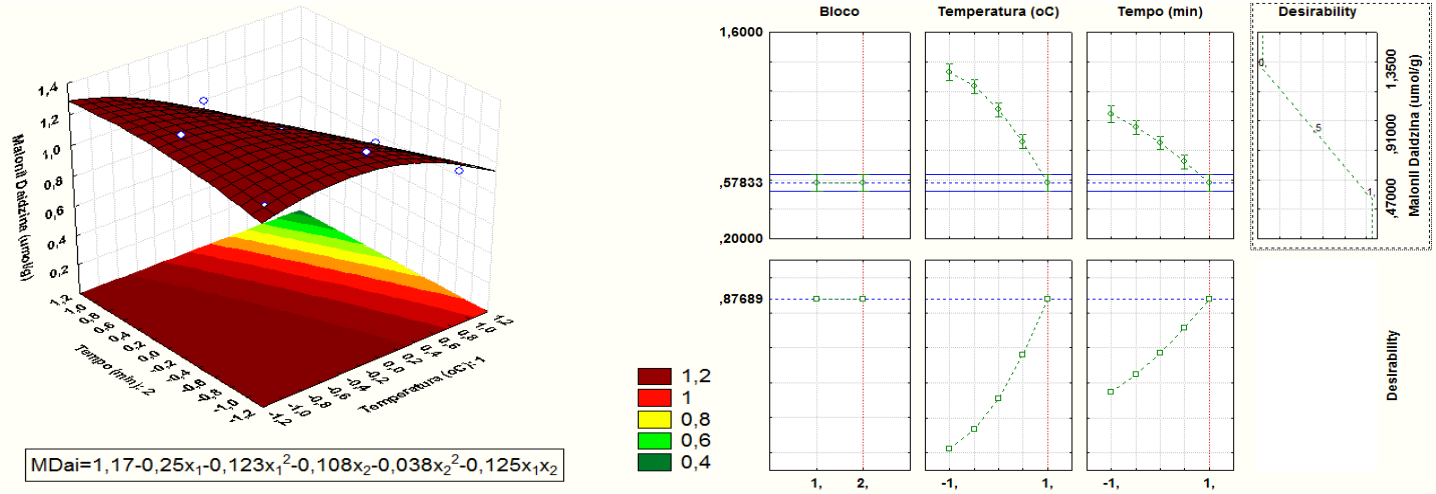


Figura 1 – Superfície de resposta e perfil de desejabilidade para malonildaidzina, sendo x_1 = temperatura e x_2 = tempo.

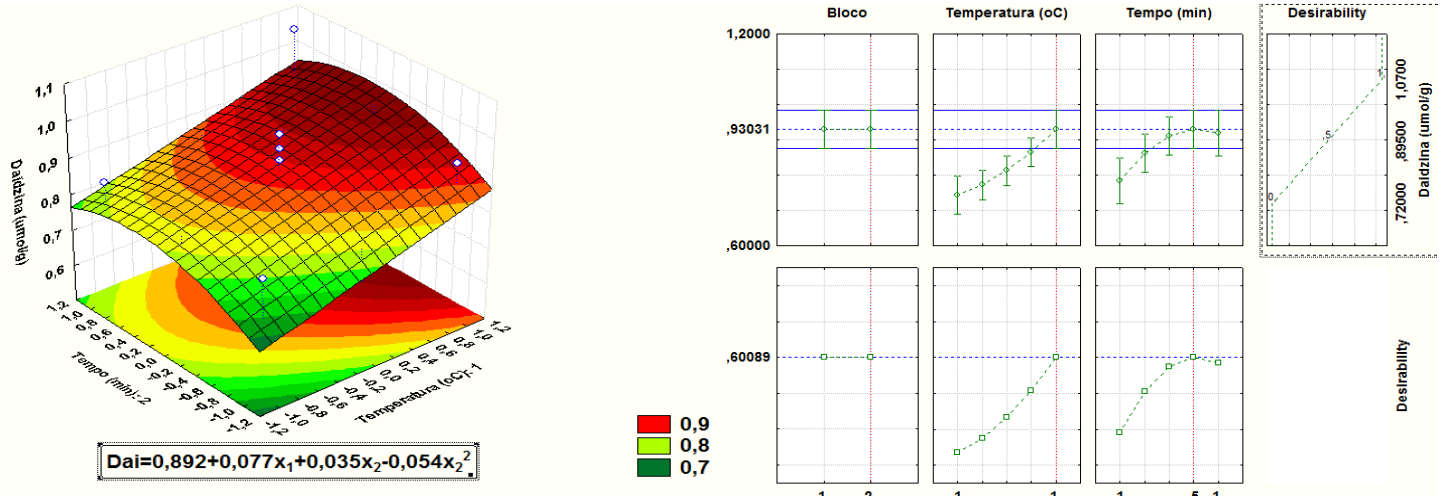


Figura 2 – Superfície de resposta e perfil de desejabilidade para daidzina, sendo x_1 = temperatura e x_2 = tempo.

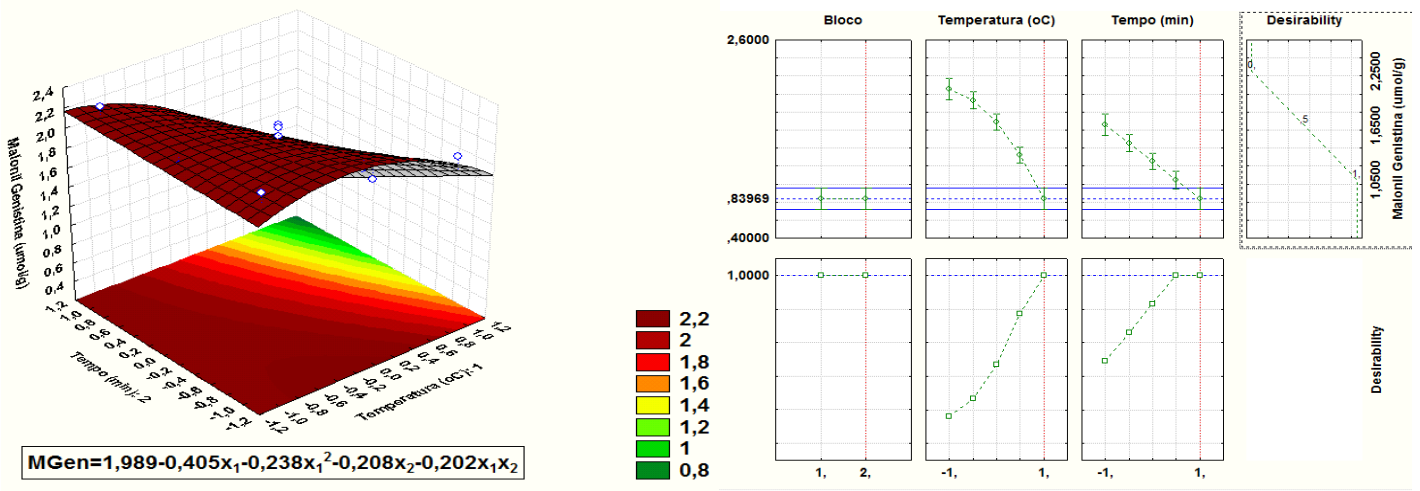


Figura 3 – Superfície de resposta e perfil de desejabilidade para malonilgenistina, sendo x_1 = temperatura e x_2 = tempo.

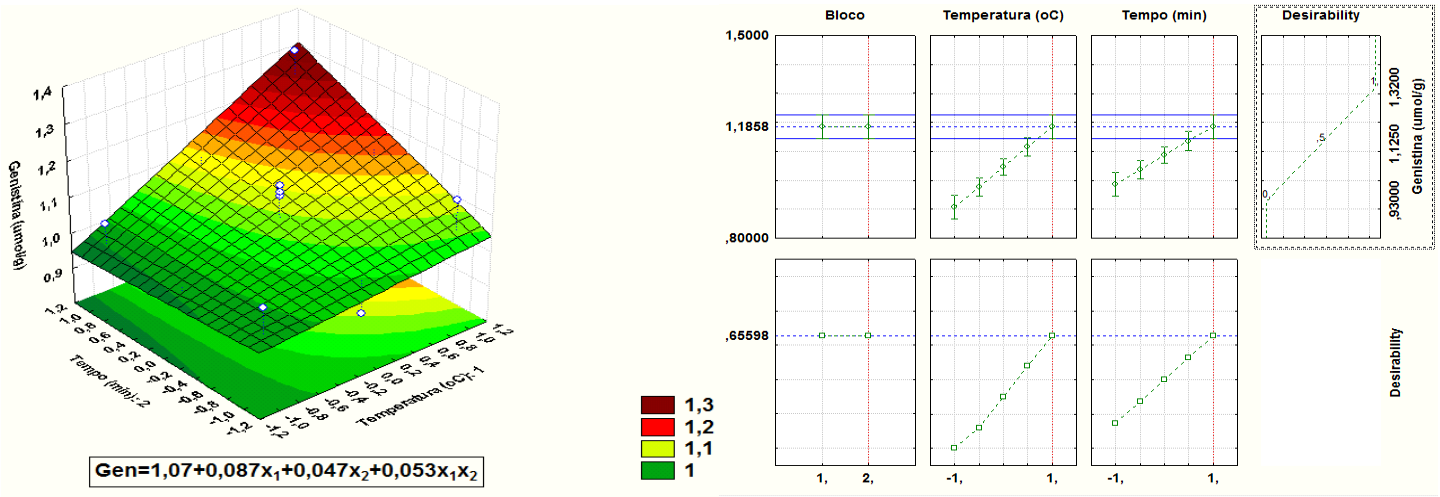


Figura 4 – Superfície de resposta e perfil de desejabilidade para genistina, sendo x_1 = temperatura e x_2 = tempo.

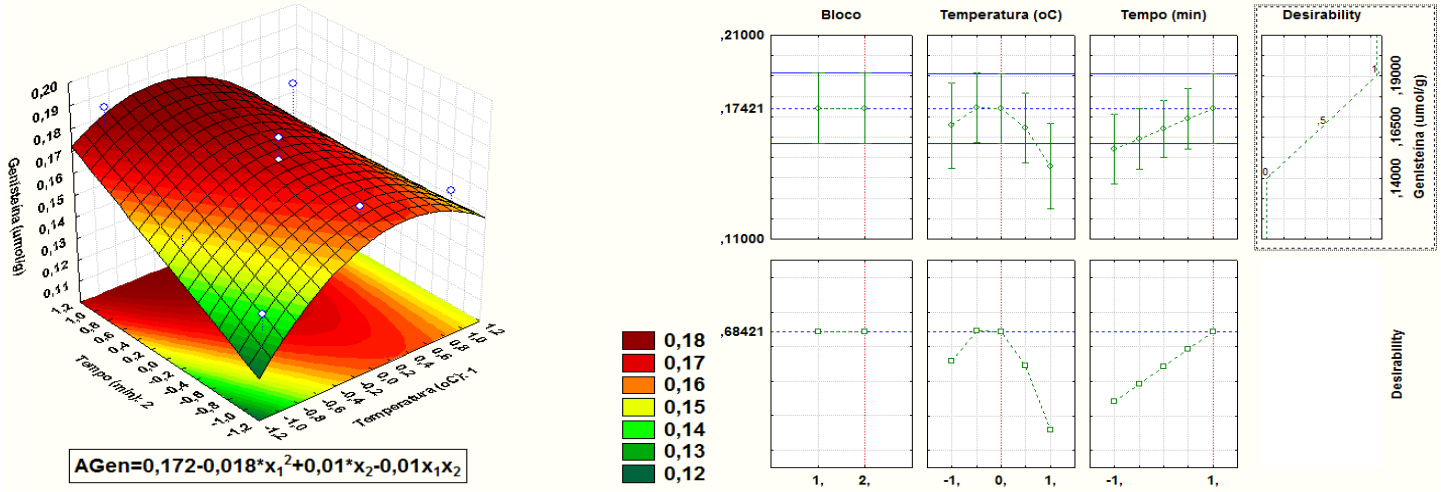


Figura 5 – Superfície de resposta e perfil de desejabilidade para acetilgenistina, sendo x_1 = temperatura e x_2 = tempo.

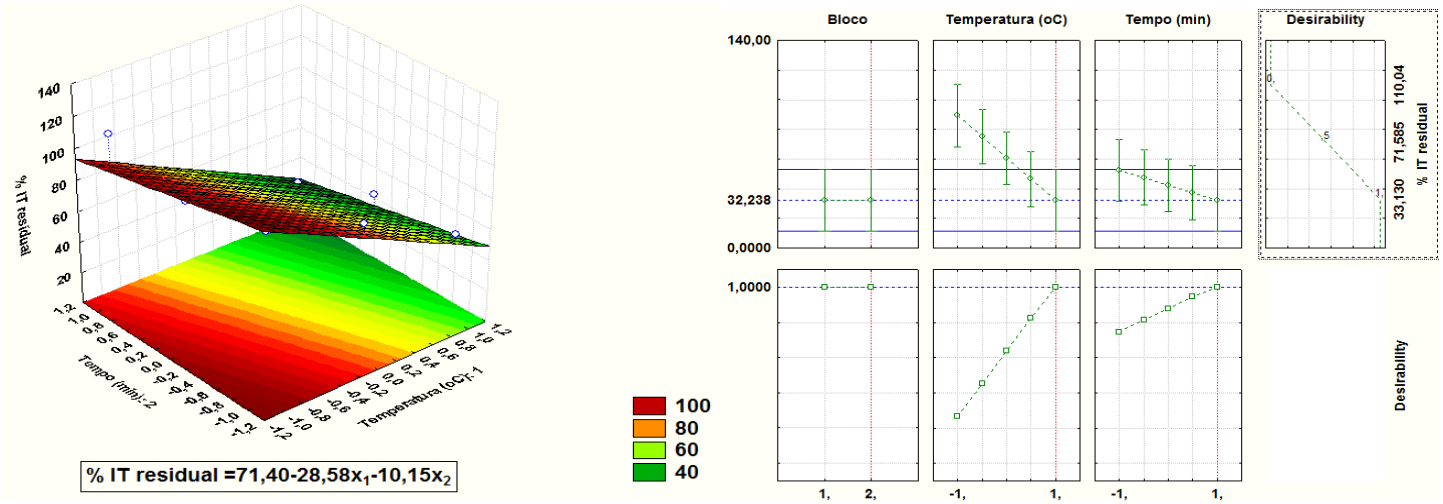


Figura 6 – Superfície de resposta e perfil de desejabilidade para % residual de inibidor de tripsina, sendo x_1 = temperatura e x_2 = tempo.

6 CONCLUSÃO

O tratamento térmico da FSI em estufa alterou o teor e perfil das diferentes formas de isoflavonas. O tratamento da FSI a 200^{o}C por 20 min ocasionou maior conversão das isoflavonas malonilglicosídeos em acetilglicosídeos, β-glicosídeos e agliconas, bem como maior redução na atividade de inibidores de tripsina. Na FSI submetida a 200^{o}C por 20 min, ocorreu uma redução de 2,5 vezes no teor de malonilglicosídeos, um aumento de 1,2 vezes e 3,5 vezes no teor de β-glicosídeos e de agliconas, respectivamente, bem como a formação de daidzeína, acetildaidzina e acetilgenistina, sendo que a atividade residual de inibidores de tripsina foi de 33,67%. Modelos matemáticos foram estabelecidos e poderão ser utilizados na definição de parâmetros de processo para obtenção de FSI com conversão de isoflavonas e redução na atividade de inibidores de tripsina. Desta forma, para obter uma FSI com máxima conversão de isoflavonas e mínimo residual de inibidores de tripsina, recomenda-se utilizar o calor seco a 200^{o}C por 20 min.