



**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA**

SILVANA PEDROSO DE GÓES-FAVONI

**PROTEÍNA TEXTURIZADA COM MAIOR TEOR DE
ISOFLAVONAS AGLICONAS OBTIDA DE COTILÉDONES
DE SOJA APÓS TRATAMENTO HIDROTÉRMICO**

Londrina
2007

SILVANA PEDROSO DE GÓES-FAVONI

**PROTEÍNA TEXTURIZADA COM MAIOR TEOR DE
ISOFLAVONAS AGLICONAS OBTIDA DE COTILÉDONES
DE SOJA APÓS TRATAMENTO HIDROTÉRMICO**

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

Orientadora: Dra. Adelaide Del Pino Beléia
Co-orientadora: Dra. Mercedes C. Carrão-Panizzi

Londrina
2007

Góes-Favoni, Silvana Pedroso de

Proteína texturizada de soja com maior teor de isoflavonas agliconas obtida de cotilédones de soja termo-hidratados / Silvana Pedroso de Góes-Favoni. - Londrina, PR : [s.n], 2007.

121f

Orientador: Dra. Adelaide Del Pino Beléia.

Co-orientador: Dra. Mercedes C. Carrão-Panizzi

Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, 2007.

Inclui bibliografia.

1. Tratamento hidrotérmico - Teses. **2. β -glicosidase - Teses. 3. Atividade enzimática - Teses. 4. Extrusão - Teses. 5. Soja - Teses. 6. Isoflavonas - Teses.** I. Beléia, Adelaide Del Pino; Carrão-Panizzi, M. C. II. Universidade Estadual de Londrina. III. Título.

SILVANA PEDROSO DE GÓES-FAVONI

**PROTEÍNA TEXTURIZADA COM MAIOR TEOR DE
ISOFLAVONAS AGLICONAS OBTIDA DE COTILÉDONES
DE SOJA APÓS TRATAMENTO HIDROTÉRMICO**

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Adelaide Del Pino Beléia
Universidade Estadual de Londrina

Profa. Dra. Rosane da Silva Rodrigues
Universidade Federal de Pelotas

Profa. Dra. Lenita Bruneto Bruniera
Universidade Filadélfia

Profa. Dra. Elza Iouko Ida
Universidade Estadual de Londrina

Profa. Dra. Maria Victória Eiras Grossmann
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 27 de Abril de 2007

Ao Célio, por tudo de bom que
representa, pela dedicação
e cumplicidade, Dedico.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, sempre presente em minha vida, abrindo-me janelas quando portas eram fechadas, dando-me forças para transpor os obstáculos e sabedoria para alcançar os objetivos;

Às minhas orientadoras **Prof^a Dr^a Adelaide Del Pino Beléia** e **Dr^a Mercedes C. Carrão-Panizzi** pela orientação, apoio e valiosas sugestões na realização deste trabalho;

Ao **Célio**, meu grande amor, amigo e companheiro, pelo incentivo, pelas horas roubadas e sobretudo pela paciência e compreensão dispensadas nos momentos mais difíceis;

Aos meus pais, **Alceu** e **Terezinha**, eternos exemplos de vida, pelo apoio incondicional, carinho e amizade;

À **Embrapa Soja**, por ceder o espaço físico, as amostras e a infra-estrutura para realização da parte experimental;

Ao **CNPq** (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pela concessão da bolsa de estudos e suporte financeiro;

Aos **Docentes do Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos**, que contribuíram para minha formação, possibilitando a execução deste trabalho;

À pesquisadora **Ivani Negrão** pelo auxílio nas análises estatísticas e sobretudo pela grande amizade cultivada ao longo deste trabalho;

Ao **Prof. Dr. Yoon Kil Chang** por ceder a infra-estrutura do Laboratório de Cereais da Unicamp e pela orientação na condução dos experimentos de extrusão;

Ao **Ms Matheus Depieri** pelo auxílio nos experimentos de extrusão, apoio e amizade;

À **Caramuru Alimentos Ltda**, na pessoa de **Fabiana Canhete** pelo desengorduramento das farinhas de soja, sem o qual o trabalho não seria possível;

Aos pesquisadores **José Marcos Gontijo Mandarino** e **Vera Toledo Benassi** pelas sugestões valiosas durante a execução do trabalho, incentivo e amizade;

Aos amigos da Embrapa Soja **Wladimir, Andréa, Cleverson, Cleuza, Ivone e Tânia** pelo auxílio constante na condução dos experimentos;

Aos amigos, sempre presentes, mesmo à distância ... **Mara, Josimeire, Ilana, Rosane e Emerson (Miru)** pelo carinho, amizade e consideração;

A todos, muito obrigada!

Mas de todas as coisas somos mais que
vencedores,
pela virtude Daquele que nos amou.

Rom 8:37

GÓES-FAVONI, Silvana Pedroso de. **Proteína texturizada com maior teor de isoflavonas agliconas obtida de cotilédones de soja após tratamento hidrotérmico**. 2007. 103f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

RESUMO

Alterações na concentração e distribuição das isoflavonas ocorridas durante o processamento de proteína texturizada de soja, associada a tratamento hidrotérmico dos cotilédones para obtenção de um produto com elevada concentração de agliconas foram avaliadas. Grãos da cultivar BRS 213 das safras 2004 e 2005 quantificaram 136,8 e 121,0 mg/100g de isoflavonas totais. Após o descascamento houve redução de 13 e 17% de isoflavonas devido a retirada do hipocótilo. Cotilédones foram hidratados a 50^oC por 12 horas com a razão grãos:água reduzida (1:1,2) para grãos da safra 2004 e 1:3 para grãos da safra 2005. A massa molar das agliconas aumentou 18 vezes quando a menor razão grãos:água foi usada e 8 vezes quando a razão 1:3 foi usada, provavelmente devido a lixiviação das agliconas. Houve maior retenção de agliconas e isoflavonas totais quando volume reduzido de água foi usado para o tratamento hidrotérmico. Considerando a concentração inicial de agliconas nos cotilédones, maior teor destes compostos foi quantificado na farinha da safra 2005 (21,5 mg/100g) que na farinha da safra 2004 (14,5 mg/100g). A extrusão das farinhas não hidratada (controle) e hidratada não alterou a massa molar total de isoflavonas, que permaneceu com 2,1 e 1,8 μMol, respectivamente, mas acetil glicosídeos passaram para 26% do total de isoflavonas. Agliconas formadas durante o tratamento hidrotérmico permaneceram no produto extrusado e foram, em média, 5 vezes maior que na farinha extrusada controle e que em quatro proteínas texturizadas de soja comerciais usadas para comparação. O tratamento hidrotérmico associado a extrusão alteraram a microestrutura dos produtos extrusados que tiveram maior capacidade de absorção de água, razão de expansão e capacidade de re-hidratação que na farinha extrusada controle. Atividade da β-glicosidase foi reduzida 3 vezes na amostra tratada com volume de água reduzido e 5 vezes na amostra tratada com volume de água maior, uma vez que a enzima lixiviou para água. Após a extrusão a atividade enzimática não foi detectada devido a inativação térmica.

Palavras-chave: Tratamento hidrotérmico. β-glicosidase. Atividade enzimática. Extrusão, Soja. Isoflavonas.

GÓES-FAVONI, Silvana Pedroso de. **Textured protein with higher isoflavone aglycones concentration obtained thermo-hydrated soybean cotyledons.** 2007. 103f. Tesis (Doctor Science in Food Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

ABSTRACT

Isoflavones concentration and distribution alterations during processing of textured soy protein, associated to hydrothermal treatment of the cotyledons, to obtain a product with higher aglycones concentration were evaluated. Soy cultivars BRS 213 harvested in 2004 and 2005 had 136.8 and 121.0 mg/100g of total isoflavones. After dehulling there was a 13 and 17% reduction in concentration due to removal of hypocotyls. Cotyledons were hydrated at 50⁰C for 12 h with reduced grain: water ratio (1:1.2) for 2004 grains and 1:3 grain: water ratio for 2005 harvest. The molar mass of aglycones increased 18 times when the lower grain: water ratio was used and 8 times when the 1:3 ratios were used, probably due to leaching of the aglycones. There was a higher retention of aglycones and total isoflavones when reduced volume of water was used for the hydrothermal treatment. Considering the initial concentration of aglycones in the cotyledons, a higher amount was quantified in the flour of 2005 harvest (21.5 mg/100g) than in the 2004 harvested grain (14.5 mg/100g). Extrusion of non hydrated (control) and hydrated flours did not alter the total molar mass of isoflavones, that remained with 2.1 and 1.8 µMol, respectively, but acetyl glycosides became 26% of the total isoflavones. Aglycones formed during the hydrothermal treatment remained in the extruded product and were, on the average, 5 times higher than in the control extruded flour and than in 4 textured soy protein commercial used for comparison. Hydrothermal treatment associated with extrusion altered the microstructure of the extruded products that had higher, water absorption capacity, expansion ratio and re-hydration capacity than the control extruded flour. β-glycosidase activity was reduced 3 times in the reduced water volume treated sample and 5 times in the higher water volume treated sample, since there was enzyme leaching to the water. After extrusion no enzymatic activity was detected due to thermal inactivation.

Keywords: Hydrothermal treatment. β-glycosidase. Enzymatic activity. Extrusion. Soybeans. Isoflavones.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Estrutura química dos 12 isômeros de isoflavonas da soja	20
TABELA 2 – Equações e linearidade obtidas a partir das curvas de calibração dos β -glicosídeos	54
TABELA 3 – Isoflavonas em grãos de soja da safra 2004 submetidos a processamento para obtenção de farinha de soja com maior teor de agliconas	60
TABELA 4 – Isoflavonas em grãos de soja da safra 2005 submetidos a processamento para obtenção de farinha de soja com maior teor de agliconas	61
TABELA 5 – Teor de isoflavonas nas farinhas de soja e PTS não tratadas e tratadas.....	67
TABELA 6 – Nível de atividade enzimática da β -glicosidase nas farinhas de soja e PTS não tratadas e tratadas e na água de hidratação	73
TABELA 7 – Composição centesimal das farinhas de soja não tratada e tratada da safra 2004	76
TABELA 8 – Composição centesimal das farinhas de soja e PTS não tratadas e tratadas da safra 2005.....	77
TABELA 9 – Teor de isoflavonas nas PTS comerciais e Porcentagem dos isômeros de isoflavonas nas PTS não tratada e tratada	79
TABELA 10 – Capacidade de absorção de água nas farinhas de soja desengorduradas não tratada e tratada da safra 2005	82
TABELA 11 – Razão de expansão e capacidade de re-hidratação das PTS não tratada e tratada	82

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Estruturas de isoflavonas da soja.....	20
FIGURA 2 – Estrutura molecular da genisteína e do hormônio endógeno 17 β -estradiol.....	23
FIGURA 3 – Metabolismo das agliconas daidzeína e genisteína após a ingestão	25
FIGURA 4 – Figura esquemática de extrusor monorosca.....	31
FIGURA 5 – Representação esquemática de um parafuso de Archimedes.....	31
FIGURA 6 – Cromatograma típico da mistura dos 12 padrões de isoflavonas	42
FIGURA 7 – Espectro dos β -glicosídeos	42
FIGURA 8 – Componentes básicos de um microscópio eletrônico de varredura	45
FIGURA 9 – Fluxograma de obtenção das farinhas e proteínas texturizadas de soja.....	48
FIGURA 10 – Curvas de calibração dos β -glicosídeos	53
FIGURA 11 – Curva de calibração do <i>para</i> -nitrofenol.....	55
FIGURA 12 – Teor de isoflavonas em grãos de soja inteiros	58
FIGURA 13 – Teor de isoflavonas nas farinhas de soja e PTS não tratadas e tratadas	69
FIGURA 14 – Teor de isoflavonas nos grãos de soja não hidratados, hidratados sem inibidor e hidratados com inibidor glucona- δ -lactona.....	70
FIGURA 15 – Nível de atividade da β -glicosidase nos grãos de soja não hidratados, hidratados sem inibidor e com inibidor e nas águas de hidratação	72
FIGURA 16 – Teor de agliconas nas PTS não tratada, tratada e PTS comerciais	80
FIGURA 17 – Micrografia eletrônica de farinhas de soja desengorduradas e PTS não tratadas e tratadas	83
FIGURA 18 – Fotografia das PTS não tratada e tratada	84

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVO GERAL	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1 SOJA : ASPECTOS GERAIS	16
3.2 ISOFLAVONAS DA SOJA	19
3.2.1 Características Gerais	19
3.2.2 Funções no Organismo	23
3.3 ISOFLAVONAS EM ALIMENTOS À BASE DE SOJA	28
3.4 INFLUÊNCIA DA ENZIMA B-GLICOSIDASE SOBRE AS ISOFLAVONAS DA SOJA	35
3.5 DETERMINAÇÃO DE ISOFLAVONAS EM SOJA E ALIMENTOS DERIVADOS DE SOJA	38
3.5.1 Extração de Isoflavonas	38
3.5.2 Separação	40
3.5.3 Identificação e Quantificação	41
3.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	43
4 MATERIAL E MÉTODOS	46
4.1 MATERIAL	46
4.1.1 Cultivares de Soja	46
4.1.2 PTS Comerciais	46
4.1.3 Reagentes Analíticos	47
4.2 MÉTODOS	47
4.2.1 Tratamento Hidrotérmico	47
4.2.2 Processo de Extrusão das Farinhas de Soja	49
4.2.2.1 Condicionamento das farinhas de soja desengorduradas	49
4.2.2.2 Teste de alimentação do extrusor	49
4.2.2.3 Extrusão termoplástica das farinhas de soja	50
4.2.3 Influência da β -Glicosidase Sobre as isoflavonas: Teste de Inibição Enzimática	50

4.2.4 Análises das Farinhas de Soja e PTS.....	51
4.2.4.1 Capacidade de absorção de água	51
4.2.4.2 Determinação da razão de expansão (RE).....	51
4.2.4.3 Determinação da capacidade de re-hidratação (CRH)	52
4.2.4.4 Determinação de isoflavonas.....	52
4.2.4.5 Determinação da atividade da enzima β -glicosidase.....	54
4.2.4.6 Composição centesimal	55
4.2.4.7 Microscopia eletrônica de varredura	55
4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	56
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1 TEOR E COMPOSIÇÃO DE ISOFLAVONAS EM GRÃOS DE SOJA	57
5.2 INFLUÊNCIA DO PROCESSAMENTO SOBRE O TEOR E COMPOSIÇÃO DE ISOFLAVONAS EM GRÃOS DE SOJA	59
5.2.1 Influência do Tratamento Hidrotérmico.....	59
5.2.2 Influência da Extrusão Termoplástica.....	66
5.3 INFLUÊNCIA B-GLICOSIDASE SOBRE ISOFLAVONAS: TESTE DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA.....	70
5.4 INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO HIDROTÉRMICO E DA EXTRUSÃO TERMOPLÁSTICA SOBRE A ATIVIDADE DA β -GLICOSIDASES ENDÓGENAS DA SOJA	73
5.5 INFLUÊNCIA DO PROCESSAMENTO SOBRE A COMPOSIÇÃO CENTESIMAL EM GRÃOS DE SOJA	75
5.6 ISOFLAVONAS EM PTS COMERCIAIS.....	78
5.7 INFLUÊNCIA DO PROCESSAMENTO SOBRE A MICROESTRUTURA DAS FARINHAS E PTS NÃO TRATADAS E TRATADAS.....	81
6 CONCLUSÃO.....	85
REFERÊNCIAS	87
ANEXOS	99
ANEXO A – Massa molar das isoflavonas nos cotilédones de soja da safra 2004 tratados com volume de água reduzido.....	100
ANEXO B – Massa molar das isoflavonas nas farinhas e PTS não tratadas e tratadas.....	102

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, a procura por alimentos derivados de soja têm aumentado nos últimos anos em função dos benefícios à saúde atribuídos ao consumo desta leguminosa. Das substâncias funcionais da soja destacam-se as proteínas e isoflavonas, compostos fenólicos associados a atividades anticarcinogênicas, diminuição do colesterol plasmático e redução da perda de massa óssea (MESSINA, 2000).

As isoflavonas constituem um grupo de doze compostos formados pelas agliconas daidzeína, gliciteína e genisteína e seus conjugados β -glicosídeos, malonil e acetil glicosídeos, sendo as agliconas os compostos biologicamente ativos e mais biodisponíveis (SETCHEL, 2000; IZUMI et al., 2000). Quando consumidos, os β -glicosídeos podem ser hidrolizados a agliconas pela ação de enzimas com atividade de β -glicosidases produzidas pela microflora intestinal porém, conforme Setchell (1998), a disponibilidade da enzima no intestino é limitada e o metabolismo das isoflavonas pode variar entre populações e em função da dieta, ingestão de medicamentos e tempo de permanência do alimento no intestino. Assim, o consumo de alimentos com maior teor de agliconas é desejável.

Em grãos de soja, as agliconas estão presentes em pequenas quantidades, variando de 1 a 3% do total de isoflavonas. Conforme Wang & Murphy (1996), em alimentos não fermentados a concentração de isoflavonas totais é duas a três vezes maior que nos alimentos fermentados, sendo as formas conjugadas as principais formas químicas. Segundo Murphy et al. (2002), alimentos fermentados como tempeh apresentam elevados teores de agliconas (cerca de 50% da massa molar de isoflavonas) devido à ação de enzimas β -glicosidases endógenas da soja juntamente com β -glicosidases microbianas que promovem hidrólise dos conjugados β -glicosídeos convertendo-os em suas respectivas agliconas.

Considerando que as agliconas podem ser formadas a partir da clivagem de seus conjugados β -glicosídeos pela ação de enzimas β -glicosidases endógenas da soja (β -D-glicosídeo glicohidrolase, E.C. 3.2.1.21), diversos autores têm descrito o tratamento hidrotérmico como eficaz no aumento de agliconas (MATSUURA et al., 1989; GÓES-FAVONI, 2002; CARRÃO-PANIZZI et al., 2003).

A hidratação constitui uma prática comum no processamento de diversos alimentos à base de soja, como tempeh, tofu e extrato hidrossolúvel de soja, e apesar do aumento no teor de agliconas, teores consideráveis de isoflavonas (12 a 57%) são perdidos na água durante a hidratação (WANG & MURPHY, 1996). Uma vez que na maioria dos

métodos de processamento, a água de hidratação é descartada como resíduo, procedimentos que levem em consideração a formação e retenção de agliconas no alimento, bem como a mínima geração de resíduos industriais deve ser estudado.

Em alimentos derivados de soja, a concentração e distribuição das isoflavonas são determinadas pela variedade da soja, diluição com outros ingredientes e principalmente pelas condições de processamento, sobretudo a temperatura a que o material é exposto. Conforme Wang & Murphy (1996), certos métodos de processamento como hidratação, fermentação, coagulação e precipitação protéica alteram significativamente a distribuição das isoflavonas e provocam perdas de isoflavonas para água, soro ou resíduo, mas não as degradam. Entretanto, Chien et al. (2005) observaram perdas significativas de agliconas devido à degradação quando isoflavonas foram expostas a aquecimento em temperaturas de 150 e 200⁰C, sendo os conjugados malonil as formas de isoflavonas mais susceptíveis a ação do calor.

Diversos produtos derivados de soja têm sido lançados no mercado para atender a crescente demanda por alimentos funcionais. Dentre eles destacam-se as proteínas texturizadas de soja (PTS), obtidas por processo de extrusão termoplástica com elevadas temperaturas, pressão e atrito, levando a alterações estruturais nas proteínas, dando origem a produtos com textura similar aos tecidos musculares, alta capacidade de hidratação e fácil incorporação de aroma e sabor (GENOVESE & LAJOLO, 2002). Estas condições drásticas de processamento, além das alterações nas proteínas, pode causar alterações significativas na distribuição das diferentes formas químicas de isoflavonas (SINGLETERY et al., 2000). Góes-Favoni et al (2004b) em estudos com alimentos à base de soja observaram que as agliconas, embora não sejam degradadas durante a extrusão, permanecem em baixas concentrações, correspondendo entre 5 a 8% do total de isoflavonas.

Levando-se em consideração a importância e biodisponibilidade das agliconas para a saúde e considerando o crescente consumo de alimentos derivados de soja, o objetivo deste trabalho foi desenvolver proteína texturizada de soja (PTS) com teor de agliconas superior ao encontrado em PTS comerciais e avaliar a influência do processamento nas etapas de obtenção.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver Proteína Texturizada de Soja (PTS) com maior teor de agliconas em relação as PTS comerciais.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Avaliar a influência de tratamentos hidrotérmicos sobre o teor de agliconas em cotilédones de soja com volumes de água diferentes;

2.2.2 Estudar a influência das etapas de processamento durante obtenção de PTS sobre o teor e distribuição de isoflavonas;

2.2.3 Avaliar a influência da enzima β -glicosidase sobre isoflavonas em cotilédones de soja;

2.2.4 Determinar a atividade da β -glicosidase e avaliar a influência do processamento sobre a enzima;

2.2.5 Avaliar a influência das etapas de processamento sobre a composição centesimal durante obtenção de PTS.

2.2.6 Quantificar isoflavonas em PTS comerciais para efeito de comparação;

2.2.7 Avaliar a influência do tratamento hidrotérmico e da extrusão termoplástica sobre a microestrutura das farinhas e PTS;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 SOJA: ASPECTOS GERAIS

A soja constitui uma das plantas mais antigas cultivadas pelo homem. Teve sua origem na China por volta do século XI a.C.. Foi introduzida no Ocidente no final do século XV e início do XVI. Chegou aos Estados Unidos no ano de 1804, mas sua importância na produção de grãos aumentou somente a partir de 1941 (MORAIS & SILVA, 1996).

No Brasil, a soja foi efetivamente introduzida em 1908 no estado de São Paulo e em 1914 no estado do Rio Grande do Sul. Porém, o verdadeiro impulso na produção de soja ocorreu somente na década de 60 com o cultivo sucessivo trigo-soja no Rio Grande do Sul (MORAIS & SILVA, 1996).

Atualmente o Brasil ocupa a posição de segundo produtor mundial de soja, sendo Mato Grosso, Paraná e Rio Grande do Sul os principais estados produtores. Segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2007), a produção de soja na safra 2005/2006 foi de 53,4 milhões de toneladas. Estima-se que a produção na safra 2006/2007 seja de 56,3 milhões de toneladas de grãos, representando um aumento de 5,4%.

O aumento crescente na produção de soja no Brasil se deve ao elevado valor econômico e agrícola desta *commodity*. Conforme Liu (1999), isto se deve a vários fatores, entre eles sua adaptação em solos e climas diversos, efeitos benéficos à saúde e a ampla diversidade de usos que a soja possui: é utilizada na alimentação humana, na alimentação animal compondo rações de alto valor energético, e como matéria-prima industrial para produtos não alimentícios, como tintas, resinas, óleos industriais e atualmente na produção de biodiesel, um combustível alternativo e de matéria-prima renovável.

A soja é um alimento quase completo, pois contém cerca de 40% de proteínas de alta qualidade, aproximadamente 20% de lipídeos com alta concentração de ácidos graxos poliinsaturados, cerca de 35% de carboidratos, teores consideráveis de vitaminas do complexo B e minerais como magnésio, fósforo, ferro e zinco (CARRÃO-PANIZZI, 2000a; MORAES et al., 2006).

A soja apresenta o mais alto teor de proteína quando comparada a outras culturas produtoras de grãos e sua composição pode ser influenciada por fatores ambientais, genéticos, local e safra (CARRÃO-PANIZZI, 2000a; CIABOTTI et al., 2006). As proteínas

da soja são ricas em aminoácidos como leucina e lisina, porém, como as demais leguminosas, a soja apresenta deficiência dos aminoácidos sulfurados metionina e cisteína (CARRÃO-PANIZZI, 2000a; PIRES et al., 2006). Entretanto, o PDCAAS (Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score), método oficial da Organização Mundial de Saúde, utilizado também pelo FDA (Food and Drug Administration) para o estudo do valor biológico de proteínas, que faz a correção da digestibilidade protéica levando-se em conta o escore de aminoácidos, demonstrou que a soja supre a necessidade de aminoácidos, inclusive os sulfurados, desde que ingerida em quantidade adequada (FDA, 1991; MESSINA, 1999a; VIEIRA et al., 1999; MORAIS, 2001).

O teor de proteínas e o teor de lipídeos apresentam uma correlação negativa (WILCOX & SHIBLES, 2001; MORAES et al., 2006). Os lipídeos da soja compreendem cerca de 15% de ácidos graxos saturados e 85% de insaturados. Dentre os ácidos graxos poliinsaturados destacam-se o ácido linoléico (57%) e o linolênico (7%), considerados essenciais (MORAIS & SILVA, 1996; MESSINA, 1999b). No Brasil, o óleo de soja é altamente consumido apresentando as maiores taxas de consumo entre todos os óleos e gorduras dos produtos alimentícios (MOREIRA, 1999).

O teor de carboidratos da soja também apresenta uma correlação negativa com o teor de proteína (WILCOX & SHIBLES, 2001; MORAES et al., 2006). Entretanto, Wilcox & Shibles (2001), sugerem que o aumento no teor de proteína poderia reduzir o teor dos oligossacarídeos rafinose e estaquiase presentes na fração de carboidratos totais, melhorando a qualidade nutricional da soja.

Segundo Moraes et al. (2006), os grãos de soja contém cerca de 5% de cinzas, sendo que o potássio encontra-se em maior concentração, seguido pelo fósforo, magnésio, enxofre, cálcio, cloro e sódio.

Apesar de constituir uma fonte protéica de excelente qualidade e mais econômica que proteínas de origem animal, o sabor da soja tem sido a principal barreira para sua aceitação no ocidente. O sabor descrito como rançoso ou de feijão cru é atribuído à ação de enzimas lipoxigenases, que atuam na oxidação dos lipídeos. Nos grãos de soja intactos, os substratos ácidos linoléico e linolênico, não estão expostos à ação da enzima, porém quando os grãos se quebram e absorvem água, enzimas e substratos se encontram ocorrendo a reação. A ausência de lipoxigenases é uma característica genética que pode, facilmente, ser incorporada em cultivares adaptadas, através de retrocruzamentos (CARRÃO-PANIZZI, 1996a). A inativação térmica das lipoxigenases é um processo usado na indústria de

alimentos, entretanto, o calor excessivo pode provocar desnaturação de proteína tornando-a indisponível (VIOLA, 1999), além de gerar o encarecimento do produto final.

Cultivares de soja tipo vegetal apresentam teor elevado de amido, sacarose, frutose e glicose, conferindo sabor mais adocicado e portanto mais agradável do que o observado nas cultivares de soja tipo comercial. Cruzamentos entre cultivares comerciais e vegetais têm sido estudados no intuito de melhorar o sabor da soja e conseqüentemente aumentar a aceitabilidade (CARRÃO-PANIZZI, 1996a). A cultivar BRS 213 constitui uma matéria-prima desenvolvida pelo Programa de Melhoramento Genético da Embrapa Soja com características de sabor superior, onde as três izoenzimas lipoxigenases, L1, L2 e L3 estão ausentes (CARRÃO-PANIZZI et al., 2002).

Além de uma excelente fonte protéica, a soja é considerada um alimento funcional, pois contém substâncias capazes de diminuir o risco de doenças e promover a saúde. De acordo com a portaria número 398 de 30/04/1999, da Agência de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde no Brasil – ANVISA (BRASIL, 1999), alimento funcional é: *“todo aquele alimento ou ingrediente que, além das funções nutricionais básicas, quando consumido como parte da dieta usual, produz efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica.”* (BRASIL, 1999).

Entre os componentes funcionais da soja destacam-se as proteínas e as isoflavonas. Diversos estudos realizados comprovaram a eficiência das proteínas da soja em diminuir o colesterol plasmático e com isso reduzir o risco de doenças do coração (ANDERSON et al., 1995; CARROLL & KUROWSKA, 1995; NICOLOSI & WILSON, 1997; MESSINA, 1999b). Em 1999 o FDA, departamento que controla a produção de alimentos e medicamentos nos Estados Unidos, aprovou o uso do termo *health claim* para produtos derivados de soja reconhecendo que o consumo de 25 g de proteínas da soja consumidas diariamente como parte de uma dieta com baixo consumo de gorduras saturadas e colesterol, são capazes de reduzir os riscos de doenças do coração (MESSINA, 1999a).

Quanto ao efeito das isoflavonas, compostos fenólicos pertencentes ao grupo dos flavonóides, destacam-se as atividade anti-carcinogênica, redução da perda de massa óssea, diminuição do colesterol sérico e triglicérides, atividade antioxidante e redução dos sintomas indesejáveis da menopausa (KURZER & XU, 1997; LIU, 1997; MENG et al., 1999; KOLES, 2000; MESSINA, 2000).

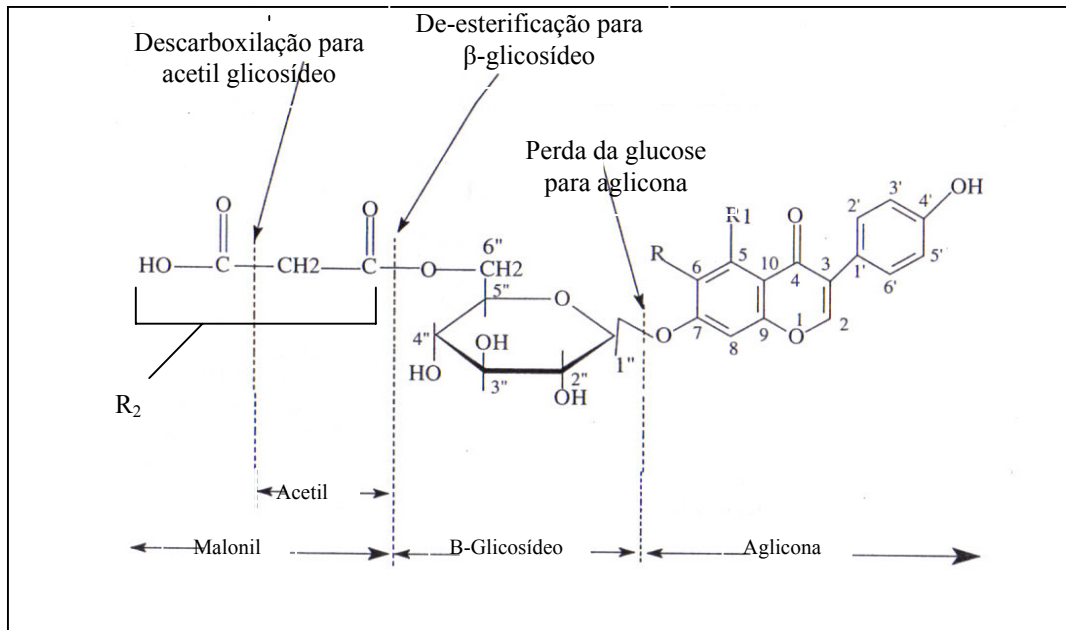
3.2 ISOFLAVONAS DA SOJA

3.2.1 Características Gerais

Isoflavonas são compostos fenólicos pertencentes ao grupo dos flavonóides encontrados em plantas, e caracterizam-se por apresentar uma estrutura composta por dois anéis benzenos ligados entre si por um anel heterocíclico pirano na posição do carbono 3 (Figura 1). Estes compostos existem em 4 formas químicas: os β -glicosídeos apresentando uma molécula de glucose ligada na posição 7 do anel benzeno, as agliconas, sem o respectivo açúcar, os conjugados malonil-glicosídeos e os conjugados acetil-glicosídeos (LIU, 1997; MESSINA, 1999a; FARAJ & VASANTHAN, 2004).

As isoflavonas compreendem os β -glicosídeos daidzina, genistina e glicitina e suas respectivas agliconas daidzeína, genisteína e gliciteína; na forma malonil-glicosídica encontramos 6''O-malonil-daidzina, 6''O-malonil-genistina e 6''O-malonil-glicitina e na forma acetil-glicosídica os conjugados 6''O-acetil-daidzina, 6''O-acetil-genistina e 6''O-acetil-glicitina (Tabela 1) (LIU, 1997).

As isoflavonas estão presentes em poucas famílias botânicas e funcionam como fitoalexinas conferindo às plantas resistência a patógenos (KOGAN, 1986). Na soja, as agliconas daidzeína e genisteína têm sido relatadas como os indutores mais comuns à nodulação da raiz por *Bradyrhizobium japonicum* (KOSSLAK et al., 1990).



Fonte: FARAJ & VASANTHAN (2004).

Figura 1 – Estruturas de isoflavonas da soja e possíveis modificações por clivagem dos conjugados

Tabela 1 – Estrutura química das 12 formas químicas de isoflavonas da soja

Isoflavonas	R	R ₁	R ₂
Daidzeína	H	H	-
Genisteína	H	OH	-
Gliciteína	OCH ₃	H	-
Daidzina	H	H	H
Genistina	H	OH	H
Glicitina	OCH ₃	H	H
6''O-Acetil-Daidzina	H	H	COCH ₃
6''O-Acetil-Genistina	H	OH	COCH ₃
6''O-Acetil- Glicitina	OCH ₃	H	COCH ₃
6''O-Malonil-Daidzina	H	H	COCH ₂ COOH
6''O-Malonil-Genistina	H	OH	COCH ₂ COOH
6''O-Malonil-Glicitna	OCH ₃	H	COCH ₂ COOH

Fonte: LIU (1997).

O teor de isoflavonas nos grãos de soja é variável em função de diferenças genéticas entre as cultivares além de sofrer influência da temperatura ambiental durante o desenvolvimento dos grãos (WANG & MURPHY, 1994b; TSUKAMOTO et al., 1995; CARRÃO-PANIZZI, 1996b, 1999; LEE et al., 2003).

Carrão-Panizzi et al. (1996b) quantificaram isoflavonas em 100 cultivares comerciais de soja de ciclo de maturação precoce, semi-precoce, médio e tardio semeadas na safra 1994 em Londrina, Paraná, e observaram diferenças significativas quanto ao teor de isoflavonas, variando de 121,4 a 35,8 mg/100g nas cultivares de ciclo precoce e semi-precoce, de 121,7 a 29,6 mg/100g nas cultivares de ciclo médio e de 172,9 a 16,8 mg/100g nas cultivares de ciclo tardio. Segundo os pesquisadores, esta variabilidade foi independente do ciclo de maturação e atribuída as diferenças genéticas das cultivares.

Para avaliar a influência ambiental sobre o teor de isoflavonas, Carrão-Panizzi et al. (1999) semearam duas cultivares de soja em 14 locais diferentes e observaram que a 20^oC a concentração de isoflavonas foi maior: 155,6 mg/100g (FT-Abyara) e 196,0 mg/100g (IAS 5) que quando semeadas em temperatura média de 25^oC: 96,3 e 93,2 mg/100g, respectivamente. Estes resultados confirmaram os dados obtidos por Tsukamoto et al. (1995), que ao semear 7 cultivares de soja em 2 locais diferentes concluíram que o teor de isoflavonas foi maior quando as cultivares foram semeadas em locais com temperatura ambiental mais baixa durante o desenvolvimento dos grãos.

Resultados semelhantes foram obtidos por Lee et al. (2003) ao analisar 15 cultivares de soja semeadas em 3 locais diferentes por três anos consecutivos. Estes pesquisadores concluíram que a temperatura ambiental foi a principal causa das diferenças observadas.

A distribuição dos compostos de isoflavonas nos grãos de soja varia conforme a estrutura da semente. Dependendo da cultivar, as isoflavonas não estão presentes no tegumento da semente ou são detectadas apenas em quantidades traço (KUDOU et al., 1991; TSUKAMOTO et al., 1995; LIU, 1997). Segundo Tsukamoto et al. (1995), o teor de isoflavonas totais é de 5,5 a 6,0 vezes maior no hipocótilo da semente que nos cotilédones. Porém, 80 a 90% do total de isoflavonas dos grãos de soja estão localizados nos cotilédones, considerando que o hipocótilo corresponde a 2% do peso seco da semente. Ainda, segundo o autor, a gliciteína e seus conjugados ocorrem somente no hipocótilo.

Wang & Murphy (1994b) trabalhando com diferentes variedades de soja observaram que malonil genistina constituiu o isômero de isoflavona encontrado em maior

concentração nos grãos (25 a 42%), seguido por genistina, malonil daidzina e daidzina respectivamente, num total que variou entre 83 a 93% do total de isoflavonas.

Barnes et al. (1994) em experimentos para padronização do protocolo de extração de isoflavonas em alimentos à base de soja, constataram que conjugados malonil são termicamente instáveis, e podem sofrer reações de de-esterificação das ligações éster entre o grupo carboxila-malonato e o grupo 6''hidroxila da glucose, produzindo β -glicosídeos, ou sofrer reações de descarboxilação dando origem aos respectivos conjugados acetil glicosídeos. Murphy et al. (2002) submeteram farinha de soja integral a aquecimento de 150⁰C e observaram transformação equimolar de malonil genistina em acetil genistina e genistina após 2 horas a 150⁰C. Conjugados acetil não estão presentes em grãos de soja e alimentos derivados de soja minimamente processados, mas são detectados em alimentos submetidos a aquecimento durante sua produção (COWARD et al., 1998). Os conjugados acetil glicosídeos, sob temperaturas elevadas (80⁰C) também podem dar origem aos respectivos β -glicosídeos, em reações de de-esterificação entre o grupos carboxila-acetato e o grupo 6''hidroxila da glucose (BARNES et al., 1994).

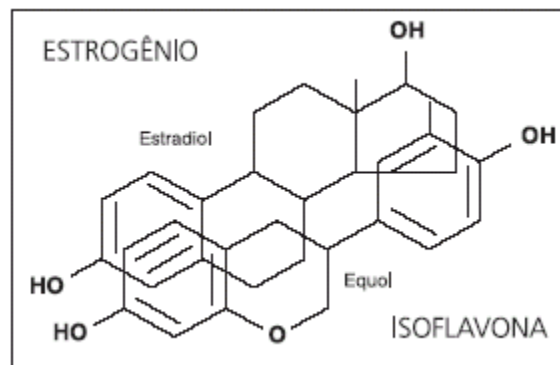
A forma de aquecimento empregada durante o processamento dos grãos de soja interfere significativamente na transformação das formas químicas de isoflavonas. Conforme Chien et al. (2005) sob aquecimento seco conjugados malonil são convertidos preferencialmente em acetil e sob aquecimento úmido a conversão se dá em β -glicosídeos.

β -glicosídeos e agliconas representam em média 19 e 2% do total de isoflavonas em grãos de soja (GÓES-FAVONI, 2002). Entretanto quando submetidos a diferentes processos para obtenção de alimentos derivados de soja, esta proporção pode sofrer alterações. Wang e Murphy (1994a) quantificaram isoflavonas em alimentos à base de soja e observaram que β -glicosídeos corresponderam a 49, 22 e 9% do total de isoflavonas em PTS, tofu e tempeh, respectivamente, enquanto as agliconas presentes nestes produtos variaram entre 3, 21 e 41% do total de isoflavonas, respectivamente. Estas alterações podem ocorrer durante o processamento de alimentos à base de soja devido a conversão de conjugados β -glicosídeos em agliconas, numa reação catalizada por enzimas β -glicosidases endógenas da soja ou de origem microbiana (MATSUURA et al., 1989; MURPHY et al., 2002). Durante hidratação de grãos de soja, β -glicosidases endógenas podem ser ativadas e atuar sobre β -glicosídeos convertendo-os em agliconas (TODA et al., 2001; GÓES-FAVONI et al., 2004a).

Assim como o processamento tem influência na distribuição das diferentes isoflavonas, a biodisponibilidade e atividades biológicas mediadas pelas isoflavonas também diferem de acordo com o isômero (ZHANG et al., 1999; CASSIDY et al., 2006).

3.2.2 Funções no Organismo

As isoflavonas são conhecidas como fitoquímicos que apresentam estrutura e peso molecular similar ao grupo dos hormônios sexuais femininos conhecidos como estrógenos (ADLERCREUTZ et al., 1991) (Figura 2). Hormônios estrogênicos são necessários para o crescimento e desenvolvimento normais de adultos saudáveis. São essenciais para proliferação celular do sistema reprodutor feminino atuando também em outros órgãos e sistemas como ossos, sistema cardiovascular, cérebro e próstata. A reação mediada por estes hormônios endógenos é caracterizada pelo alto grau de afinidade e especificidade entre os hormônios e seus receptores celulares (MOLTENI et al., 1995).



Fonte: LAJOLO (2001).

Figura 2 – Estrutura molecular da genisteína da soja e do hormônio endógeno 17 β -estradiol

Apesar de seus efeitos benéficos e necessários, os hormônios estrogênicos têm sido associados com a regulação neoplásica de mama, ovários, endométrio, próstata e sistema hematopoiético (MOLTENI et al., 1995).

Estudos epidemiológicos mostram que os fatores de risco para o desenvolvimento de câncer de mama compreendem a idade, história familiar, menstruação antes dos 12 anos de idade, menopausa após os 50 anos de idade, alteração de peso, dieta rica

em gorduras, sedentarismo (MESSINA, 1999a), sendo que para mulheres em idade pós-menopausa o fator de risco mais importante é a dieta (ADLERCREUTZ, 1990).

Lee et al. (1991) realizando estudos com humanos, concluíram que dietas com alto consumo de produtos à base de soja diminuí o risco de câncer de mama. Estudos comparativos sugerem que mulheres asiáticas que consomem soja e seus produtos derivados apresentam baixa incidência de câncer de mama em relação as mulheres ocidentais, que consomem pouco ou nenhum produto à base de soja (TAVARES et al., 2000). No Japão, onde é elevado o consumo de soja (cerca de 100 mg/dia de isoflavonas), a mortalidade por câncer de próstata é baixa (ADLERCREUTZ et al., 2000; BROUNS, 2002). Mäkela et al. (1995) realizaram estudos com camundongos e observaram que o consumo de soja reduz a incidência de displasia prostática, uma lesão considerada pré-neoplásica. Estes resultados levaram muitos pesquisadores a estudar os possíveis compostos presentes na soja que pudessem estar envolvidos nesta questão.

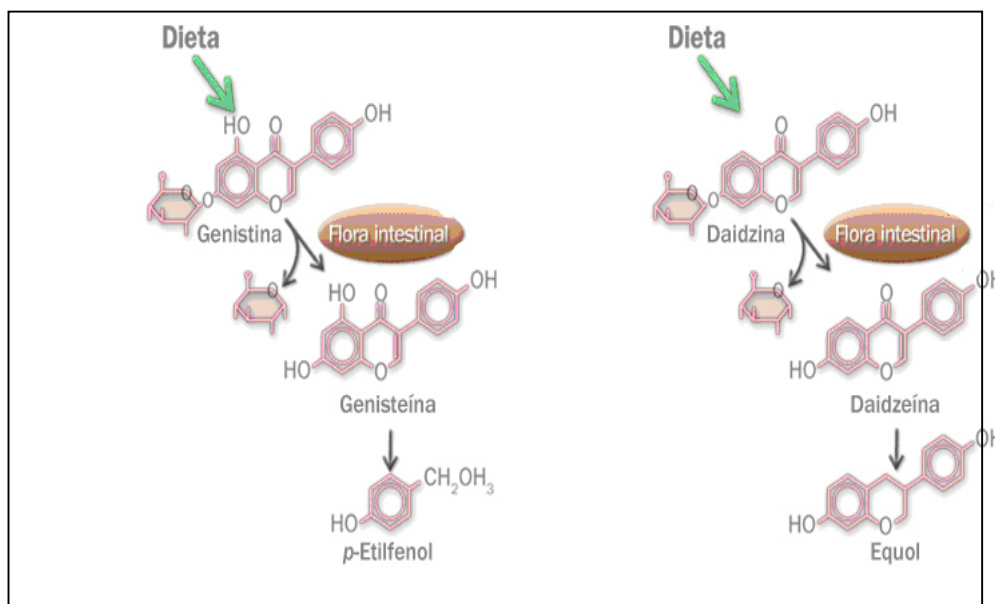
Setchell & Cassidy (1999) em estudos sobre biodisponibilidade das isoflavonas, observaram que quando alimentos à base de soja foram consumidos, a concentração de estradiol no plasma ultrapassaram os níveis fisiológicos normalmente observados (40 e 80 ng/mL para homens e mulheres, respectivamente). Estas constatações levaram a conclusões de que isoflavonas podem ser biologicamente ativas, desencadeando efeitos benéficos à saúde, tal como a baixa incidência de câncer hormônio-dependente em populações onde o consumo de soja e seus derivados é elevado.

Por apresentar semelhança estrutural com os hormônios estrogênicos, isoflavonas mimetizam sua ação ligando-se aos mesmos receptores (MOLTENI et al., 1995; HELFERICH, 1996), que são incapazes de reconhecer a diferença entre o hormônio endógeno e o isômero de isoflavona. A ligação estabelecida com as isoflavonas é bastante fraca (1×10^{-4} e 1×10^{-3} em relação ao hormônio endógeno estradiol) (MESSINA, 2000) e não provoca alteração conformacional nos receptores. Esta situação não desencadeia a mesma resposta fisiológica decorrente da ligação com o estrógeno. Além disso, ao se ligarem aos receptores bloqueiam-no impedindo a ligação do estrógeno endógeno (HELFERICH, 1996; KOLES, 2000). Assim, na ausência de estrógeno as células não são estimuladas à proliferação, prevenindo o desenvolvimento de células cancerosas (LI et al., 1999). Entretanto, em mulheres com níveis baixos de estrógenos, por exemplo em mulheres pós-menopausa, as isoflavonas produzem efeitos estrogênicos (MESSINA, 2000). Portanto, as isoflavonas podem atuar como agonistas ou como antagonistas do hormônio endógeno 17β -estradiol nos

receptores celulares, dependendo de sua concentração e do tecido em que se localizam estes receptores (MOLTENI et al., 1995; NEVEN, 1998; SETCHELL et al., 1998).

Conforme Setchell (2000), após a ingestão de alimentos contendo isoflavonas, as formas conjugadas são hidrolizadas por enzimas β -glicosidases (EC 3.2.1.21) presentes no intestino, liberando as principais formas bioativas – as agliconas daidzeína e genisteína. Estes compostos podem então ser absorvidos ou metabolizados na parte distal do intestino delgado dando origem a metabólitos específicos como equol e *p*-etilfenol, respectivamente (Figura 3). As β -glicosidases estão presentes no organismo humano produzidas pela microflora intestinal (SETCHELL, 1998).

Kawakami et al. (2005) incluíram isoflavonas na forma glicosídica ou na forma aglicona na dieta de ratos e observaram diminuição de triglicérides e LDL colesterol (Low Density Lipoprotein) e aumento de HDL colesterol (High Density Lipoprotein) quando os ratos foram alimentados com as duas dietas, porém numa proporção maior quando a dieta administrada continha agliconas. Os pesquisadores sugeriram que a diferença entre a dieta contendo agliconas e a dieta contendo β -glicosídeos pode ser resultado de diferenças na biodisponibilidade destas formas químicas. Ao comparar a eliminação das isoflavonas após o metabolismo, teores maiores de isoflavonas foram observadas nas fezes dos ratos alimentados com β -glicosídeos do que com agliconas, sugerindo que os β -glicosídeos não foram eficientemente hidrolizados no intestino e portanto foram excretados em maior quantidade, sendo este o motivo da resposta fisiológica menos eficiente.



Fonte: RUIZ-LARREA & RUIZ-SANZ (2007).

Figura 3 – Metabolismo das agliconas daidzeína e genisteína após a ingestão

Conforme Izumi et al. (2000), a desconjugação das isoflavonas é essencial para a absorção e biodisponibilidade das isoflavonas. Estes pesquisadores realizaram experimentos de ingestão de tabletes de soja contendo β -glicosídeos ou agliconas e concluíram que agliconas são absorvidas mais rápido e em maior quantidade que seus conjugados β -glicosídeos. Cassidy et al. (2006) realizaram estudos em humanos comparando a biodisponibilidade de isoflavonas em três alimentos de soja: extrato de soja aquoso, PTS e tempeh, todos com quantidades equivalentes de isoflavonas totais (0,44 mg de isoflavonas/Kg de massa corpórea). Os pesquisadores observaram que a matriz do alimento (tipo) bem como a distribuição das isoflavonas nesta matriz têm forte influência sobre a biodisponibilidade destes compostos. Quando as isoflavonas ingeridas estavam presentes no extrato aquoso, a absorção destes compostos foi mais rápida que quando ingeridas sob matriz sólida (PTS ou tempeh). Ao comparar os dois alimentos sólidos, PTS e tempeh, os picos de concentração plasmática foram maiores e alcançados mais rapidamente após a ingestão de tempeh, alimento fermentado que, segundo Murphy et al. (2002) contém em média 50% de agliconas em relação a massa molar total de isoflavonas.

Conforme estudos realizados por Setchell (1998), a disponibilidade de β -glicosidases no intestino humano é limitada e variável entre populações e em função da dieta, ingestão de medicamentos e tempo de permanência do alimento no intestino. Assim, a ingestão de alimentos com maiores concentrações de agliconas torna o processo de absorção mais rápido. Segundo Setchell et al. (2001), o pico de concentração de agliconas no plasma de adultos ocorre de 4 a 7 horas após a ingestão, enquanto após a ingestão de β -glicosídeos esse tempo passa a ser de 8 a 11 horas.

Das diferentes isoflavonas, as agliconas, sobretudo a genisteína tem despertado maior interesse dos pesquisadores. Estudos *in vitro* demonstraram que ela previne a transformação de células normais em pré-malignas, torna mais lenta a proliferação celular e atenua a angiogênese (ANDERSON et al., 1999). A atividade anti-carcinogênica apresentada pelas isoflavonas se deve não apenas a sua atividade estrogênica, mas a sua atividade anti-angiogênica, anti-metástase (LI et al., 1999) e também como inibidor da proteína tirosina-quinase, importante mediador de alguns fatores de crescimento relacionados com o desenvolvimento de tumores (ADLERCREUTZ et al., 1991).

Isoflavonas também têm sido associadas benéficamente a osteoporose, uma desordem óssea onde a razão de degeneração óssea é maior que a razão de formação dos ossos, resultando na perda de massa óssea, tornando os ossos fracos e quebradiços, facilmente fraturáveis. Esta doença é bastante grave em mulheres pós-menopausa, pois baixos níveis de

estrógenos estimulam a perda de massa óssea (NEVEN, 1998; CHAMBÔ FILHO et al., 2000). Potter et al. (1998) relataram efeito benéfico sobre os ossos após o consumo de 50 e 90 mg/dia de isoflavonas. Segundo Messina (2000), além das isoflavonas, proteínas da soja também contribuem para a diminuição da perda de massa óssea, reduzindo a excreção de cálcio através da urina, provavelmente devido ao baixo teor de aminoácidos sulfurados que apresenta.

Além dos efeitos anti-carcinogênicos e de redução da perda de massa óssea, isoflavonas têm sido associadas à redução dos riscos de doenças cardiovasculares e aterosclerose, atuando em conjunto com as proteínas da soja (TIKKANEN et al. *apud* REN et al., 2001). Vários estudos têm demonstrado que proteínas da soja estão envolvidas na diminuição dos riscos de doenças cardiovasculares através da diminuição dos níveis de LDL colesterol e diminuição da pressão sanguínea promovendo maior vascularização no endotélio arterial (ANDERSON et al., 1999; ANTHONY, 2000).

Anderson et al. (1995) realizaram uma meta análise com 38 estudos clínicos e concluíram que o consumo de proteínas da soja é capaz de diminuir o colesterol LDL em 12,9%. Potter et al. (1998) relataram que as proteínas da soja podem, quando consumidas, além de diminuir o colesterol LDL promover o aumento de HDL colesterol, conhecido como bom colesterol.

Considerando que a deficiência de estrógenos está associada com alterações significantes no metabolismo lipoprotéico levando a aumento da concentração de colesterol plasmático, e que isoflavonas desempenham função agonista ou antagonista dos hormônios estrogênicos, vários estudos sugerem que isoflavonas e proteínas da soja quando associadas, desencadeiam respostas fisiológicas mais acentuadas na redução do colesterol do que quando são ingeridas isoladamente (ANTHONY et al., 2000; SETCHELL, 1998; SETCHELL & CASSIDY, 1999). Este efeito mais acentuado promovido pela associação das isoflavonas com as proteínas da soja também foram observadas por Badger et al. (2002), quando isolados protéicos de soja foram ingeridos por ratos com tumores induzidos. Estes pesquisadores concluíram que a administração de isolados protéicos contendo isoflavonas teve um efeito mais significativo na redução da proliferação celular que quando os isolados protéicos administrados não continham isoflavonas.

Tikkanen et al. *apud* Ren et al. (2001), realizaram estudos de ingesta de proteína de soja contendo 60 mg de isoflavonas totais e observaram diminuição da oxidação do LDL colesterol. A oxidação das partículas de LDL constituem um pré-requisito para a formação de placas de ateroma nas paredes arteriais.

Apesar dos efeitos benéficos relatados na literatura, as quantidades de isoflavonas na dieta necessária para produzir efeitos biológicos no organismo humano ainda não foram estabelecidas e com isso a preconização de ingesta permanece sem normatização. Porém, com base em diferentes estudos e no consumo de populações orientais onde a soja constitui a base da alimentação, Setchell (1998) propôs que a ingesta de 30 a 50 mg de isoflavonas por dia seria o suficiente para desencadear reações clínicas positivas.

3.3 ISOFLAVONAS EM ALIMENTOS À BASE DE SOJA

As isoflavonas estão presentes em alimentos à base de soja, sendo a concentração e distribuição das diferentes formas químicas determinadas pela variedade da soja, diluição com outros ingredientes e principalmente pelas condições de processamento (CHIEN et al., 2005; GÓES-FAVONI et al., 2004b; COWARD et al., 1998; WANG & MURPHY, 1996; BARNES et al., 1994).

Coward et al. (1993) quantificaram isoflavonas em diversos alimentos à base de soja e observaram que em produtos de soja minimamente processados como farinha integral, o teor e a distribuição das isoflavonas são semelhantes aos grãos de soja *in natura*, sendo os conjugados malonil os principais compostos. Góes-Favoni et al. (2004b) observaram que em farinha de soja integral os conjugados malonil e β -glicosídeos constituíram as principais isoflavonas correspondendo a 64 e 33% do total de isoflavonas, respectivamente. Quando a farinha de soja foi desengordurada os conjugados malonil e β -glicosídeos continuaram como os principais compostos, porém os conjugados malonil diminuíram passando a representar 55% do total de isoflavonas enquanto os conjugados β -glicosídeos aumentaram para 42%. Conforme Wang & Murphy (1996), a extração de óleo realizada sob aquecimento leva a diminuição dos conjugados malonil que se converteram nos respectivos β -glicosídeos. Segundo Coward et al. (1993), isoflavonas não estão presentes no óleo de soja, sugerindo que o desengorduramento da farinha não altera a concentração destes compostos.

Coward et al. (1998) quantificaram cerca de 20% do total de isoflavonas como acetil glicosídeos em farinha de soja tostada. Conforme Wang & Murphy (1994a) conjugados acetil não são detectados ou estão presentes em quantidades traços em grãos e alimentos à base de soja minimamente processados, mas são encontrados em alimentos

submetidos a aquecimento durante seu processamento, devido a descarboxilação dos grupos malonil.

Em concentrados e isolados protéicos o teor de isoflavonas tende a ser menor que o observado em suas matérias-primas, evidenciando perdas durante o processamento (WANG & MURPHY, 1996). Conforme Wang & Murphy (1994a), concentrados protéicos de soja apresentam em média 70% de proteínas e podem ser obtidos a partir de flocos ou farinha de soja desengordurados, por lavagem alcoólica (etanol 60-80%), água acidificada (pH 4,5) ou água fervente. Segundo Garcia et al. (1998), os concentrados protéicos de soja são extensivamente utilizados pela indústria de produtos cárneos devido as suas propriedades físico-químicas. Sua aplicação melhora a estabilização da emulsão, funciona como extensor reduzindo o encolhimento durante o cozimento, melhora a firmeza, a flexibilidade, a textura e a qualidade nutricional, além do baixo custo quando comparado a proteínas de origem animal.

Conforme Coward et al. (1993), quando a remoção dos carboidratos é realizada em água quente e pH neutro, o teor de isoflavonas permanece quase inalterado em relação a matéria-prima. Porém, se esta remoção ocorre em meio alcoólico, as isoflavonas são praticamente eliminadas no resíduo, evidenciando a solubilidade destes compostos (WANG & MURPHY, 1994a; LIU, 1997; GENOVESE & LAJOLO, 2002). SINGLETARY et al. (2000) em experimentos com concentrados protéico de soja detectaram três vezes mais isoflavonas no concentrado protéico obtido a partir da extração em água (3,32 μMol), que no concentrado obtido por extração alcoólica (1,12 μMol), porém, a distribuição das formas químicas das isoflavonas em relação ao total foi semelhante nos dois produtos: β -glicosídeos > malonil glicosídeos > acetil glicosídeos > agliconas.

Conforme Genovese & Lajolo (2002) isolados protéicos de soja apresentam no mínimo 90% de proteína e podem ser preparados a partir de flocos ou farinha de soja desengordurados, submetidos a extração aquosa ou alcalina resultando num resíduo insolúvel composto por carboidratos insolúveis e proteínas, seguido por uma precipitação ácida das proteínas, centrifugação, neutralização e secagem da fração protéica. Constitui um produto de alto valor agregado, e é amplamente utilizado pela indústria alimentícia na composição de fórmulas infantis, bebidas e produtos lácteos por apresentar características emulsificantes, de suspensão e estabilização (WOLF, 1972).

Segundo Wang & Murphy (1996), isolados protéicos de soja apresentam teor de isoflavonas menor que o encontrado em suas matérias-primas devido às perdas ocasionadas durante a extração alcalina, pois o pH alcalino pode modificar as cargas das

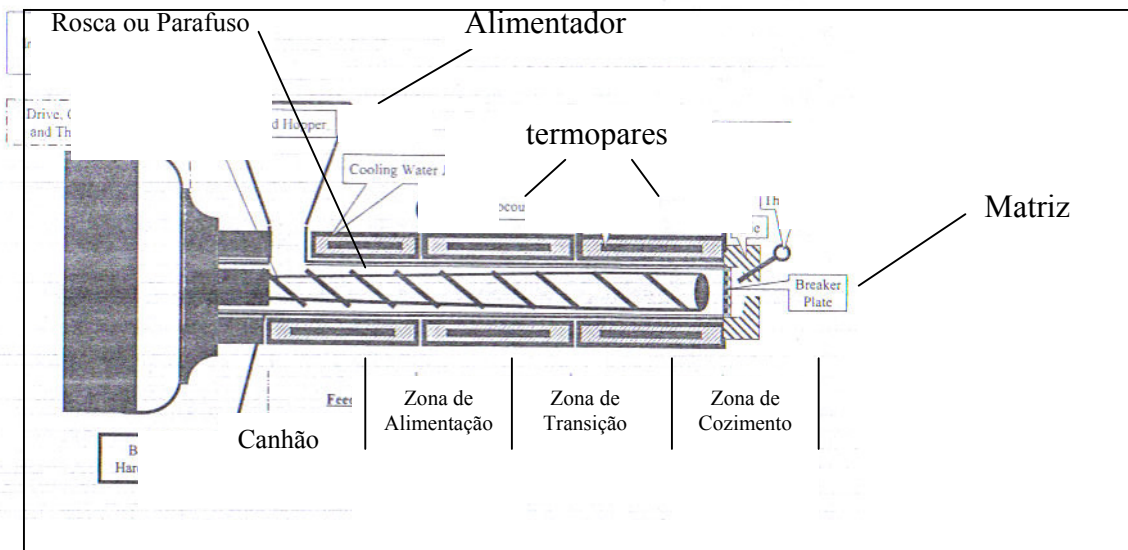
moléculas de proteínas e alterar ligações com as isoflavonas. Observando estas alterações e levando-se em conta a importância das isoflavonas na saúde, novas tecnologias têm sido empregadas para extração de proteínas da soja. Processos de extração utilizando água levam a produção de isolados protéicos com teor de isoflavonas maiores em função da retenção destes compostos na matriz do produto (FARAJ & VASANTHAN, 2004).

Quando concentrados e isolados protéicos são utilizados em formulação com outras matérias-primas, o teor de isoflavonas nos alimentos são menores, uma vez que a adição de outros ingredientes que não contém isoflavonas promove diluição destes constituintes (WANG & MURPHY, 1994a).

Conforme Genovese & Lajolo (2002), proteínas texturizadas de soja disponíveis comercialmente no varejo apresentam em média 50% de proteínas e são obtidas a partir de farinha de soja desengordurada, com baixo custo de obtenção e alto valor agregado, uma vez que apresentam textura similar a tecidos musculares, alta capacidade de hidratação e fácil incorporação de sabor e aroma. São amplamente consumidas como substitutos da carne e pela indústria alimentícia como ingrediente alimentar. Segundo Murphy et al. (2002), concentrado ou isolado protéico de soja também podem constituir matéria-prima para processamento de PTS, porém encarecem o produto.

Segundo Horvath & Czukor (1993) a obtenção de PTS ocorre através de processo de extrusão termoplástica que se desenvolve no interior de equipamentos chamados extrusores, onde são utilizadas altas temperatura, pressão e atrito fazendo com que as proteínas da soja sejam desnaturadas e reorientadas dando origem a produtos com estrutura e textura diferenciadas.

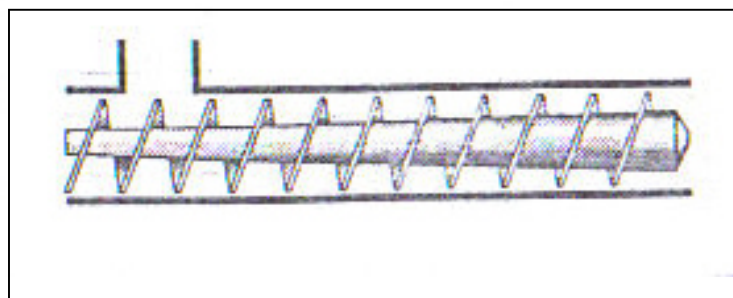
Os extrusores utilizados na texturização de proteínas são constituídos basicamente por um alimentador onde a matéria-prima é colocada em um canhão com terminais para aquecimento, separados em 3 ou mais seções (Figura 4). No interior do canhão há um parafuso de Archimedes (Figura 5), cujas arestas podem decrescer em altura e distância entre si na direção do orifício de saída, provocando uma maior força de cisalhamento e aumento de temperatura interna. Esta rosca ou parafuso gira conduzindo a matéria-prima até a saída do canhão onde encontra-se a matriz, cuja função é aumentar a resistência à saída da massa, bem como dar forma ao produto final (Figura 4).



Fonte: RIAZ (2000).

Figura 4 – Figura esquemática de extrusor monorosca

Além de extrusores monorosca, extrusores de dupla rosca também podem ser utilizados na texturização de proteínas, aumentando a versatilidade na obtenção do produto final. Temperatura, umidade, tempo de residência do material no interior do canhão, tamanho da matriz, velocidade, configuração e taxa de compressão do parafuso são parâmetros que podem facilmente ser manipulados e em conjunto possibilitam a obtenção de diferentes produtos, alterando não somente seu aspecto mas suas propriedades funcionais.



Fonte: RIAZ (2000).

Figura 5 – Representação esquemática de um parafuso de Archimedes

Os extrusores monorosca apresentam o canhão dividido em três seções consecutivas chamadas zona de alimentação, zona de transição e zona de cozimento (Figura

4) (ROKEY, 2000). A primeira seção corresponde a entrada da matéria-prima no equipamento, onde pode ser umidecida por jatos de água ou vapor, caso não tenha sido pré-condicionada para o teor de umidade desejado. Em seguida, na zona de transição a massa umidecida é compactada e passa para a zona de cozimento onde, sob condições drásticas de temperatura, pressão e atrito a massa é fundida. Devido a alta pressão na zona de cozimento, a água conserva-se no estado líquido. Ao sair do extrusor, através da matriz, a água líquida super aquecida vaporiza instantaneamente em função das diferenças de temperatura e pressão, passando de uma massa fundida para um material poroso, constituído por uma rede de orifícios. O resfriamento é rápido e o produto se solidifica na forma expandida. Deste processo resulta a Proteína Texturizada de Soja (PTS), um produto poroso, que pode ser utilizado diretamente na alimentação humana ou como ingrediente alimentar. Após a re-hidratação utilizada como uma etapa pré-preparo, a PTS assume aspecto similar a carne bovina, de sabor neutro e coloração amarronzada (RIAZ, 2000).

Conforme Sheard et al. *apud* Horvath & Czukor (1993), a extrusão termoplástica modifica a estrutura e a textura da soja, sendo estas alterações resultado das alterações ocorridas nas proteínas. Durante a extrusão, na seção de transição do extrusor, as proteínas se desnaturam e são re-alinhadas na direção do fluxo e ligações inter-moleculares são estabelecidas garantindo a estabilidade da rede tridimensional das proteínas formada após a extrusão (HAGER, 1984; ARÊAS, 1992).

Durante obtenção de Proteína Texturizada de Soja (PTS), além das alterações nas proteínas, alterações significativas podem ocorrer quanto ao teor e distribuição de isoflavonas. Entretanto, Singletary et al. (2000), após extrusar concentrados protéicos de soja observaram redução não significativa de 9% no teor total de isoflavonas em relação a sua matéria-prima e concluíram que apesar das condições drásticas de processamento, estes compostos não foram degradados durante o processo de extrusão.

Góes-Favoni et al. (2004b) ao quantificar isoflavonas em produtos à base de soja concluíram que as PTS disponíveis comercialmente apresentaram alto teor de isoflavonas (114 a 183 mg/100g) e que a distribuição de seus compostos refletem as condições de processamento utilizadas durante sua obtenção, apresentando β -glicosídeos como os principais compostos de isoflavonas.

Coward et al. (1998) em estudos com alimentos à base de soja detectaram a presença das três formas conjugadas em PTS comercial, sendo os β -glicosídeos as principais formas, correspondendo a 43% do total de isoflavonas, seguidos por acetil glicosídeos, 30%, e malonil glicosídeos, 23%. Genovese & Lajolo (2002) avaliaram três marcas comerciais de

PTS e observaram um padrão semelhante entre eles quanto a distribuição das formas químicas. Nos três produtos analisados os conjugados β -glicosídeos constituíram os principais compostos, representando entre 43 e 48% do total de isoflavonas, sugerindo que as temperaturas elevadas durante a extrusão promoveram conversão dos conjugados malonil em acetil e β -glicosídeos.

Em extratos solúveis de soja, conhecidos popularmente como “leite de soja”, as isoflavonas estão presentes principalmente como β -glicosídeos. Os extratos solúveis de soja podem ser obtidos a partir de diferentes processos, utilizando grãos de soja, farinha desengordurada, concentrados ou isolados protéicos. O processo básico de obtenção de extratos de soja consiste na hidratação da matéria-prima, cozimento, filtração e separação do resíduo insolúvel (okara). Wang & Murphy (1996), em estudo de balanço de massa durante obtenção de diferentes alimentos de soja, observaram que durante o processamento de extrato de soja aquoso ocorreram perdas insignificantes de isoflavonas para o resíduo insolúvel (okara), sugerindo que as isoflavonas podem estar associadas a componentes solúveis, provavelmente proteínas solúveis da soja. Entretanto, durante obtenção de tofu, produto obtido pela coagulação do extrato de soja aquoso, o teor de isoflavonas sofreu redução de 33% em relação aos grãos de soja, sendo que a maior perda ocorreu na etapa de coagulação do extrato de soja aquoso. Embora o teor total de isoflavonas tenha sido menor em tofu, a distribuição destes compostos manteve-se semelhante a observada no extrato de soja: β -glicosídeos > malonil > agliconas > acetil.

Toda et al. (2000) analisaram extratos de soja comerciais e concluíram que maior teor de β -glicosídeos (62% do total de isoflavonas) em relação aos grãos de soja (21%) ocorreu devido a de-esterificação dos conjugados malonil, em função de temperaturas elevadas (85 a 130⁰C) durante o processamento.

Conforme Wang & Murphy (1996) a concentração de isoflavonas em alimentos não fermentados é de duas a três vezes maior que nos alimentos fermentados, sendo as formas conjugadas, os principais compostos. Em farinhas de soja integral, desengordurada e tostada o teor de agliconas corresponde em média a 3% do total de isoflavonas, sendo similar aos valores observados em grãos de soja (COWARD et al., 1998; GÓES-FAVONI et al., 2004b). Singletary et al. (2000), quantificaram 3% de agliconas em relação ao total de isoflavonas em concentrado protéico obtido por extração aquosa. Em isolados protéicos, Wang & Murphy (1996) observaram que o teor de agliconas aumentou cerca de 6 vezes em relação à sua matéria-prima, porém o teor de isoflavonas totais diminuiu cerca de 70%.

Em proteínas texturizadas de soja analisadas por Góes-Favoni et al. (2004b), o teor de agliconas não sofreu alterações significativas em relação à sua matéria-prima, representando em média, 5 a 8% do total de isoflavonas.

Em extrato de soja e tofu, Wang & Murphy (1996) quantificaram cerca de 11 e 20% do teor total de isoflavonas como agliconas, respectivamente, registrando aumento de 3,7 e 2,2 vezes em relação aos grãos de soja, respectivamente. Matsuura et al. (1989) observaram aumento do teor de agliconas e redução de β -glicosídeos em grãos de soja durante a etapa de hidratação, e após a adição de um inibidor da enzima β -glicosidase concluíram que este aumento ocorreu devido a hidrólise enzimática dos β -glicosídeos.

Em alimentos fermentados o teor de isoflavonas totais é menor que nos alimentos não fermentados, porém os principais compostos de isoflavonas nestes produtos são as agliconas (MURPHY et al., 2002). Tempeh, um alimento fermentado à base de soja, obtido em etapas subsequentes de descascamento dos grãos de soja, hidratação em água, cozimento, drenagem e inoculação com o fungo *Rhizopus oligosporus* (LIU, 1997), o teor de agliconas pode atingir 50% da massa molar total de isoflavonas (MURPHY et al., 2002). Wang & Murphy (1996) analisaram produtos à base de soja e concluíram que durante a fermentação do tempeh ocorre uma re-distribuição das isoflavonas, originando um produto final com 6,5 vezes mais agliconas e menor teor de β -glicosídeos, provavelmente devido a ação hidrolítica da enzima β -glicosidase fúngica atuando em conjunto com β -glicosidases endógenas da soja. Realizando estudos de balanço de massas, estes pesquisadores concluíram que a maior perda de isoflavonas durante processamento de tempeh ocorreu na etapa de cozimento, levando a conclusão de que o aumento da temperatura durante a hidratação provocou aumento da velocidade de lixiviação das isoflavonas, principalmente com os grãos de soja estando descascados.

Vários trabalhos têm demonstrado a eficiência do tratamento hidrotérmico na formação de agliconas em grãos de soja (TODA et al., 2001; GÓES-FAVONI, 2002a; CARRÃO-PANIZZI et al., 2003, 2004). Matsuura & Obata (1993) realizaram estudos com β -glicosidases da soja e constataram que durante hidratação de grãos de soja, sob condições ideais de temperatura e pH (50°C e pH 6,0) estas enzimas podem atuar sobre β -glicosídeos convertendo-os em agliconas. Góes-Favoni (dados não publicados) mantiveram grãos de soja da cultivar IAS 5 safra 1999 sob hidratação a 45, 50, 55 e 60°C por 12 horas e observaram que a 50°C ocorreu o maior aumento de agliconas em relação aos grãos de soja não hidratados: 33,4 vezes enquanto o teor dos conjugados β -glicosídeos e malonil glicosídeos diminuíram, passando de 216,8 mg/100g nos grãos não hidratados para 73,9 mg/100g após a hidratação.

Nas quatro temperaturas testadas o teor de isoflavonas totais diminuiu, passando de 218,0 mg/100g nos grãos não hidratados para 147,0, 115,1, 91,1 e 81,6 mg/100g nos grãos hidratados a 45, 50, 55 e 60⁰C, respectivamente. Isto ocorreu em função da lixiviação de isoflavonas para a água de hidratação, sendo que o aumento da temperatura provocou maior migração destes compostos. Conforme Kao et al. (2004) a perda de isoflavonas para a água de hidratação em que grãos de soja são mantidos é tempo e temperatura dependentes, aumentando com o aumento do tempo e da temperatura de exposição dos grãos.

Uma vez que a hidratação constitui uma prática comum no processamento de diversos alimentos à base de soja sendo a água descartada como resíduo na maioria dos métodos, procedimentos que levem em consideração a formação e retenção de agliconas no alimento devem ser estudados, pois conforme Cassidy et al. (2006), dentre as isoflavonas as agliconas constituem as formas de isoflavonas biologicamente ativas e mais biodisponíveis.

3.4 INFLUÊNCIA DA ENZIMA B-GLICOSIDASE SOBRE AS ISOFLAVONAS DA SOJA

β -glicosidases (β -D-glucosideo-*o*-glucohidrolase, EC. 3.2.1.21) constituem um grupo de enzimas heterogêneas capazes de hidrolizar ligações β -glicosídicas de dissacarídeos, oligossacarídeos e outros conjugados glicosídicos. Estas enzimas estão amplamente distribuídas na natureza e participam de diferentes processos biológicos como degradação de biomassa celulósica, hidrólise de glicolípídeos e modificações de metabólitos secundários (ESEN *apud* HSIEH & GRAHAM, 2001). β -glicosidases são encontradas em diversos vegetais, inclusive em leguminosas e produzidas por diferentes fontes microbianas (MATSUDA et al., 1992, 1994; PARK et al., 2001; HSIEH & GRAHAM, 2001).

Ribeiro et al. (2007) determinaram a atividade de β -glicosidases em 18 cultivares de soja semeadas em Londrina, Paraná na safra 2003 e observaram nível de atividade variando de 88,9 a 61,1 UA/g de amostra. Carrão-Panizzi & Bordingnon (2000) também observaram diferenças no nível de atividade da β -glicosidase entre 51 cultivares de soja semeadas em Londrina na safra 1994. Nos dois experimentos os grãos de soja foram submetidos as mesmas condições ambientais durante o desenvolvimento, sugerindo que as diferenças observadas se devem a características genéticas das cultivares.

Durante o processamento de alimentos, grãos de soja são submetidos a diferentes condições que podem favorecer a atuação de β -glicosidases ou promover sua

inativação. Conforme Matsuura et al. (1989) β -glicosidases endógenas da soja apresentam atividade máxima em temperatura de 50°C e pH 6,0. Quando purificadas as enzimas podem atuar em faixas diferentes de pH e temperatura. Ao purificar β -glicosidases da soja, Matsuura & Obata (1993), isolaram três isoenzimas: A, B e C, das quais B e C apresentaram capacidade de hidrolizar os β -glicosídeos daidzina e genistina. Estas isoenzimas apresentaram atividade máxima em pH 5,5 e temperatura de 45°C, e a 55°C, 80% da atividade enzimática permaneceu, sendo inativadas a 60°C.

Diversos estudos têm demonstrado que após hidratação de grãos de soja em água, as isoflavonas apresentam alterações quanto à sua distribuição, sobretudo diminuição do teor de β -glicosídeos e aumento de agliconas (WANG & MURPHY, 1996; TODA et al., 2001; GÓES-FAVONI et al., 2004a; CARRÃO-PANIZZI et al., 2003).

Matsuura et al. (1989) em estudos com extratos aquosos de soja mantiveram grãos de soja em hidratação por 16 horas a 20°C e observaram aumento no teor de agliconas que passaram de 3,3% para 12,4% do total de isoflavonas após a hidratação e concomitante diminuição de β -glicosídeos. Apesar da baixa temperatura de hidratação, estas alterações foram atribuídas a ação de β -glicosidases endógenas da soja, pois ao adicionarem 0,5% glucona- δ -lactona (inibidor de β -glicosidase) à água de hidratação o teor de agliconas não apresentou alterações significativas. Resultados semelhantes foram obtidos por Toda et al. (2000) quando mantiveram grãos de soja em hidratação por 1, 2, 5, 10 e 15 horas a 20°C. Estes autores observaram aumento significativo no teor de agliconas e diminuição de β -glicosídeos, sendo que estas alterações aumentaram com o aumento do tempo de hidratação. Ao adicionarem 0,5% de glucona- δ -lactona à água de hidratação, não detectaram alterações na distribuição das formas de isoflavonas, evidenciando a ação de β -glicosidases endógenas da soja sobre os β -glicosídeos.

Enquanto Matsuura et al. (1989) e Toda et al. (2000) registraram inibição quase total da formação de agliconas após a adição de glucona- δ -lactona, Araujo et al. (1997) observaram inibição parcial da enzima quando adicionaram este inibidor à água de hidratação em que grãos de soja foram mantidos por 12 horas. Conforme Matsuura et al. (1989), glucona- δ -lactona pode ser convertida em ácido glucônico e glucona- γ -lactona em solução aquosa aquecida, sendo que glucona- δ -lactona constitui um inibidor mais potente de β -glicosidase que glucona- γ -lactona. Uma vez que Araujo et al. (1997) não relataram a temperatura utilizada no experimento, este pode ser motivo da diferença observada na inibição da enzima.

Góes-Favoni et al. (2004a) mantiveram grãos de soja inteiros em hidratação por 12 horas a 50°C e observaram aumento no teor de agliconas, que passaram de 0,5% para 41,5%, em média, do total de isoflavonas. As diferenças de aumento das agliconas observadas entre os experimentos destes pesquisadores com os resultados obtidos por Matsuura et al. (1989) se devem provavelmente a diferença de temperatura empregada durante a hidratação dos grãos, havendo a 50°C condições ideais para a atividade da enzima. Após o tratamento hidrotérmico, Góes-Favoni et al. (2004a) observaram que o nível de atividade da enzima β -glicosidase diminuiu em média 80%, sugerindo que após hidrolizar os β -glicosídeos, migrou para a água de hidratação. Toda et al. (2001) determinaram atividade de β -glicosidase na água em que grãos de soja foram mantidos por 5, 10, 15 e 20 horas a 15°C e detectaram atividade da enzima na água aumentando com o aumento do tempo de hidratação, evidenciando que se trata de uma proteína solúvel em água.

Alimentos à base de soja submetidos a ação de elevadas temperaturas durante seu processamento tendem a apresentar teor de agliconas inalterados em relação a sua matéria-prima, em função da desnaturação e inativação da β -glicosidase (WANG & MURPHY, 1996; ZHANG et al., 2004). Zhang et al. (2004) em experimentos de panificação com farinha de soja e de trigo observaram que após o assamento da massa (165°C, 50 minutos) nenhuma atividade de β -glicosidase foi detectada, enquanto nos ingredientes utilizados o nível de atividade da enzima foi de 0,7; 10,7; 6,8 e 4,1 UA/g na levedura, farinha de soja, extrato de soja em pó e farinha de trigo, respectivamente, evidenciando a inativação da enzima após o aquecimento. Quanto as agliconas, não houve alterações significativas após o assamento da massa.

Em alimentos à base de soja fermentados o teor de agliconas tende a ser maior que nos alimentos não fermentados em função da atividade conjunta de β -glicosidases endógenas da soja e microbianas. Em estudos realizados com farinha de soja em extrato metanólico, Park et al. (2001) observaram completa transformação de β -glicosídeos em agliconas quando β -glicosidase de *Aspergillus oryzae* foi adicionada e mantida no extrato por 48 horas a 30°C. Matsuda et al. (1994) em experimentos com enzimas microbianas observaram que β -glicosidases de *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* converteu eficientemente β -glicosídeos em agliconas, cuja especificidade enzimática foi de 62% e 57% para diadzina e genistina, respectivamente, enquanto para o substrato *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo (*p*-NPG) a especificidade foi de 100%. Diversos estudos têm sido publicados demonstrando as potencialidades de uso de microrganismos na produção de β -

glicosidases que atuam sobre isoflavonas da soja (ESAKI et al., 1999; XIE et al., 2003; TSANGALIS et al., 2003).

Enzimas β -glicosidases também estão presentes no organismo humano produzidas pela microflora intestinal e atuam na desconjugação de β -glicosídeos produzindo agliconas que são absorvidas em maior quantidade e mais rapidamente que seus conjugados (IZUMI et al., 2000; CASSIDY et al., 2006;). Porém, conforme estudos realizados por Setchell (1998), a disponibilidade de β -glicosidases no intestino humano é limitada e variável entre populações e em função da dieta, ingestão de medicamentos e tempo de permanência do alimento no intestino. Considerando a importância das agliconas na saúde e sua biodisponibilidade, a ingestão de alimentos com maiores concentrações de agliconas é desejável.

3.5 DETERMINAÇÃO DE ISOFLAVONAS EM SOJA E ALIMENTOS DERIVADOS DE SOJA

A determinação de isoflavonas, conforme Berhow (2002), depende de três etapas básicas: um método eficiente de extração, um processo adequado de separação das diferentes formas químicas e a identificação e quantificação precisa destes compostos.

Para a análise de isoflavonas em soja e alimentos derivados, diferentes procedimentos têm sido adotados, a maioria deles consistindo na extração das isoflavonas por solventes polares seguidos por separação em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em sistemas solventes de gradiente linear binário e, identificação e quantificação baseadas nos tempos de retenção e espectros de absorção de padrões purificados.

3.5.1 Extração de Isoflavonas

Na literatura recente são encontrados diferentes métodos para a extração de isoflavonas, a maioria deles consistindo na adição de solventes ao material, seguidos por filtração para obtenção de extratos líquidos que serão injetados no cromatógrafo (COWARD et al., 1993; WANG & MURPHY, 1994a; KUDOU et al., 1991; BERHOW, 2002; CARRÃO-PANIZZI et al. 2002; MURPHY et al., 2002).

Embora as isoflavonas possam ser extraídas da soja fresca, a moagem resultando em amostras de granulometria fina aumenta a eficiência da extração. O desengorduramento das amostras que apresentem teor de óleo superior a 5% com solventes apolares como hexano também tem sido sugerida como um pré-requisito para uma extração eficiente (COWARD et al., 1993, 1994; BERHOW, 2002).

Para garantir a integridade da coluna do cromatógrafo (fase estacionária), a eliminação de outros componentes que não sejam as isoflavonas presentes nas amostras a serem analisadas, constitui um passo importante na metodologia de análise das isoflavonas. Assim, pré-colunas de fase sólida podem ser utilizadas para a filtragem dos extratos obtidos antes de serem injetados no cromatógrafo. As pré-colunas, em geral são constituídas do mesmo material da coluna utilizada na cromatografia (BERHOW, 2002).

Conforme Barnes et al. (1994), soluções solventes contendo ácidos como ácido acético e ácido trifluoroacético, podem melhorar a eficiência da separação dos conjugados malonil e β -glicosídeos durante a corrida cromatográfica, tornando os conjugados malonil mais estáveis através da protonação de seus grupos carboxílicos.

A extração de isoflavonas sob temperaturas elevadas (80⁰C) foi utilizada em diferentes estudos que sugeriram maior eficiência das soluções solventes quando aquecidas (KUDOU et al., 1991; BARNES et al., 1994). Outros estudos porém, sugeriram que a extração em temperatura ambiente permite a quantificação das formas químicas de isoflavonas conforme sua distribuição original nas amostras, pois sob aquecimento os conjugados malonil podem ser convertidos em acetil e β -glicosídeos alterando sua distribuição original (GENOVESE & LAJOLO, 2001).

Uma metodologia bastante comum utilizada ainda por muitos pesquisadores, consiste em hidrolisar as formas conjugadas em agliconas antes da extração. Esta hidrólise pode ser realizada utilizando enzimas β -glicosidases ou por hidrólise ácida com ácido sulfúrico ou ácido clorídrico 2 M (WANG & MURPHY, 1994a; MURPHY et al. 1999). Entretanto, este protocolo de extração têm sido re-avaliado e desaconselhado por alguns pesquisadores, uma vez que a hidrólise prévia dos conjugados impede o acompanhamento das alterações dos isômeros provocadas pela estocagem e processamento dos grãos de soja (GENOVESE & LAJOLO, 2001; MURPHY et al., 2002).

Uma vez que na soja *in natura* as isoflavonas encontram-se principalmente na forma conjugada, a extração com solventes polares tem sido indicada, sendo as agliconas também extraídas. Diferentes solventes em sistemas aquosos têm sido utilizados, entre eles acetonitrila, acetona, etanol e metanol são os mais comuns (FARMAKALIDIS & MURPHY,

1985; KUDOU et al., 1991; COWARD et al., 1998; CARRÃO-PANIZZI et al., 2002; GÓES-FAVONI, 2002). Murphy et al. (2002), realizaram estudos comparativos entre diferentes solventes na extração de isoflavonas em alimentos de soja e observaram ausência de um padrão na extração dos isômeros. Em farinha de soja, metanol aquoso extraiu mais agliconas que acetonitrila, enquanto para PTS e tempeh, acetonitrila foi mais eficiente na extração desses compostos. Etanol aquoso foi mais eficiente na extração de β -glicosídeos presentes na farinha de soja que acetonitrila e acetona, porém foi menos eficiente para conjugados malonil. Em PTS, etanol constitui o solvente mais eficiente para extrair acetil glicosídeos. Conforme os pesquisadores, estes resultados sugerem que a matriz do alimento pode interferir na extração das isoflavonas e que as diferentes formas químicas de isoflavonas apresentam afinidades diferentes com diferentes solventes.

Carrão-Panizzi et al. (2002) realizaram experimentos comparando diferentes tempos de extração de isoflavonas de farinha de soja (1, 4, 8, 12, 16, 20 e 24 horas) com e sem agitação utilizando etanol 70% contendo 0,1% de ácido acético, conforme metodologia descrita por Kudou et al. (1991). Diferenças significativas entre os tempos de extração não foram observadas. Quando comparados a extração com agitação e sem agitação, a média de recuperação das isoflavonas totais foi maior sob agitação (217,2 mg/100g) que sem agitação (191,0 mg/100g). Levando-se em consideração a eficiência e a economia de tempo, os pesquisadores concluíram que a extração de isoflavonas com etanol 70% contendo 0,1% de ácido acético por 1 hora sob agitação (250 rpm) constituiu um método eficiente para a extração de isoflavonas de farinhas de soja.

3.5.2 Separação

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), têm sido o método mais comum utilizado para a separação de isoflavonas em grãos de soja e alimentos à base de soja (FENNER, 1996), apresentando a vantagem sobre a cromatografia gasosa de que as formas conjugadas podem ser analisadas tão facilmente quanto as formas agliconas (BARNES et al., 1994).

As metodologias de separação das isoflavonas em CLAE variam muito e podem ser desenvolvidas pelo uso de diferentes condições isocráticas, utilizando apenas um solvente, ou em gradientes binários, terciários e quaternários em coluna de fase normal, onde

a fase estacionária, normalmente C18, apresenta polaridade maior que a fase móvel, ou em coluna de fase reversa (BERHOW, 2002). A maioria das análises de isoflavonas em CLAE utilizam coluna de fase reversa em condições de gradiente binário (WANG & MURPHY, 1994a; TSUKAMOTO et al., 1995; BARNES et al., 1994; CARRÃO-PANIZZI et al., 1998; FRANKE et al., 1998). Embora condições isocráticas tenham sido utilizadas inicialmente na separação de isoflavonas, a hidrofobicidade diferenciada das isoflavonas levou a utilização quase unânime de gradientes de fase móvel, sendo possível variar a polaridade da fase móvel permitindo a separação de todas as formas químicas (COWARD et al., 1993; MURPHY et al., 2002).

Diferentes protocolos para separação de isoflavonas são encontrados na literatura, porém na maioria deles solventes polares são utilizados em sistemas binários aquosos em gradiente linear. Os solventes mais utilizados são acetonitrila e metanol em gradientes programados por tempos diferentes (BARNES et al., 1994; SONG et al., 1998; FRANKE et al., 1998a; BERHOW, 2002; MURPHY et al., 2002;).

Devido a instabilidade dos conjugados de isoflavonas, a adição de ácido na fase móvel tem sido utilizada permitindo maior estabilidade dessas formas químicas. Conforme BARNES et al. (1994), a presença de ácido na fase móvel diminui a ionização dos grupos carboxila presentes nos conjugados malonil dificultando sua conversão em outras formas químicas.

3.5.3 Identificação e Quantificação

Para a identificação das isoflavonas atualmente tem sido utilizados detectores de arranjo de diodo proporcionando a obtenção de espectro em vários pontos durante a eluição dos picos (BERHOW, 2002). Entretanto, considerando que a maioria das isoflavonas apresentam picos de absorvância em torno de 260 nm, alguns trabalhos têm sugerido o ajuste do comprimento de onda para 260 nm (CARRÃO-PANIZZI et al., 2002; GÓES-FAVONI, 2002; KUDOU et al., 1991). Um exemplo típico de cromatograma da mistura dos 12 padrões de isoflavonas e os espectros dos β -glicosídeos são mostrados nas Figuras 6 e 7, respectivamente.

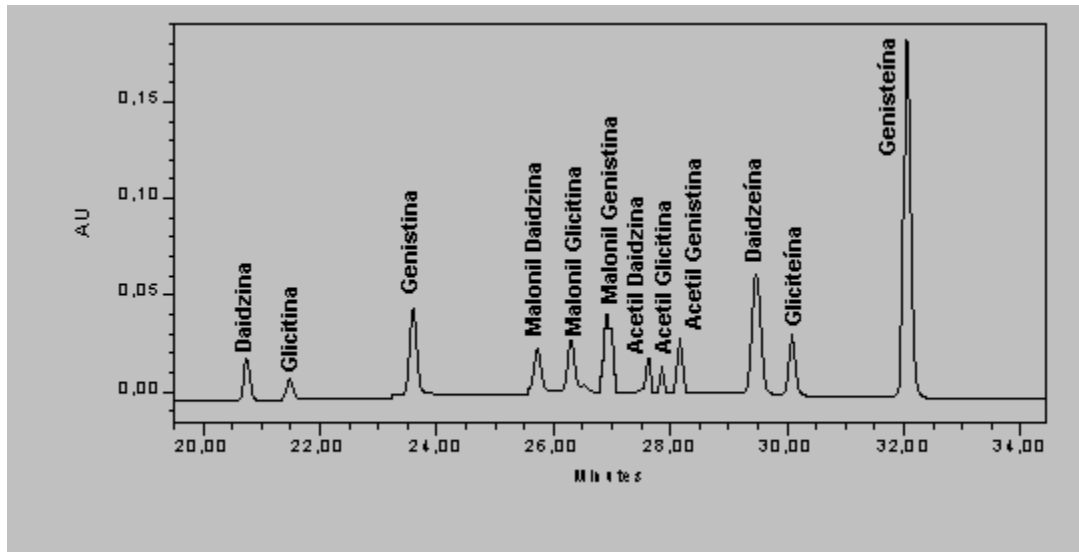


Figura 6 – Cromatograma típico da mistura dos 12 padrões de isoflavonas

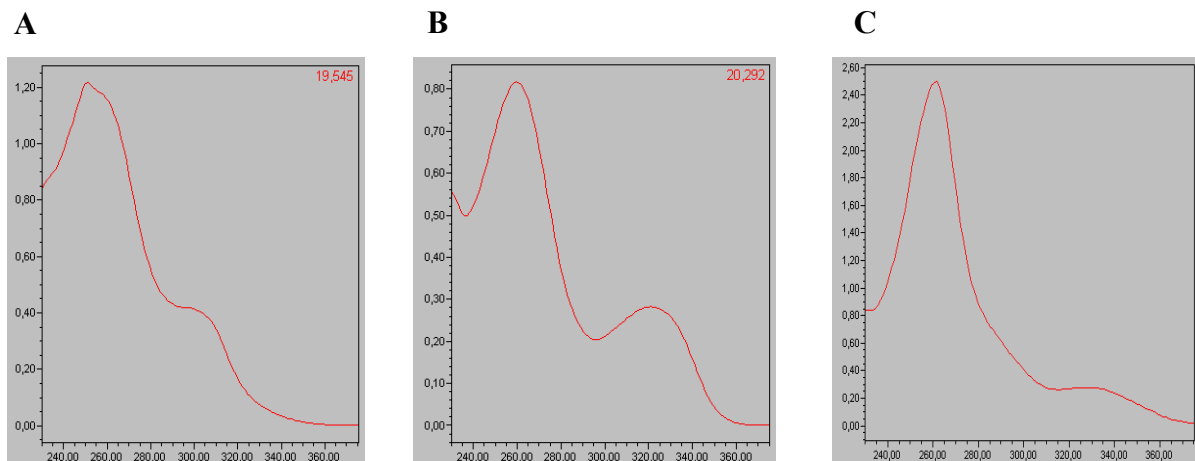


Figura 7 – Espectro dos β -glicosídeos [A] Daidzina; [B] Glicitina; [C] Genistina

Na quantificação das isoflavonas, softwares específicos são utilizados baseando-se nos espectros e tempos de retenção. Uma vez que os espectros das agliconas, β -glicosídeos, malonil e acetil glicosídeos são bastante semelhantes dentro de cada tipo, daidzina, glicitina e genistina, e que o coeficiente de extinção molar de cada β -glicosídeos é semelhante aos respectivos isômeros, o uso de padrões purificados de daidzina, glicitina e genistina podem ser utilizados para quantificar todas as formas conjugadas (KUDOU et al., 1991; BARNES et al., 1994; BERHOW, 2002). Atualmente, o teor de isoflavonas totais tem sido expresso como a soma da massa molar de todas as formas químicas, após a normalização

das diferenças de peso molecular (SONG et al., 1998; HOECK et al., 2000; BERHOW, 2002).

3.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A microscopia eletrônica constitui uma ferramenta importante na pesquisa de estruturas e organismos vivos e têm sido empregada para desvendar a morfologia dos componentes alimentares e em conjunto com outros métodos de análise, auxiliar na compreensão das alterações sofridas por estes componentes durante o processamento, pois conforme Aguilera & Stanley (1990), os diferentes métodos de processamento promovem a reestruturação e reorganização da microestrutura dos alimentos, alterando muitas vezes seu aspecto macroscópico e sua funcionalidade.

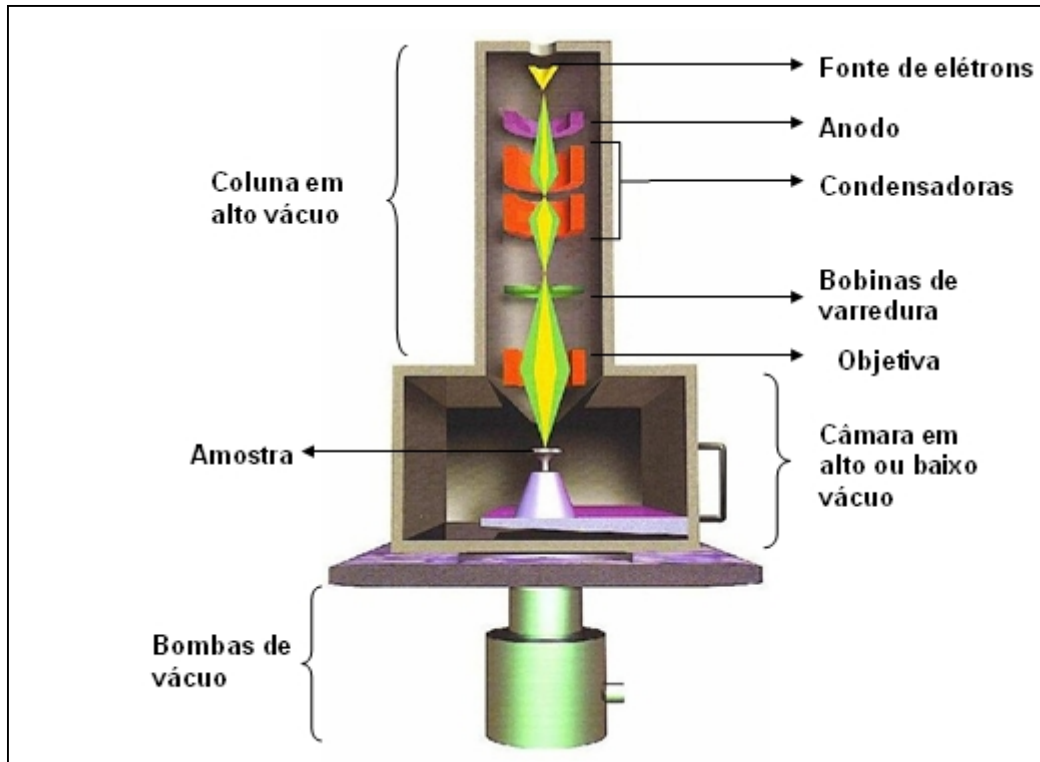
Conforme Galleti (2003), a microscopia eletrônica permite alcançar aumento superiores ao da microscopia ótica. Esta alta capacidade de resolução é devida ao curto comprimento de onda dos elétrons, cerca de 100.000 vezes menor que os comprimentos de onda da luz visível. Ao invés de usar lentes de vidro, os microscópios eletrônicos usam lentes eletromagnéticas, que são bobinas capazes de refletir o feixe de elétrons. Dois equipamentos, com princípios de funcionamento diferentes podem ser utilizados como instrumento da microscopia eletrônica: o microscópio eletrônico de transmissão (MET) e o microscópio eletrônico de varredura (MEV).

A microscopia eletrônica de varredura (MEV), consiste numa técnica para a visualização da superfície das amostras que devem estar secas ou podem estar congeladas abaixo de -80°C constituindo a *cryo*-MEV (PARK & ANTONIO, 2006). As amostras recebem uma camada de metal (ouro ou paládio) que funciona como um condutor elétrico para que a imagem possa ser formada. Imagens internas das amostras também podem ser visualizadas, desde que sejam fraturadas e expostas. Na microscopia eletrônica, para que os elétrons se propaguem em alta velocidade e possam atravessar as amostras, câmaras de alto vácuo são necessárias e as amostras devem, como pré-requisito, conter no máximo 10% de umidade (AGUILERA & STANLEY, 1990).

Devido a sua ampla faixa de magnificação (20 a 100.000 vezes), os MEV fornecem imagens das amostras com detalhes notáveis. Além de alta capacidade de resolução, devida ao curto comprimento de onda do feixe de elétrons, os MEV ainda possuem elevada

profundidade de campo (cerca de 500 vezes maior que o microscópio óptico), ou seja, permitem observar a imagem com aparência tridimensional (AGUILERA & STANLEY, 1990).

Nos microscópios eletrônicos de varredura, dentro do canhão ou coluna de alto vácuo, os elétrons são gerados a partir de um filamento termoionico de tungstênio por aplicação de corrente, e são acelerados por uma diferença de potencial entre cátodo e ânodo que varia de 0,3 a 30 keV. Este feixe de elétrons gerado passa por lentes condensadoras que reduzem o seu diâmetro e por uma lente objetiva que o focaliza sobre a amostra. Logo acima da lente objetiva existem dois estágios de bobinas eletromagnéticas responsáveis pela varredura do feixe sobre a amostra (Figura 8). Quando o feixe de elétrons incide na superfície da amostra, interage com ela e parte do feixe é refletida e coletada por um detector que converte este sinal em imagem de elétrons retroespalhados (BSE – *backscattering electrons*). Nesta interação com a superfície da amostra a imagem também pode ser formada pela emissão de elétrons secundários que se formam próximos à superfície da amostra (SE - *secondary electrons*) (AGUILERA & STANLEY, 1990).



Fonte: Instituto de Física, Universidade de São Paulo (www.fap01.if.usp.br).

Figura 8 – Componentes básicos de um microscópio eletrônico de varredura

Para a construção da imagem, o fluxo de informações entre o microscópio e o computador consiste na localização dos pontos de varredura no plano x, y , com o conjunto de intensidades correspondentes, originadas pelo detector de elétrons retroespalhados ou pelo detector de elétrons secundários, que estão localizados dentro da câmara de vácuo. Quando a amostra é varrida, a tela do display é varrida simultaneamente com correspondência de posições.

Devido a facilidade no preparo das amostras e a amplitude de conhecimento gerado pelas micrografias, a microscopia eletrônica de varredura constitui um método eficiente e amplamente utilizado na pesquisa estrutural de alimentos. Conforme Aguilera & Stanley (1990) a microscopia eletrônica de varredura pode ser utilizada na identificação de componentes presentes no alimento bem como a interação entre estes componentes. Nos alimentos à base de soja, as proteínas constituem o principal componente estrutural e a interação entre elas bem como com outros componentes podem modificar a microestrutura do alimento que irá se refletir em alterações macroscópicas e de funcionalidade.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Cultivares de Soja

Os grãos de soja utilizados neste trabalho foram fornecidos pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Centro Nacional de Pesquisa da Soja (Embrapa Soja). Foram utilizados grãos de duas cultivares distintas: IAS 5 e BRS 213. Grãos de soja da cultivar IAS 5 safra 2004, colhidos na região de Ponta Grossa, Paraná, (Latitude sul 25⁰05', altitude 975 m) foram analisados apenas quanto ao teor e distribuição de isoflavonas.

Grãos de soja da cultivar BRS 213 safras 2004 e 2005 foram utilizados para o tratamento hidrotérmico com diferentes volumes de água, em três repetições. Após o tratamento hidrotérmico, a farinha obtida a partir dos grãos da cultivar BRS 213 safra 2005 foram submetidos ao processo de extrusão termoplástica para obtenção de PTS. As farinhas de soja e PTS não tratadas e tratadas foram avaliadas conforme descrito no item 4.2.4.

4.1.2 PTS Comerciais

Quatro marcas comerciais de Proteína Texturizada de Soja foram adquiridos em mercados na cidade de Campinas–SP e avaliados quanto ao teor e distribuição de isoflavonas. Os produtos analisados foram das marcas: Natu's (Centro de Alimentos Naturais Ltda), Jasmine (Jasmine Comércio de Produtos Alimentícios Ltda), Vitao (Nutrhouse Alimentos Ltda) e Mais Vita (Yoki alimentos S. A.). Conforme especificado nos rótulos, as PTS Natu's, Jasmine, Vitao e Mais Vita apresentaram teor protéico de 51; 52; 50 e 51%, respectivamente.

4.1.3 Reagentes Analíticos

Os reagentes utilizados nas análises foram de grau analítico ou para cromatografia líquida. Padrões de daidzina, genistina e glicitina, *p*-NPG e *p*-NP foram obtidos da Sigma Chemicals Co. (St Louis, E.U.A.).

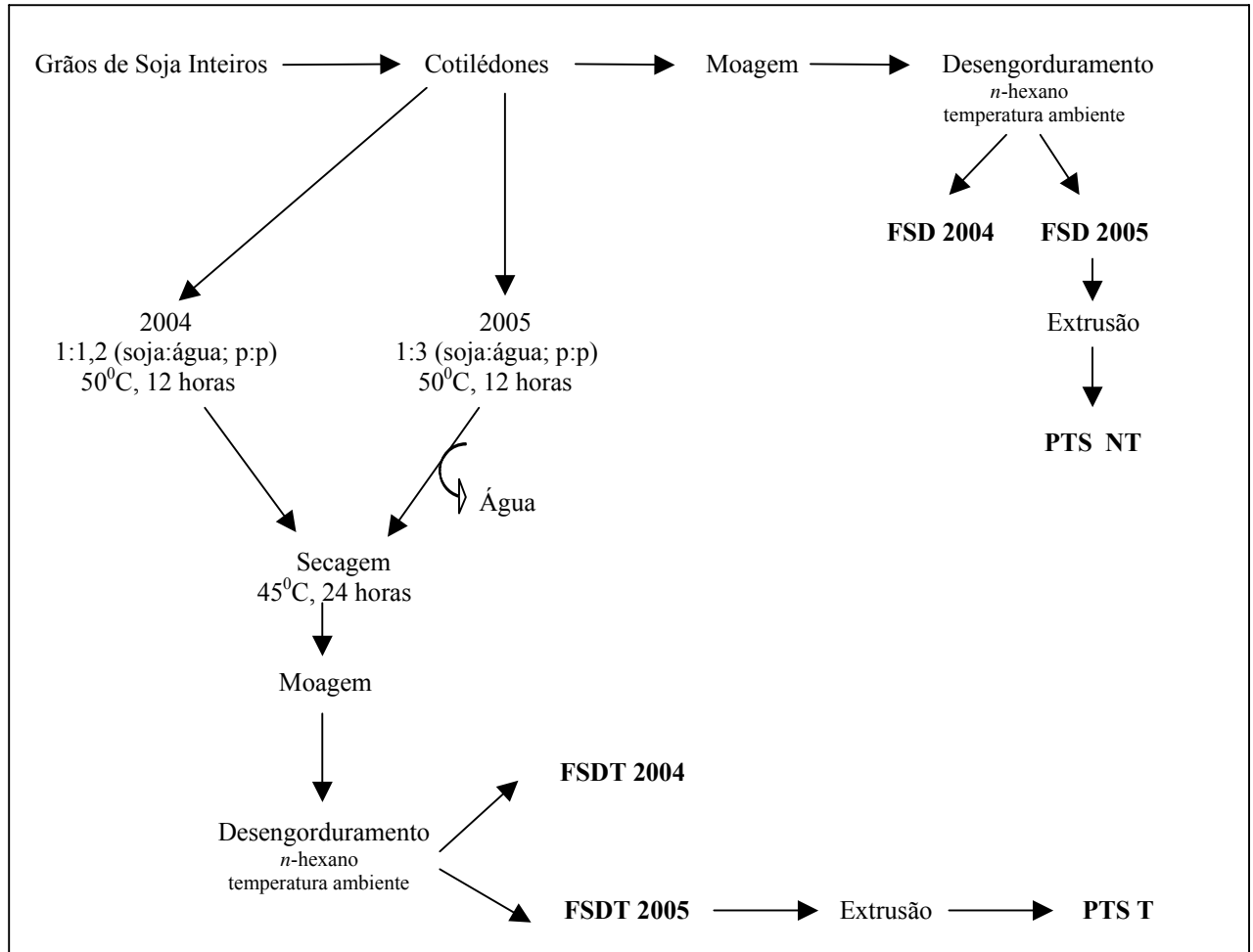
4.2 MÉTODOS

4.2.1 Tratamento Hidrotérmico

Grãos de soja da cultivar BRS 213 das safras 2004 e 2005 foram submetidos a descascamento, com a retirada do tegumento e do hipocótilo, restando apenas os cotilédones da soja. Parte dos cotilédones foi submetida à moagem (Moinho Perten Mod. Laboratory Mill 3100) e desengorduramento com *n*-hexano em temperatura ambiente (24⁰C), obtendo-se a farinha de soja desengordurada safra 2004 (FSD 2004) e farinha de soja desengordurada safra 2005 (FSD 2005) (Figura 9). O restante dos cotilédones foi submetido ao tratamento hidrotérmico com água deionizada em dois volumes diferentes: grãos da safra 2004 foram hidratados na proporção de 1:1,2 (p:p, soja:água) e grãos de soja da safra 2005 foram hidratados na proporção de 1:3 (p:p, soja:água). Os cotilédones foram mantidos a 50⁰C por 12 horas em sistema fechado, em seguida lavados com água deionizada em temperatura ambiente, escorridos e levados à estufa ventilada a 45⁰C por 24 horas. Após a secagem, os cotilédones foram moídos e desengordurados conforme descrito acima, obtendo-se as farinhas FSĐT 2004 (farinha de soja desengordurada tratada com volume reduzido de água, proveniente da safra 2004) e FSĐT 2005 (farinha de soja desengordurada tratada com volume maior de água, proveniente da safra 2005) (Figura 9). As farinhas obtidas, FSD 2004, FSD 2005, FSĐT 2004 e FSĐT 2005 foram analisadas quanto ao teor de isoflavonas, determinação da atividade enzimática da β-glicosidase e composição centesimal.

Uma alíquota de 10 mL da água de hidratação resultante do tratamento hidrotérmico realizado com volume maior de água foi retirada e concentrada em centrífuga a

vácuo (Eppendorf VacufugeTM) a 30°C até 500 µL, conforme metodologia descrita por Góes-Favoni (2002) para a análise e quantificação das isoflavonas na água de hidratação.



FSD 2004 = farinha de soja desengordurada safra 2004; **FSD 2005** = farinha de soja desengordurada safra 2005; **FSDT 2004** = farinha de soja desengordurada tratada com volume reduzido de água safra 2004; **FSDT 2005** = farinha de soja desengordurada tratada com volume de água maior safra 2005; **PTS NT** = proteína texturizada de soja obtida a partir da farinha de soja desengordurada safra 2005; **PTS T** = proteína texturizada de soja obtida a partir da farinha de soja desengordurada tratada, safra 2005.

Figura 9 – Fluxograma de obtenção das farinhas e proteínas texturizadas de soja

4.2.2 Processo de Extrusão das Farinhas de Soja

4.2.2.1 Condicionamento das farinhas de soja desengorduradas

As farinhas de soja provenientes de grãos da cultivar BRS 213 safra 2005, não tratada e tratada a 50⁰C por 12 horas, FSD 2005 e FSDT 2005, respectivamente, foram condicionadas para o processo de extrusão termoplástica para teor de umidade de 23% de acordo com metodologia descrita por Machado (1993). A água foi adicionada gota a gota com auxílio de uma bureta, sendo misturada manualmente. Após a adição de todo o volume de água calculado para atingir a umidade final, as farinhas foram passadas por uma peneira com abertura de 16 mesh e os grumos de farinha restantes foram batidos em liquidificador, novamente peneirados, e re-integrados à amostra, sendo estas então acondicionadas em sacos plásticos e mantidas sob refrigeração *overnight*, para que ocorresse melhor distribuição da umidade.

Antes do início do processo de extrusão, as farinhas foram deixadas em temperatura ambiente e então verificado seu teor de umidade e este estando em 23% as amostras foram novamente peneiradas e submetidas a extrusão. Porém, se o teor de umidade da amostra não manteve-se em 23%, as amostras foram submetidas a um novo condicionamento.

4.2.2.2 Teste de alimentação do extrusor

Foram realizados testes de alimentação do extrusor visando um ajuste ótimo da velocidade do parafuso do alimentador em relação à umidade das amostras, buscando a obtenção de uma taxa de alimentação adequada, para evitar a compactação ou enchimento incompleto do extrusor. Os testes foram desenvolvidos nas rotações de 30, 40, 42, 45 e 50 rpm e a rotação escolhida para o alimentador do extrusor foi de 42 rpm (70g/minuto).

4.2.2.3 Extrusão termoplástica das farinhas de soja

O processo de extrusão termoplástica foi desenvolvido em um extrusor de rosca simples Brabender, modelo GNF 1014/2, apresentando três zonas de aquecimento. O aquecimento foi realizado por resistências elétricas e o controle da temperatura por termopares.

Foram utilizadas as seguintes condições de extrusão: umidade das farinhas 23%; diâmetro da matriz 3,5 mm; taxa de compressão do parafuso 3:1; velocidade do parafuso 120 rpm; rotação do alimentador 42 rpm. A temperatura da zona de alimentação foi de 70⁰C. Nas zonas de transição e de cozimento empregou-se 140 e 150⁰C, respectivamente.

As PTS obtidas foram denominadas PTS não tratada (PTS NT) àquela obtida a partir de farinha de soja desengordurada não tratada safra 2005 e PTS tratada (PTS T) àquela obtida a partir de farinha de soja desengordurada proveniente de grãos tratados a 50⁰C por 12 horas safra 2005 (Figura 9).

As PTS foram mantidas em temperatura ambiente por 24 horas e após a determinação da umidade foram acondicionadas em sacos plásticos e mantidas em temperatura ambiente até as análises.

Amostras de aproximadamente 2,0 cm de comprimento foram selecionadas para o teste de re-hidratação e razão de expansão e aproximadamente 50 g foram moídos em moinho Retsch (modelo ZM 100) para a determinação do teor de isoflavonas, atividade enzimática da β -glicosidase e composição centesimal.

4.2.3 Influência da β -Glicosidase Sobre as Isoflavonas: Teste de Inibição Enzimática

Para avaliar a influência da enzima β -glicosidase sobre o teor de isoflavonas, foi conduzido um experimento de inibição da enzima através da adição do inibidor sintético glucona- δ -lactona (0,5%; soja:inibidor; p:p), conforme metodologia proposta por Araújo et al. (1997).

Dez gramas de grãos de soja inteiros da cultivar BRS 213 safra 2004 colhidos na região de Ponta Grossa, Paraná, Brasil, foram hidratados com 30 mL de água deionizada e mantidos a 50⁰C por 12 horas, constituindo o experimento Sem Inibidor. Para o

teste de inibição enzimática, 10 g de grãos de soja foram hidratados com 30 mL de água deionizada contendo 0,5% de glucona- δ -lactona (soja:inibidor; p:p), e mantidos a 50⁰C por 12 horas, constituindo o experimento Com Inibidor. Em seguida os grãos de soja dos dois experimentos, Sem e Com Inibidor, foram drenados e lavados com água deionizada em temperatura ambiente, escorridos e levados a estufa ventilada a 30⁰C por 24 horas. Após a secagem, os grãos de soja foram moídos (Moinho Retsch Modelo ZM 100) e as farinhas obtidas mantidas a 7⁰C para as análises de isoflavonas e da atividade enzimática. A água proveniente da hidratação dos grãos foi resfriada em temperatura ambiente e imediatamente utilizada na determinação da atividade da enzima β -glicosidase.

4.2.4 Análises nas Farinhas de Soja e PTS

4.2.4.1 capacidade de absorção de água (CAA)

As farinhas de soja desengorduradas não tratadas e tratadas foram avaliadas quanto a capacidade de absorção de água (CAA). A análise foi realizada a partir de uma suspensão de 2,5 g de farinha de soja em 30 mL de água destilada a 30⁰C, em tubos de centrifuga, previamente pesados. Os tubos foram agitados de forma intermitente durante 30 minutos em mesa agitadora Marconi MA830/A, com velocidade de 70 rpm e centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante de cada tubo foi descartado e o sedimento úmido pesado. A CAA foi obtida através da razão entre o peso do sedimento úmido e o peso da matéria seca, e expresso em gramas de água absorvida / gramas de matéria seca. As análises foram realizadas em três repetições.

4.2.4.2 determinação da razão de expansão (RE)

A razão de expansão do material extrusado foi calculada como o diâmetro do material extrusado dividido pelo diâmetro da matriz do extrusor, em dez repetições.

4.2.4.3 determinação da capacidade de re-hidratação (CRH)

A capacidade de re-hidratação foi realizada tomando-se as amostras das PTS e mantendo-as sob hidratação em água a 60⁰C por 20 minutos. Decorrido o tempo, a água foi drenada e o material hidratado pesado. A capacidade de re-hidratação (CRH) foi calculada como o peso do material hidratado pelo peso do material seco multiplicado por 100. Foram realizadas dez repetições.

4.2.4.4 determinação de isoflavonas

As farinhas provenientes de grãos de soja inteiros, dos cotilédones não tratados e tratados bem como as farinhas obtidas após a moagem das PTS e a água proveniente da hidratação dos cotilédones de soja foram avaliadas quanto ao teor e distribuição de isoflavonas.

A extração de isoflavonas foi realizada a partir de 100 mg de amostra adicionada de 4,0 mL de etanol 70% contendo 0,1% de ácido acético, por 1 hora a temperatura ambiente sob agitação constante a 250 rpm, conforme metodologia descrita por Carrão-Panizzi et al. (2002). A separação e quantificação das isoflavonas foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) (Waters, Milford, E.U.A.) equipado com coluna de fase reversa (YMC Pack ODS-AM, 250 mm x 0,4 mm de diâmetro) e detector de arranjo de diodo (Waters 996) ajustado para o comprimento de onda de 260 nm. A fase móvel constituiu um gradiente linear binário de metanol contendo 0,025% de ácido trifluoacético (TFA) (Solvente A) e água destilada deionizada ultrapura contendo 0,025% de TFA (Solvente B) num fluxo de 1mL/min. A condição inicial do gradiente foi de 20% para o solvente A, que aos 40 minutos atingiu a concentração de 100% para, em seguida, retornar a 20% aos 41 minutos e permanecer nestas condições até os 60 minutos.

O software para controle do equipamento e aquisição dos dados foi o Millennium 32 (versão 3.05.01). A pureza dos padrões de daidzina, glicitina e genistina foi determinada através de curvas de calibração obtidas em cinco concentrações (0,00625; 0,0125; 0,025; 0,05 e 0,1 mg/mL) (Figura 10). Uma alta linearidade foi obtida em cada curva ($r^2 > 0,98$) (Tabela 2). A identificação de cada composto foi realizada por comparação com

espectro e tempo de retenção, e a quantificação por integração da área dos picos e padronização externa usando padrões de referência, conforme metodologia descrita por Berhow (2002). Os resultados foram expressos em base seca (mg/100g) ou em μMol após normalização das diferenças de peso molecular das formas glicosiladas, usando as seguintes massas moleculares: daidzina = 416,36; malonil daidzina = 502,41; acetil daidzina = 458,40; daidzeína = 254,23; genistina = 432,37; malonil genistina = 518,41; acetil genistina = 474,40; genisteína = 270,23; glicitina = 446,41; malonil glicitina = 532,46; acetil glicitina = 488,45; gliciteína = 284,27, conforme sugerido por Hoeck et al. (2000).

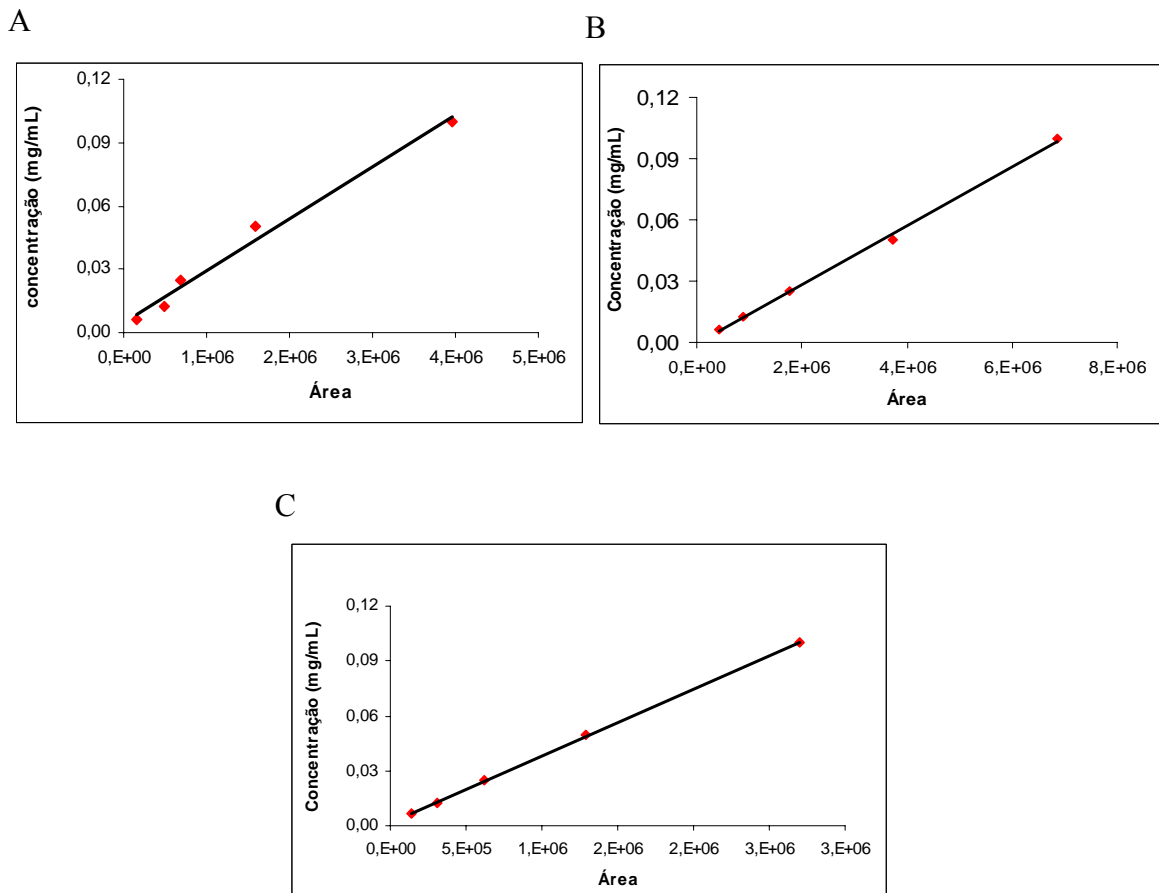


Figura 10 – Curvas de Calibração dos β -glicosídeos [A] Daidzina, [B] Glicitina e [C] Genistina

Tabela 2 – Equações e linearidades obtidas a partir das curvas de calibração dos β -glicosídeos daidzina, glicitina e genistina

Padrão	Equação
Daidzina	$y = 2E - 08x + 0,0048$ $r^2 = 0,9869$
Glicitina	$y = 4E - 08x + 0,0017$ $r^2 = 0,9996$
Genistina	$y = 1E - 08x + 0,0009$ $r^2 = 0,9979$

4.2.4.5 determinação da atividade da enzima β -glicosidase

As farinhas de soja e PTS não tratadas e tratadas bem como a água proveniente da hidratação dos cotilédones de soja foram avaliadas quanto a atividade da enzima β -Glicosidase.

Em 100 mg de amostra foi adicionado 1,5 mL de tampão citrato 0,05 M (pH 4,5) contendo NaCl 0,1 M, e mantidos 1 hora em temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas e o sobrenadante usado como solução de enzima para a determinação da atividade enzimática. Dois mililitros do substrato *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo (*p*-NPG) 1 mM (Sigma Chemical Co., St. Louis, E.U.A.) em solução tampão de fosfato citrato 0,1 M pH 5,0 foram transferidos para tubos de ensaio e mantidos em banho-Maria a 30⁰C por 10 minutos. Em seguida, 0,5 mL da solução de enzima foi adicionada ao substrato e mantidos a 30⁰C por 30 minutos. A reação foi interrompida adicionando-se 2,5 mL de carbonato de sódio 0,5 M e imediatamente medida em espectrofotômetro (Cecil Instruments, England, Mod. 3000) a 420 nm contra o branco. Para determinação da atividade enzimática na água de hidratação, foram utilizados 0,5 mL da água após centrifugação, como solução de enzima. O branco foi composto por 2,5 mL da solução de carbonato de sódio 0,5 M, 2,0 mL da solução de substrato e 0,5 mL de tampão citrato 0,05 M (pH 4,5) contendo NaCl 0,1M.

O *para*-nitrofenol (*p*-NP) liberado pela ação da enzima foi determinado tomando-se como referência uma curva de calibração preparada a partir do *p*-NP (Sigma-Aldrich Co., St Louis, E.U.A.) em concentrações de 5 a 300 μ Mol, conforme Matsuura et al. (1989), cuja linearidade foi alta ($r^2 > 0,99$) (Figura 11). Uma unidade de atividade (UA) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ M de *p*-NP por minuto sob as condições do experimento. Os resultados foram expressos em níveis de atividade (UA/g de amostra em base seca ou UA/mL da água de hidratação).

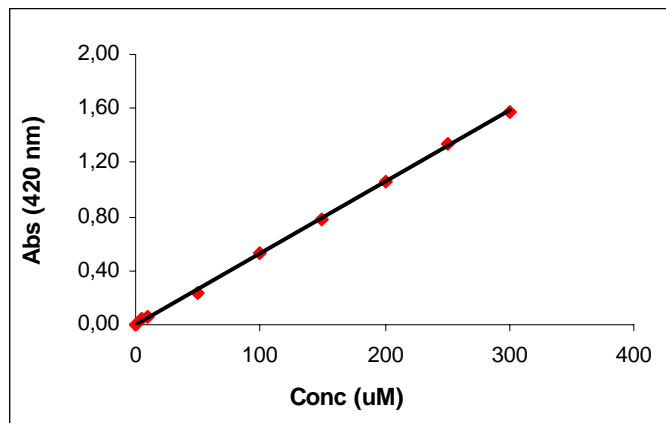


Figura 11 – Curva de calibração do *para*-nitrofenol

4.2.4.6 composição centesimal

As análises de umidade, proteínas (fator de correção= 6,25), lipídeos e cinzas nas farinhas e PTS não tratadas e tratadas foram realizadas conforme metodologias descritas pelo Instituto Adolfo Lutz (1985), em três repetições. O teor de compostos não nitrogenados (carboidratos totais) foi calculado por diferença dos demais constituintes.

4.2.4.7 microscopia eletrônica de varredura

As amostras de farinhas de soja e PTS não tratadas e tratadas foram fixadas em suporte de alumínio (“stubs”), com fita de carbono com adesivo em dupla face. As

amostras foram então recobertas com ouro em metalizador BAL-TEC SCD 050 Sputter Coater em camadas de 20 nm e fotografadas em Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta 200 (FEI) Philips, sob tensão de 20 keV.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados pela técnica de análise de variância (ANAVA) e os tratamentos foram comparados pelo teste de Tukey, com o uso dos sistemas SAS e SANEST (ZONTA et al., 1982). O uso da ANAVA pressupõe que os resíduos resultantes do modelo adotado são aleatórios e normalmente distribuídos, e ainda, que as variâncias dos tratamentos são homogêneas e os efeitos considerados no modelo, influenciando as variáveis medidas, são aditivos. Para a verificação destas pressuposições utilizou-se, respectivamente, o gráfico das variáveis preditas versus resíduos, o teste de Shapiro & Wilk (1965), teste de Burr & Foster (1972) e de Tukey (1949).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 TEOR E COMPOSIÇÃO DE ISOFLAVONAS EM GRÃOS DE SOJA

Grãos de soja das cultivares IAS 5 e BRS 213 da safra 2004 e BRS 213 da safra 2005 colhidos na região de Ponta Grossa, Paraná, apresentaram diferenças significativas quanto ao teor de isoflavonas: 198,0, 136,8 e 121,0 mg/100g, respectivamente (Figura 12). A diferença observada entre as cultivares IAS 5 e BRS 213, ambas da safra 2004, se deve à diferenças genéticas das cultivares, pois conforme Tsukamoto et al. (1995), a concentração de isoflavonas nos grãos de soja é geneticamente controlada e influenciada pelas condições ambientais. Carrão-Panizzi et al. (1996b) analisaram 100 cultivares comerciais de soja de ciclo de maturação precoce, semi-precoce, médio e tardio semeadas na safra 1994 em Londrina, Paraná, e observaram diferenças significativas quanto ao teor de isoflavonas que variaram de 16,8 mg/100g (EMBRAPA-20) a 172,9 mg/100g (FT-Canarana), e atribuíram estas diferenças às características genéticas das cultivares. Ao avaliar o teor de isoflavonas em 15 cultivares de soja, Carrão-Panizzi et al. (1998) classificaram a cultivar IAS 5 como genótipo de alto teor de isoflavonas (acima de 150 mg/100g). A BRS 213, que apresenta teor médio de isoflavonas (75 a 150 mg/100g), é considerada uma cultivar especial, recomendada para a alimentação humana, pois não apresenta as isoenzimas lipoxigenases L1, L2 e L3, responsáveis pelo desenvolvimento de sabor desagradável nos alimentos à base de soja (CARRÃO-PANIZZI et al., 2002).

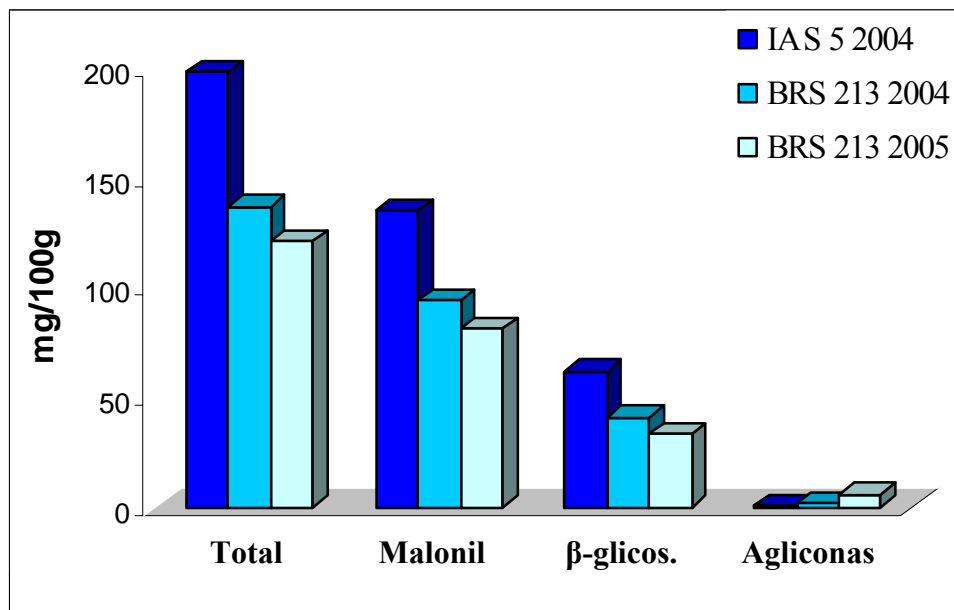


Figura 12 – Teor de isoflavonas (mg/100g) em grãos de soja colhidos na região de Ponta Grossa, Paraná. β-glic = β-glicosídeos

A diferença de concentração de isoflavonas encontrada na cultivar BRS 213 entre as safras 2004 e 2005, pode ter ocorrido em função da diferença de temperatura ambiental: durante a safra 2004, a temperatura média registrada na região de Ponta Grossa foi de 20,4^oC, enquanto na safra 2005 a temperatura foi de 21,7^oC (Figura 12). Segundo Tsukamoto et al. (1995), além do controle genético, as condições ambientais, sobretudo a temperatura, têm influência sobre o teor de isoflavonas. Carrão-Panizzi et al. (1999), analisaram soja semeada em regiões com temperaturas médias diferentes: a 20^oC observaram concentração de isoflavonas de 155,6 mg/100g (FT-Abyara) e 196,0 mg/100g (IAS 5) e, quando semeadas em regiões com temperatura média de 25^oC a concentração foi menor: 96,3 e 93,2 mg/100g, respectivamente. Eldridge & Kwolek (1983) detectaram diferenças no teor de isoflavonas totais variando de 245,2 a 362,5 mg/100g quando a cultivar Clark foi semeada em Urbana, IL, EUA, nos anos de 1975, 1976, 1978 e 1979, evidenciando a influência das condições climáticas e ambientais sobre as isoflavonas.

Além das diferenças observadas no teor total de isoflavonas nas cultivares analisadas, o teor das formas conjugadas e das agliconas variou na mesma proporção, sendo os conjugados malonil os principais compostos, seguidos pelos conjugados β-glicosídeos e agliconas (Figura 12). Em grãos de soja e alimentos minimamente processados derivados de

soja, os conjugados malonil e β -glicosídeos representam em média, 90% do total de isoflavonas (MURPHY et al., 2002).

5.2 INFLUÊNCIA DO PROCESSAMENTO SOBRE O TEOR E COMPOSIÇÃO DE ISOFLAVONAS EM GRÃOS DE SOJA

5.2.1 Influência do Tratamento Hidrotérmico

Grãos da cultivar BRS 213 das safras 2004 e 2005 foram submetidos a descascamento e desengorduramento para obtenção de farinha de soja desengordurada que constituiu a matéria-prima para a obtenção de PTS (Figura 9). Após a retirada do tegumento o teor de isoflavonas diminuiu passando de 136,8 e 121,0 mg/100g nos grãos de soja, para 119,1 e 100,7 mg/100g nos cotilédones das safras 2004 e 2005, com redução de 13 e 17% pela eliminação do hipocótilo, respectivamente (Tabelas 3 e 4). Durante o descascamento os hipocótilos são eliminados juntamente com a casca fazendo com que o teor de isoflavonas totais seja menor, pois segundo Tsukamoto et al. (1995), isoflavonas não estão presentes no tegumento das sementes ou estão presentes apenas em quantidades traço, mas de 10 a 20% das isoflavonas do grão de soja estão concentradas no hipocótilo.

Tabela 3 – Isoflavonas em grãos de soja (mg/100g) da cultivar BRS 213 safra 2004 submetidos a descascamento, moagem, desengorduramento e tratamento hidrotérmico a 50⁰C por 12 horas (1:1,2; soja:água; p:p)

	β-Glicosídeos			Malonil			Agliconas			Total
	Din	Gly	Gin	Din	Gly	Gin	Dein	Glein	Gein	
Grão	15,3 b ± 0,50	7,5 ± 0,42	18,1 c ± 1,15	39,0 a ± 0,23	12,6 a ± 1,44	42,3 b ± 2,42	1,4 c ± 0,03	ND	0,6 b ± 0,01	136,8 a ± 2,16
Cotilédones	17,6 a ± 0,30	ND*	19,7 b ± 1,39	40,2 a ± 0,77	ND	41,6 b ± 1,22	ND	ND	ND	119,1 b ± 1,17
Cotilédones Moídos	17,6 a ± 0,30	ND	19,7 b ± 1,39	40,2 a ± 0,77	ND	41,6 b ± 1,22	ND	ND	ND	119,1 b ± 1,17
Cotilédones Moídos Desengordurados (FSD 2004)	17,3 a ± 0,73	ND	20,5 a ± 1,21	39,5 a ± 0,34	ND	43,7 a ± 1,20	0,8 d ± 0,16	ND	ND	121,8 c ± 2,10
Cotilédones Tratados	11,2 c ± 0,09	ND	17,7 c ± 0,23	25,4 b ± 0,46	ND	29,5 c ± 0,52	5,0 b ± 0,04	ND	8,3 a ± 0,15	97,1 d ± 2,05
Cotilédones Tratados Desengordurados (FSDT 2004)	12,1 c ± 0,88	ND	16,5 d ± 0,19	26,1 b ± 0,18	ND	28,6 d ± 1,30	6,1 a ± 0,05	ND	8,4 a ± 0,44	97,8 d ± 1,23

Médias (± desvio padrão) de três repetições em base seca.

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem entre si (Tukey p≤0,05).

*ND=Não Detectado.

Din=Daidzina; Gly=Glicitina; Gin=Genistina; Dein=Daidzeína; Glein= Gliciteína; Gein=Genisteína.

Tabela 4 – Isoflavonas em grãos de soja (mg/100g) da cultivar BRS 213 safra 2005 submetidos a descascamento, moagem, desengorduramento, tratamento hidrotérmico a 50⁰C por 12 horas (1:3; soja:água; p:p) e na água proveniente da hidratação dos cotilédones (mg/100mL)

	β-Glicosídeos			Malonil			Agliconas			Total
	Din	Gly	Gin	Din	Gly	Gin	Dein	Glein	Gein	
Grão	12,6 a ± 0,38	4,9 ± 0,16	16,1 ab ± 0,45	34,0 a ± 0,17	8,3 ± 0,37	39,3 a ± 1,26	3,2 c ± 0,08	ND	2,6 c ± 0,10	121,0 a ± 0,53
Cotilédones	13,0 a ± 0,22	ND*	15,3 b ± 0,33	33,9 a ± 0,63	ND	36,7 b ± 1,19	1,0 e ± 0,11	ND	0,8 d ± 0,06	100,7 b ± 1,31
Cotilédones Moídos	13,0 b ± 0,49	ND	15,3 b ± 0,33	33,9 a ± 0,63	ND	36,7 b ± 0,31	1,0 e ± 0,11	ND	0,8 d ± 0,07	100,7 b ± 1,31
Cotilédones Moídos Desengordurados (FSD 2005)	11,2 b ± 0,49	ND	16,8 a ± 0,56	33,6 a ± 0,32	ND	36,5 b ± 0,31	1,5 d ± 0,33	ND	1,2 d ± 0,07	100,8 b ± 1,42
Cotilédones Tratados	2,8 c ± 0,27	ND	9,7 c ± 0,09	14,6 b ± 0,24	ND	21,3 c ± 0,16	7,2 b ± 0,12	ND	12,7 b ± 0,42	68,3 c ± 1,14
Cotilédones Tratados Desengordurados (FSDT 2005)	2,6 c ± 0,14	ND	9,4 c ± 0,05	14,3 b ± 0,17	ND	21,0 c ± 0,92	8,1 a ± 0,05	ND	13,4 a ± 0,05	68,8 c ± 0,98
Água de Hidratação	1,5	ND	3,9	1,2	ND	2,8	0,7	ND	1,8	11,9

Médias (± desvio padrão) de três repetições em base seca, nas farinhas e Média (± desvio padrão) de duas repetições na água de hidratação.

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem entre si (Tukey p≤0,05).

* ND=Não Detectado

Din=Daidzina; Gly=Glicitina; Gin=Genistina; Dein-Daidzeína; Glein= Gliciteína; Gein=Genisteína.

Parte dos cotilédones obtidos após o descascamento, foram submetidos à moagem e desengorduramento com *n*-hexano em temperatura ambiente, cujo teor de isoflavonas não sofreu alterações: 121,8 e 100,8 mg/100g nos cotilédones das safras 2004 e 2005 (FSD 2004 e FSD 2005), respectivamente (Tabelas 3 e 4). Segundo Coward et al. (1998), a moagem e a extração de óleo em temperatura ambiente não alteram o perfil quantitativo e qualitativo das isoflavonas.

Para os tratamentos hidrotérmicos, o restante dos cotilédones foi mantido em hidratação a 50⁰C por 12 horas em volumes de água diferentes: os cotilédones da safra 2004 foram hidratados com volume reduzido de água (1:1,2, soja:água, p:p) enquanto os cotilédones da safra 2005 foram hidratados com volume de água maior (1:3, soja:água, p:p). O volume de 1:1,2 foi selecionado por constituir o menor volume que possibilitou a imersão dos grãos durante todo o tempo de hidratação, enquanto o volume de 1:3 foi selecionado com base nos experimentos realizados por Góes-Favoni (2002).

Após os tratamentos hidrotérmicos os cotilédones foram secos, moídos e desengordurados, e o teor de isoflavonas totais passou para 97,8 e 68,8 mg/100g, nos cotilédones das safras 2004 (FSDT 2004) e 2005 (FSDT 2005), respectivamente (Tabelas 3 e 4). Esta redução no teor de isoflavonas totais ocorreu em função da lixiviação de isoflavonas para a água de hidratação, provavelmente em maior quantidade quando os cotilédones foram tratados com volume de água maior. Quando transformados por diferenças de peso molecular, observa-se que a massa molar total de isoflavonas diminuiu 12% nos cotilédones da safra 2004 (FSDT 2004) após a hidratação, passando de 2,5 para 2,2 μMol. Na FSDT 2005, a diminuição de isoflavonas totais após a hidratação com volume de água maior foi de 19%, passando de 2,1 para 1,7 μMol (Anexo A). Praticamente toda a água usada no tratamento dos cotilédones da safra 2004 foi absorvida e não foi possível investigar o teor de isoflavonas na água de hidratação. Porém, no tratamento hidrotérmico dos cotilédones da safra 2005, realizado com volume de água maior, a investigação da água de hidratação foi possível, uma vez que parte da água não foi absorvida pelos cotilédones. A análise realizada nesta água quantificou 11,9 mg/100mL de isoflavonas totais (Tabela 4), correspondendo 0,3 μMol, sendo 43% β-glicosídeos, 27% malonil e 30% agliconas (Anexo A).

Góes-Favoni (2002), ao analisar a água de hidratação em que grãos de soja inteiros foram mantidos por 24 horas a 50⁰C (1:3; soja:água; p:p), observou que cerca de 45% do total de isoflavonas originalmente contidas nos grãos de soja migraram para a água. Durante processamento de tempeh, Wang & Murphy (1996) observaram perdas de 12 e 49% de isoflavonas para a água durante hidratação e cozimento, respectivamente e observaram

quantidades insignificantes de isoflavonas no okara (resíduo insolúvel resultante do processamento de extrato de soja aquoso), sugerindo que isoflavonas podem estar associadas a componentes solúveis, provavelmente proteínas solúveis de soja.

Grün et al. (2001), avaliando a influência do processamento sobre as isoflavonas, observaram diminuição de 15 a 28% quando tofu foi submetido a cozimento em água em diferentes temperaturas (80, 90 e 100°C) por tempos diferentes (10, 20, 30 e 40 minutos) e concluíram que esta diminuição foi devido à lixiviação das isoflavonas para a água e que as perdas aumentaram com o aumento do tempo e da temperatura de cozimento. Conforme Wang & Murphy (1996) a elevação da temperatura durante a hidratação provoca aumento da velocidade de lixiviação das isoflavonas, principalmente se os grãos de soja estiverem descascados.

Quanto as formas conjugadas, ocorreram pequenas alterações após o desengorduramento, mas mudanças significativas ocorreram após o descascamento e o tratamento hidrotérmico. As formas malonil e β -glicosídeos corresponderam a 97 e 91% da massa molar de isoflavonas nos grãos soja das safras 2004 e 2005, sendo os conjugados malonil os principais compostos: 1,8 e 1,6 μMol , correspondendo a 64 e 61%, respectivamente (Anexo A). Murphy et al. (2002) ao testar diferentes solventes para a extração de isoflavonas em alimentos derivados de soja observaram que em farinha de soja os conjugados malonil e β -glicosídeos corresponderam, em média, a 90% da massa molar de isoflavonas.

Nos cotilédones hidratados a 50°C por 12 horas, a concentração dos conjugados malonil diminuiu passando a 1,1 μMol na FSDT 2004, tratada com volume de água reduzido, e 0,7 μMol na FSDT 2005, tratada com volume de água maior (Anexo A). A redução dos conjugados malonil, em parte ocorreu em função de sua transformação em β -glicosídeos, pois segundo Barnes et al. (1994), os conjugados malonil são termicamente instáveis e suas ligações éster podem ser clivadas dando origem aos respectivos β -glicosídeos. Estes autores realizaram experimentos para extração de isoflavonas em diferentes alimentos derivados de soja e observaram que a conversão de conjugados malonil em β -glicosídeos foi tempo e temperatura dependentes.

Conforme Chien et al. (2005) a forma de aquecimento empregada durante o processamento de grãos de soja tem influência significativa na conversão dos isômeros. Quando padrão de malonil genistina purificado (50 $\mu\text{g/mL}$) foi submetido a aquecimento seco (150°C) por 15 minutos, formou em maior quantidade acetil genistina e genistina, com

aumento destes compostos para 12,6 e 7,6 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Sob calor úmido a 150°C , entretanto, houve maior formação de genistina (15,0 $\mu\text{g/mL}$) que acetil genistina (7,8 $\mu\text{g/mL}$). Estes pesquisadores observaram também que a 100°C padrão purificado de malonil genistina pode ser degradado, evidenciando sua maior susceptibilidade a ação do calor que as demais formas químicas. Rostagno et al. (2005), estudaram a estabilidade térmica das isoflavonas a 25°C e 40°C , e observaram que a razão de conversão de malonil genistina, malonil daidzina e malonil glicitina em seus respectivos β -glicosídeos foi duas vezes maior quando estocados por sete dias a 40°C (0,236, 0,038 e 0,021 $\mu\text{Mol/h}$, respectivamente) que a 25°C (0,117, 0,018 e 0,010 $\mu\text{Mol/h}$, respectivamente) havendo aumento correspondente de genistina, daidzina e glicitina, enquanto o teor de isoflavonas totais permaneceu inalterado, comprovando que a diminuição no teor dos conjugados malonil, nas condições avaliadas, ocorreu exclusivamente devido à sua conversão em β -glicosídeos.

Góes-Favoni et al. (2004b) analisaram diferentes alimentos à base de soja disponíveis comercialmente e observaram que farinhas de soja obtidas a partir da mesma cultivar e mesmas condições ambientais durante o desenvolvimento dos grãos, mas submetidas a tratamentos térmicos durante sua produção, apresentaram teor de conjugados malonil menor (80,0 mg/100g, em média) que na farinha sem tratamento térmico (147,8 mg/100g), enquanto o teor de conjugados β -glicosídeos e agliconas aumentaram de 25,8 para 48,9 mg/100g, respectivamente.

Considerando a instabilidade térmica dos conjugados malonil, o teor de β -glicosídeos deveria aumentar durante o tratamento hidrotérmico, entretanto foi observada diminuição desses compostos que passaram de 0,9 μMol para 0,7 μMol na FSDT 2004, tratada com volume de água reduzido, e de 0,7 μMol para 0,3 μMol na FSDT 2005, tratada com volume de água maior (Anexo A). Esta redução de β -glicosídeos ocorreu, em parte, devido à sua conversão em agliconas numa reação catalisada por enzimas β -glicosidases endógenas da soja. Segundo Matsuura et al. (1989), β -glicosidases endógenas da soja, sob condições ideais de temperatura e pH (50°C , 6,0), são capazes de hidrolisar a ligação glicosídica existente entre a aglicona e a glucose que compõe o β -glicosídeo, liberando glucose e resultando num aumento de agliconas. Além da transformação de β -glicosídeos em agliconas, outro fato que contribuiu para a diminuição destes compostos após a hidratação, foi sua lixiviação para água correspondendo a 5% do total de isoflavonas originalmente contidas nos cotilédones de soja da safra 2005 (Tabela 4).

As agliconas que inicialmente nos grãos de soja inteiros quantificaram 2,0 e 5,8 mg/100g correspondendo a 2,5 e 8,5% da massa molar total de isoflavonas nos grãos das safras 2004 e 2005, respectivamente, foram reduzidas após o descascamento em função da retirada do hipocótilo, desaparecendo dos cotilédones da safra 2004 e reduzidos a 3% da massa molar de isoflavonas nos cotilédones da safra 2005 (Tabelas 3 e 4, Anexo A).

Após o tratamento hidrotérmico o teor de agliconas, não detectado nos cotilédones não hidratados, passou para 0,5 μMol na FSDT 2004, tratados com volume de água reduzido, e de 0,1 μMol para 0,7 μMol na FSDT 2005, tratados com volume de água maior (Anexo A). Este aumento no teor de agliconas se deve a ação das β -glicosidases endógenas da soja sobre os β -glicosídeos, pois apesar das evidências de que conjugados malonil possam ser convertidos diretamente a agliconas (CHIEN et al., 2005), isto ocorre em temperaturas elevadas (200°C), não sendo provável que aconteça na temperatura utilizada neste trabalho. Toda et al. (2001), observaram aumento no teor de agliconas de 4,0 para 13,1% do total de isoflavonas em grãos de soja (cultivar Tamahomare) mantidos em hidratação por 20 horas a 15°C . Estes autores também observaram diminuição do teor de β -glicosídeos de 34,2 para 27,5% do total de isoflavonas e, embora β -glicosidases da soja apresentem atividade máxima à 50°C (MATSUURA et al., 1989), estas alterações foram atribuídas à hidrólise enzimática durante a hidratação.

Embora o aumento de agliconas tenha ocorrido nos dois tratamentos, considerando a concentração inicial destes compostos (0,0 e 1,8 mg/100g nos cotilédones da safra 2004 e 2005, respectivamente), maior aumento no teor de agliconas foi alcançado após o tratamento hidrotérmico com menor volume de água: 14,5 e 21,5 mg/100g, respectivamente, possivelmente pela menor lixiviação de isoflavonas para a água (Tabelas 3 e 4). Uma vez que o teor inicial de agliconas foi maior nos cotilédones da safra 2005, a FSDT 2005 apresentou 1,5 vezes mais agliconas que a FSDT 2004. Assim, a seleção de cultivares com maior teor inicial de agliconas, associada ao tratamento hidrotérmico com volume de água reduzido, pode conduzir a obtenção de produto final com maior teor destes compostos.

Murphy et al. (2002), ao analisar diferentes alimentos à base de soja observaram que em tofu as agliconas correspondem a 37% da massa molar total de isoflavonas, enquanto em farinhas de soja as agliconas correspondem a apenas 1,6%. O alto teor de agliconas em tofu é atribuído à ação de β -glicosidases endógenas da soja, ativadas durante a hidratação dos grãos para a obtenção do extrato de soja (KAO et al., 2004). Entretanto, as etapas de hidratação e coagulação durante o processamento dos grãos de soja

para obtenção de tofu provocam perdas de isoflavonas para a água e soro, fazendo com que o teor de isoflavonas totais seja menor que em farinhas de soja (WANG & MURPHY, 1996). COWARD et al. (1998), ao analisar produtos à base de soja disponíveis comercialmente quantificaram 180,7 mg/100g de isoflavonas totais em farinha de soja integral e 32,3 mg/100g em tofu, considerando que farinhas de soja contém, em média, 40% de proteína enquanto tofu, segundo Kao et al. (2004) apresenta 6,8% de proteínas. Atualmente preconiza-se que a ingestão diária de 25 g de proteínas de soja associadas à cerca de 30 a 50 mg de isoflavonas são capazes de diminuir o colesterol sérico (SETCHELL, 1998).

Considerando que as farinhas de soja desengorduradas tratadas (FSDT 2004 e FSDT 2005) apresentam, em média, 47% de proteínas (Tabelas 7 e 8), o consumo diário de 53 g destas farinhas contribuiria com 25 g de proteína e 52 mg de isoflavonas totais se fosse utilizada a farinha obtida a partir de tratamento com volume de água reduzido (FSDT 2004) e com 36 mg se fosse utilizada a farinha obtida a partir de cotilédones tratados com volume de água maior (FSDT 2005), uma vez que o teor de isoflavonas totais foi inicialmente maior nos cotilédones da safra 2004 (119,1 mg/100g) que nos cotilédones da safra 2005 (100,7 mg/100g).

5.2.2 Influência da Extrusão Termoplástica

As farinhas de soja desengorduradas obtidas a partir de cotilédones de soja não tratados (FSD 2005) e tratados a 50⁰C por 12 horas (FSDT 2005) provenientes da safra 2005, constituíram a matéria-prima para obtenção de Proteína Texturizada de Soja (PTS). Neste trabalho, não se buscou a otimização do processo, mas avaliar a influência da extrusão sobre o teor e composição de isoflavonas durante a obtenção de PTS com maior teor de agliconas.

As PTS provenientes da extrusão das farinhas não tratada (FSD 2005) e tratada (FSDT 2005) não apresentaram diferenças na massa molar total de isoflavonas após a extrusão, mantendo-se em 2,1 e 1,8 μ Mol nas PTS não tratada e tratada, respectivamente (Anexo B). Resultados semelhantes foram observados por Singletary et al. (2000) quando realizaram experimentos de extrusão com concentrados protéicos de soja isoladamente ou em misturas com farinha de milho. Quando concentrado protéico foi extrusado isoladamente, estes pesquisadores observaram diminuição de 9% no teor total de isoflavonas, não diferindo

significativamente do concentrado de soja não extrusado. Porém, quando concentrado protéico de soja foi misturado à farinha de milho na proporção de 80% milho e 20% soja, o teor total de isoflavonas diminuiu 38%. Conforme Wang & Murphy (1994b) a adição de ingredientes que não contém isoflavonas promove a diluição destes constituintes levando a menor concentração de isoflavonas.

Tabela 5 – Teor de isoflavonas (mg/100g) nas farinhas de soja e PTS não tratadas e tratadas

	B-Glicosídeos	Malonil	Acetil	Agliconas
Farinha de Soja Não tratada (FSD 2005)	28,0 b	70,1 a	ND*	2,7 c
	± 0,52	± 0,50		± 0,14
PTS Não Tratada	34,9 a	28,1 c	28,5 a	2,9 c
	± 3,07	± 0,89	± 1,89	± 0,45
Farinha de Soja Tratada (FSDT 2005)	12,0 c	35,3 b	ND	21,5 b
	± 1,17	± 0,08		± 0,08
PTS Tratada	15,2 d	7,7 d	14,3 b	25,2 a
	± 1,56	± 0,70	± 1,80	± 1,91

Médias (\pm desvio padrão) de três repetições em base seca.

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey $p \leq 0,05$.

*ND = Não Detectado

Ao avaliar a influência da extrusão sobre a distribuição das isoflavonas, observa-se que o teor de conjugados malonil diminuiu 60 e 78% nas PTS não tratada e tratada, respectivamente, enquanto conjugados acetil que não haviam sido detectados passaram a constituir 30 e 23% do total de isoflavonas, respectivamente (Tabela 5). Resultados semelhantes foram obtidos por Coward et al. (1998) que analisaram PTS comercial e quantificaram 30% do total de isoflavonas como acetil glicosídeos. Segundo Barnes et al. (1994) os conjugados malonil são termicamente instáveis e podem sofrer reações de de-esterificação e ou descarboxilação e dar origem aos acetil e β -glicosídeos, respectivamente.

Quanto aos conjugados β -glicosídeos, o teor aumentou passando de 28,0 para 34,9 mg/100g e de 12,0 para 15,2 mg/100g, nas PTS obtidas a partir das farinhas de soja não tratadas e tratadas (FSD 2005 e FSDT 2005), respectivamente, sendo os β -glicosídeos os

principais compostos de isoflavonas na PTS não tratada (Tabela 5). Wang & Murphy (1994b) quantificaram isoflavonas em diferentes alimentos comerciais à base de soja e observaram que em PTS os β -glicosídeos daidzina e genistina constituíram as principais formas químicas, representando 49% do total de isoflavonas, seguidos por acetil (29%), malonil (19%) e agliconas (3%). Góes-Favoni et al. (2004b) quantificaram isoflavonas em PTS comerciais e obtiveram resultados semelhantes: β -glicosídeos > malonil > agliconas. Estes pesquisadores não quantificaram os conjugados acetil. Na PTS tratada, porém, as agliconas constituíram as principais formas químicas, correspondendo a 40% do total de isoflavonas (Tabela 5).

Quando transformados por diferenças de peso molecular, observa-se uma relação equimolar na conversão dos conjugados malonil em acetil e β -glicosídeos na PTS obtida a partir da farinha de soja não tratada (FSD 2005). Nesta farinha os conjugados malonil e β -glicosídeos (2,0 μ Mol) correspondiam a 95% da massa molar total de isoflavonas. Após a extrusão houve uma re-distribuição destes conjugados em malonil, acetil e β -glicosídeos, mas a soma da massa molar destes compostos, bem como a massa molar total de isoflavonas não sofreram alterações, mantendo-se em 2,0 μ Mol e 2,1 μ Mol, respectivamente (Anexo B). Murphy et al. (2002) realizaram aquecimento de farinha de soja crua a 150⁰C para simular os efeitos da extrusão sobre isoflavonas e obtiveram resultados semelhantes aos observados na PTS não tratada: após 2 horas a 150⁰C, 2 μ Mol de acetil genistina e 0,5 μ Mol de genistina foram formados enquanto malonil genistina teve diminuição de 2,5 μ Mol, comprovando a instabilidade térmica dos conjugados malonil. Esta transformação equimolar não ocorreu quando a PTS foi obtida a partir de farinha de soja tratada: os conjugados malonil e β -glicosídeos na farinha de soja constituíam 1,0 μ Mol (55% da massa molar total de isoflavonas) e após a extrusão a soma dos três conjugados, malonil, acetil e β -glicosídeos, passou a ser de 0,8 μ Mol, correspondendo a 44% da massa molar total de isoflavonas. Com esta diminuição dos conjugados na PTS tratada, era de se esperar alterações na massa molar total das isoflavonas, entretanto isto não ocorreu. A massa molar total de isoflavonas não sofreu alterações após a extrusão da farinha de soja tratada, devido ao aumento de agliconas de 0,8 μ Mol (21,5 mg/100g) na farinha tratada para 1,0 μ Mol na PTS tratada (25,2 mg/100g), mantendo a massa molar total em 1,8 μ Mol (Anexo B).

Embora as duas farinhas de soja, não tratada e tratada, tenham sido submetidas às mesmas condições de extrusão é possível que alterações tenham ocorrido durante o tratamento hidrotérmico, provocando as diferenças entre as duas PTS quanto a re-distribuição dos isômeros. Conforme Wang & Murphy (1996) a hidratação de grãos de soja

durante o processamento de alimentos re-hidrata as estruturas celulares, e considerando que sob aquecimento úmido conjugados malonil e acetil glicosídeos são mais susceptíveis a conversão nos demais isômeros (CHIEN et al., 2005), este pode ser o motivo do aumento de agliconas após a extrusão da farinha tratada.

Ao comparar os quatro produtos obtidos neste trabalho: farinhas de soja desengordurada não tratada (FSD 2005) e tratada (FSDT 2005) e as PTS não tratada (PTS NT) e tratada (PTS T) observa-se a ocorrência de alterações significativas quanto à distribuição das isoflavonas. Na farinha de soja não tratada a ordem de apresentação dos compostos quanto a representatividade em relação ao total de isoflavonas foi a seguinte: malonil > β -glicosídeos > agliconas > acetil, enquanto na farinha de soja tratada foi malonil > agliconas > β -glicosídeos > acetil. Após a extrusão das farinhas a ordem dos compostos alterou para β -glicosídeos > malonil > acetil > agliconas na PTS proveniente da farinha de soja não tratada, e para agliconas > acetil > β -glicosídeos > malonil na PTS proveniente da farinha de soja tratada, evidenciando a influência do processamento sobre a distribuição de isoflavonas (Figura 13).

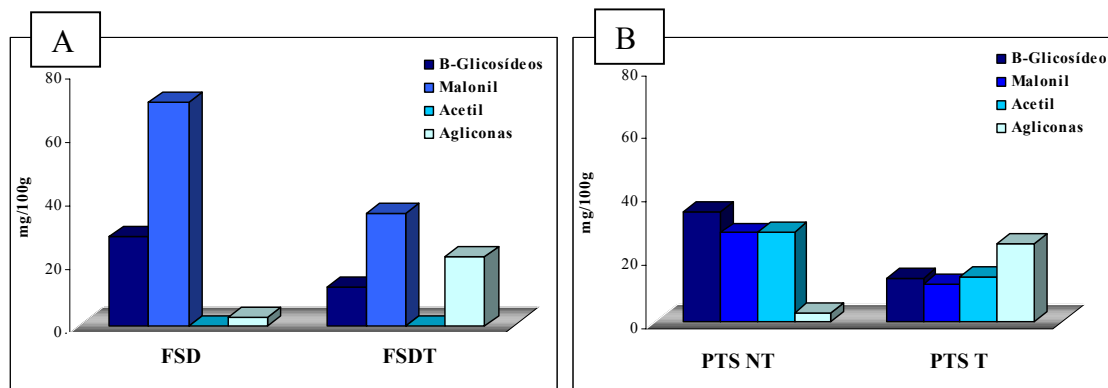


Figura 13 – Teor de isoflavonas (mg/100g) nas farinhas de soja não tratada (FSD) e tratada (FSDT) proveniente de cotilédones da safra 2005 [A]; e nas PTS não tratada (PTS NT) e tratada (PTS T) [B]

As agliconas formadas durante o tratamento hidrotérmico dos cotilédones de soja permaneceram após a extrusão, sendo que em conjunto, o tratamento hidrotérmico e a extrusão, nas condições utilizadas, constituíram processos eficientes para obtenção de PTS com maior teor de agliconas (Figura 16). A extrusão das farinhas de soja não tratada e tratada com volume de água reduzido (safra 2004) não foi realizada em função da insuficiência de matéria-prima.

5.3 INFLUÊNCIA DA B-GLICOSIDASE SOBRE ISOFLAVONAS: TESTE DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA

Para comprovar que o aumento de agliconas em grãos de soja durante hidratação ocorre devido à ação da enzima β -glicosidase sobre os β -glicosídeos, 0,5% de glucona- δ -lactona (soja:inibidor; p:p), um inibidor competitivo de β -glicosidase, foi adicionado à água em que grãos de soja da cultivar BRS 213 safra 2004 foram mantidos a 50^oC por 12 horas, conforme metodologia descrita por Araujo et al. (1997). Como Controle foi conduzido outro experimento onde os grãos de soja foram mantidos em hidratação sob as mesmas condições, porém sem inibidor. Após 12 horas de hidratação o teor de β -glicosídeos nos grãos do experimento Sem Inibidor diminuiu 54%, em relação aos grãos de soja *in natura*, enquanto nos grãos Com Inibidor a diminuição foi de 32% (Figura 14). Paralelamente, o teor de agliconas aumentou 4,5 vezes nos grãos do experimento Sem Inibidor, passando de 3,9% do total de isoflavonas nos grãos *in natura* para 28%, enquanto nos grãos Com Inibidor o aumento foi de 2,6 vezes, passando para 17% do total de isoflavonas (Figura 14). Araujo et al. (1997), realizando estudos de inibição de β -glicosidases da soja, observaram que o teor de agliconas aumentou 3,3 vezes quando grãos de soja da cultivar UFV-5 foram hidratados por 12 horas e, quando hidratados em água contendo glucona- δ -lactona (0,5%; soja:inibidor; p:p), o aumento foi de 2,5 vezes.

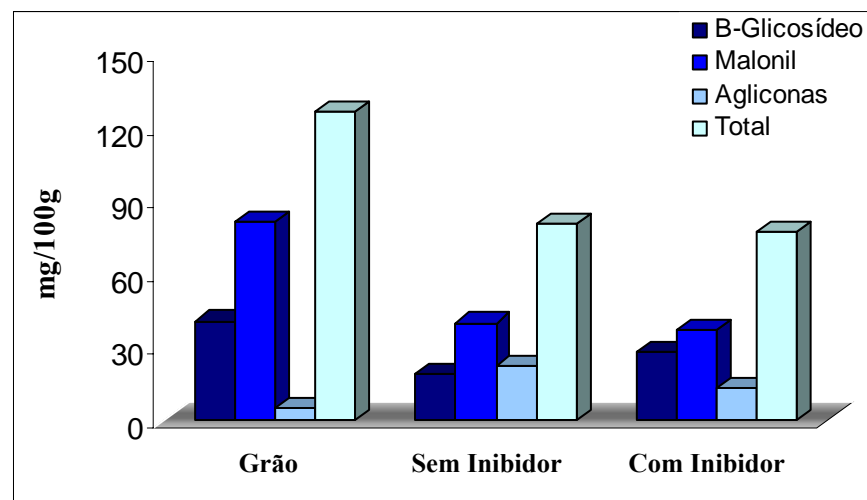


Figura 14 – Teor de isoflavonas (mg/100g) nos grãos de soja não hidratados; grãos hidratados a 50^oC por 12 horas Sem Inibidor; grãos hidratados a 50^oC por 12 horas Com Inibidor glucona- δ -lactona 0,5%

A diminuição mais acentuada de β -glicosídeos no experimento Sem Inibidor, provavelmente ocorreu em função de sua transformação em agliconas além de lixiviação para a água de hidratação, pois conforme Wang & Murphy (1996), β -glicosídeos assim como as demais isoflavonas, podem lixiviar para a água de hidratação, sobretudo quando hidratados sob aquecimento. Quanto as agliconas, a adição do inibidor glucona- δ -lactona à água de hidratação promoveu inibição parcial da enzima β -glicosidase, justificando o menor aumento de agliconas em comparação com o experimento Sem Inibidor. Esta inibição parcial da enzima pode ter ocorrido devido a temperatura utilizada durante a hidratação dos grãos de soja, pois conforme Matsuura et al. (1989), glucona- δ -lactona pode ser convertido em ácido glucônico e em glucona- γ -lactona em solução aquosa submetida a aquecimento, sendo que glucona- δ -lactona constitui um inibidor mais potente de β -glicosidase que glucona- γ -lactona.

Em experimentos conduzidos por Toda et al. (2000), a adição de glucona- δ -lactona (0,5%) a água de hidratação em que grãos de soja foram mantidos a 20⁰C por 1, 2, 5, 10 e 15 horas, não provocou alterações significativas no teor de agliconas, sugerindo inibição total da enzima β -glicosidase. Inibição total na formação de agliconas também foi observada por Matsuura et al. (1989), ao adicionar 0,5% de glucona- δ -lactona (soja:inibidor; p:p) a água de hidratação em que grãos de soja foram mantidos por 16 horas a 20⁰C.

Quanto aos conjugados malonil glicosídeos, houve redução significativa em seu teor: 51% nos grãos de soja do experimento Sem Inibidor e 55% quando os grãos foram hidratados Com Inibidor (Figura 14). Conforme Barnes et al. (1994), conjugados malonil são termicamente instáveis e pela ação de calor úmido, suas ligações éster podem ser clivadas dando origem aos respectivos β -glicosídeos. Góes-Favoni (2002) observou redução dos conjugados malonil durante tratamento hidrotérmico de grãos de soja inteiros por 1, 4, 8, 12, 16, 20 e 24 horas a 50⁰C, sendo que após 24 horas o teor dos conjugados malonil diminuiu 80%. Ao analisar a água de hidratação, Góes-Favoni (2002) observou que cerca de 20% dos conjugados malonil originalmente contidos nos grãos de soja inteiros migraram para a água de hidratação e concluiu que a diminuição desses conjugados nos grãos de soja após a hidratação ocorreu devido à sua conversão em β -glicosídeos e sua lixiviação para a água.

O teor de isoflavonas totais também diminuiu após a hidratação passando de 126,6 mg/100g nos grãos de soja *in natura* tratados para 80,6 e 77,3 mg/100g nos grãos de soja do experimento Sem inibidor e nos grãos tratados com inibidor, respectivamente (Figura 14). Esta redução no teor de isoflavonas se deve provavelmente à sua lixiviação para a água

durante a hidratação. Góes-Favoni (2002) observou que após a hidratação de grãos de soja inteiros por 24 horas a 50⁰C, 45% das isoflavonas originalmente contidas nos grãos de soja migraram para a água. A água de hidratação não foi investigada neste experimento quanto ao teor de isoflavonas.

Considerando que o aumento no teor de agliconas durante hidratação ocorreu em função da ação da β -glicosidase, a atividade da enzima foi determinada nos grãos *in natura*, grãos tratados Sem Inibidor, grãos tratados Com Inibidor e na água de hidratação proveniente dos tratamentos. O nível de atividade enzimática que nos grãos de soja foi de 75,6 UA/g passou para 44,4 UA/g nos grãos de soja do experimento Sem Inibidor e para 10,4 UA/g quando o inibidor glucono- δ -lactone foi adicionado à água de hidratação (Figura 15). A redução da atividade enzimática nos grãos do experimento Sem Inibidor ocorreu em função da lixiviação da enzima para a água de hidratação, pois ao analisar a água foi detectado nível de atividade enzimática de 14,1 UA/mL. Nos grãos tratados com glucono- δ -lactone a redução da atividade enzimática foi mais acentuada que nos grãos do experimento Sem Inibidor, possivelmente em função da inibição enzimática, além de sua lixiviação para a água. Na água de hidratação proveniente do tratamento dos grãos com inibidor o nível de atividade enzimática foi de 5 UA/mL (Figura 15). Toda et al. (2001) observaram atividade enzimática correspondente a β -glicosidase na água em que grãos de soja foram hidratados por 5, 10, 15 e 20 horas a 15⁰C e constaram que a atividade aumentou com o aumento do tempo de hidratação, evidenciando a migração da enzima para a água. Nos experimentos conduzidos por Araujo *et al.* (1997), a adição de glucono- δ -lactone durante hidratação de grãos de soja por 12 horas provocou a inibição da enzima à metade de sua atividade original .

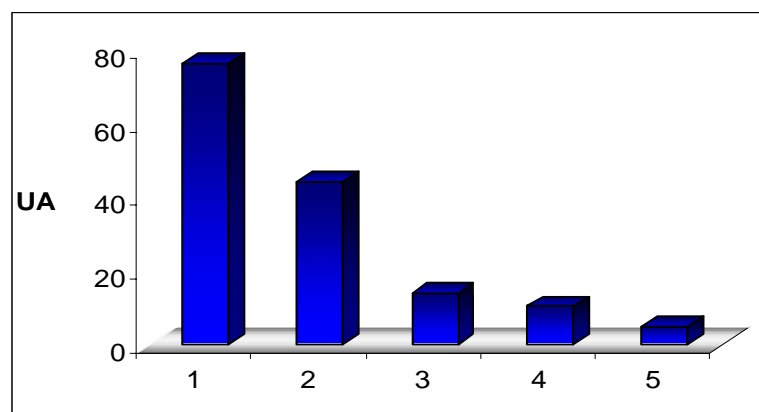


Figura 15 – Nível de atividade da enzima β -glicosidase: [1] grãos de soja não hidratados; [2] hidratados Sem Inibidor; [3] água de hidratação do tratamento Sem Inibidor; [4] grãos hidratados Com Inibidor (0,5%); [5] água de hidratação do tratamento Com Inibidor. Nível de atividade expresso em UA/g nos grãos de soja e UA/mL nas águas de hidratação.

5.4 INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO HIDROTÉRMICO E DA EXTRUSÃO TERMOPLÁSTICA SOBRE A ATIVIDADE DE β -GLICOSIDASES ENDÓGENAS DA SOJA

Nas farinhas de soja não tratadas desengorduradas o nível de atividade da enzima foi de 78,3 e 76,1 UA/g, nas farinhas FSD 2004 e FSD 2005, provenientes de cotilédones das safras 2004 e 2005, respectivamente (Tabela 6). Carrão-Panizzi & Bordignon (2000) determinaram a atividade da β -glicosidase em 51 cultivares de soja semeadas em Londrina, Paraná e observaram variabilidade na atividade da enzima entre as cultivares, evidenciando o controle genético sobre a atividade da enzima. Porém, ao semear a cultivar IAS 5 em 13 locais diferentes, nenhuma alteração foi detectada, sugerindo que as condições ambientais não afetaram a atividade da enzima. Resultados semelhantes foram observados por Góes-Favoni et al. (2004a) quando quantificaram a atividade da β -glicosidase em grãos de soja inteiros da cultivar IAS 5 safra 2000, semeados em dois locais diferentes e observaram que a atividade da enzima não diferiu significativamente nos dois locais. β -glicosidases endógenas da soja têm sido descritas como as responsáveis pela formação de agliconas a partir da hidrólise de seus conjugados β -glicosídeos, durante hidratação de grãos de soja (MATSUURA et al., 1989.; TODA et al., 2001).

Tabela 6 – Nível de atividade enzimática da β -glicosidase nas farinhas de soja e PTS não tratadas e tratadas (UA/g) e na água de hidratação (UA/mL)

	UA	
	2004	2005
Farinha de soja desengordurada (FSD)	78,3 Aa ± 2,4	76,1 Ba ± 3,0
Farinha de soja desengordurada tratada (FSDT)	24,7 Ab ± 1,3	14,3 Bb ± 2,3
Água de hidratação	7,0 Bc ± 0,13	10,6 Ac ± 0,24
PTS não tratada (PTS NT)	NE**	ND*
PTS tratada (PTS T)	NE	ND

Médias (\pm desvio padrão) seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

*ND = Não Detectado ; ** NE = Não Extrusado.

Após o tratamento dos cotilédones de soja a 50⁰C por 12 horas, o nível de atividade da enzima β -glicosidase diminuiu, passando para 24,7 UA/g na farinha de cotilédones provenientes da safra 2004 (FSDT 2004), tratados com volume de água reduzido (1:1,2; soja:água; p:p), e para 14,3 UA/g na farinha de cotilédones provenientes da safra 2005 (FSDT 2005), tratados com volume de água maior (1:3; soja:água; p:p) (Tabela 6). Paralelamente, a massa molar de agliconas aumentou 18 e 8 vezes após o tratamento hidrotérmico, passando de 0,03 e 0,1 μ Mol nas farinhas não tratadas 2004 (FSD 2004) e 2005 (FSD 2005) para 0,55 e 0,82 μ Mol na farinha tratada com volume reduzido de água (FSDT 2004) e na farinha tratada com volume de água maior (FSDT 2005), respectivamente (Anexo A).

A redução no nível de atividade da enzima se deve à sua migração para a água de hidratação, em maior quantidade quando tratada com volume de água maior, sugerindo que após hidrolizar os conjugados β -glicosídeos lixiviou para a água (Tabela 6). Góes-Favoni et al. (2004a) observaram diminuição de 80%, em média, no nível de atividade da β -glicosidase após tratamento hidrotérmico de grãos de soja inteiros (IAS 5) a 50⁰C por 12 horas. Toda et al. (2001) constataram que a atividade da enzima na água de hidratação aumentou com o aumento do tempo em que grãos de soja foram mantidos em hidratação a 15⁰C por 5, 10, 15 e 20 horas, evidenciando a lixiviação da enzima para a água.

Quanto as agliconas, a diferença observada no aumento de sua concentração após os tratamento hidrotérmico se deve, provavelmente a maior retenção das isoflavonas nos cotilédones quando tratados com volume de água reduzido, permanecendo nos tecidos maior quantidade de β -glicosídeos (substratos enzimáticos), maior quantidade das agliconas formadas e maior quantidade de β -glicosidases.

Matsuura et al. (1989) mantiveram grãos de soja inteiros em hidratação com volume de água de 1:3 (soja:água; p:p) e observaram que o teor de agliconas aumentou de 3,3% do total de isoflavonas nos grãos de soja antes da hidratação para 12,4% após a hidratação por 16 horas a 20⁰C, e atribuíram estas alterações a ação da enzima β -glicosidase sobre os β -glicosídeos. Ao avaliar diferentes condições de hidratação, estes autores observaram que a maior formação de agliconas nos grãos de soja durante hidratação, ocorreu a 50⁰C em pH 6,0. Paralelamente ao aumento de agliconas o teor de β -glicosídeos diminuiu, sugerindo ação enzimática sobre estes compostos. Para confirmar esta hipótese, estes pesquisadores adicionaram um substrato sintético específico para β -glicosidases, *p*-NPG, na água de hidratação e observaram que a maior liberação de *p*-NP (*p*-nitrofenol), produto obtido

pela reação enzimática, ocorreu também a 50^oC e pH 6,0, sugerindo que estas são as condições ideais para a atividade das enzimas β -glicosidases endógenas da soja.

Após a extrusão das farinhas não tratada e tratada com volume de água maior (safra 2005) atividade enzimática de β -glicosidase não foi detectada (Tabela 6), evidenciando inativação térmica da enzima durante o processo de extrusão termoplástica. Matsuura & Obata (1993) realizaram estudos de caracterização de duas β -glicosidases endógenas da soja após purificação parcial, e observaram que a 55^oC, 80% da atividade inicial das isoenzimas permaneceram, enquanto a 60^oC houve completa inativação. Zhang et al. (2004) determinaram a atividade de β -glicosidase durante processamento para obtenção de pão composto por farinha de trigo e farinha de soja e observaram que durante o assamento da massa, realizado a 165^oC por 50 minutos, o teor de agliconas não sofreu alterações significativas e nenhuma atividade enzimática foi detectada.

5.5 INFLUÊNCIA DO PROCESSAMENTO SOBRE A COMPOSIÇÃO CENTESIMAL EM GRÃOS DE SOJA

O teor de proteína na farinha de soja não tratada proveniente dos cotilédones da safra 2004 foi de 37,97%, não diferindo significativamente após o tratamento hidrotérmico (1:1,2; soja:água; p:p) passando para 37,92% (Tabela 7). Nas farinhas não tratada e tratada (1:3; soja:água; p:p) provenientes de cotilédones da safra 2005, porém, o teor de proteínas aumentou após o tratamento hidrotérmico, passando de 38,63 para 43,79% (Tabela 8). Esta diferença observada no teor de proteína entre as farinhas não tratada e tratada da safra 2005 ocorreu em função da passagem de componentes não nitrogenados para a água de hidratação durante a imersão dos grãos com volume de água de 1:3 (soja:água), promovendo assim, a concentração dos demais constituintes. Na farinha proveniente da safra 2004, após o tratamento hidrotérmico com volume de água reduzido (1:1,2; soja:água), praticamente toda a água de hidratação foi absorvida pelos cotilédones e portanto, o teor de proteína manteve-se inalterado. Resultados semelhantes foram observados por Góes-Favoni (2002) após hidratação de grãos de soja (1:3; soja:água) por 12 e 24 horas a 50^oC, com aumento de 9,2 e 11,8%, respectivamente.

Após o desengorduramento o teor de proteína aumentou 12 e 14% nas farinhas não tratada e tratada (1:1,2; soja:água; p:p) da safra 2004, passando de 37,97% para 42,52% na farinha não tratada e de 37,92% para 43,18% na farinha tratada, respectivamente, em função da concentração dos demais constituintes químicos pela retirada de lipídeos (Tabela 7). O teor de lipídeos diminuiu sensivelmente após o desengorduramento com hexano em temperatura ambiente, passando de 23,61 e 25,22% nas farinhas não tratada e tratada da safra 2004, para 3,70 e 4,34%, respectivamente (Tabela 7). Resultados semelhantes foram observados após o desengorduramento das farinhas não tratada e tratada (1:3; soja:água; p:p) da safra 2005: o teor de proteína passou de 38,63 e 43,79% para 43,72 e 50,61%, respectivamente, enquanto o teor de lipídeos passou de 22,18 para 2,16% na farinha não tratada e de 24,71 para 2,60% na farinha tratada (Tabelas 8). Conforme Setchell (1998) o desengorduramento de soja e seus derivados promove a concentração dos demais constituintes químicos.

Tabela 7 – Composição centesimal das farinhas de soja não tratada e tratada (1:1,2; soja:água, p:p) proveniente de cotilédones de soja da cultivar BRS 213, safra 2004

Amostra	Proteína	Lipídeos	Cinzas	CNN*	Umidade
Farinha de Soja Não Tratada	37,97 b ± 1,45	23,61 a ± 0,70	4,71 b ± 0,02	24,48 b ± 0,35	9,23 a ± 0,06
Farinha de Soja Não Tratada Desengordurada	42,52 a ± 0,43	3,70 c ± 0,16	4,72 b ± 0,02	39,34 a ± 1,12	9,72 a ± 1,22
Farinha de Soja Tratada	37,92 b ± 0,44	25,22 a ± 0,34	4,78 a ± 0,05	26,56 b ± 0,55	5,52 b ± 0,17
Farinha de Soja Tratada Desengordurada	43,18 a ± 0,34	4,34 b ± 0,31	4,78 a ± 0,03	41,79 a ± 1,77	5,91 b ± 0,35

Médias de três repetições, em base úmida.

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

*CNN = Compostos Não Nitrogenados

O teor de cinzas apresentou pequenas variações após o tratamento hidrotérmico, desengorduramento e extrusão das farinhas provenientes da safra 2004 e 2005, aproximando-se dos valores observados por Moraes (2006) que foi de 5,0% nos grãos de soja inteiros (Tabelas 7 e 8).

Os componentes não nitrogenados (CNN) nas farinhas de soja não tratadas das safras 2004 e 2005 foi de 25%, em média (Tabelas 7 e 8). Após o desengorduramento e o tratamento hidrotérmico o teor de CNN nas farinhas da safra 2004, calculado por diferença dos demais constituintes químicos, aumentou em função da redução do teor de lipídeos e umidade, reduzida durante a secagem dos grãos hidratados. Após o tratamento hidrotérmico dos cotilédones da safra 2005, com volume de água maior, o teor de CNN diminuiu, possivelmente em função de sua saída para a água de hidratação. Após o desengorduramento das farinhas não tratadas e tratadas houve concentração de CNN devido a redução do teor de lipídeos e umidade.

Tabela 8 – Composição centesimal das farinhas de soja e PTS não tratadas e tratadas (1:3; soja:água, p:p) proveniente de cotilédones de soja da cultivar BRS 213, safra 2005

Amostra	Proteína	Lipídeos	Cinzas	CNN*	Umidade
Farinha de Soja Não Tratada	38,63 d ± 0,58	22,18 a ± 0,18	4,97 b ± 0,01	25,50 d ± 0,14	8,72 ± 0,77
Farinha de Soja Não Tratada Desengordurada	43,72 c ± 0,34	2,16 b ± 0,32	5,01 a ± 0,02	39,91 a ± 1,12	9,20 ± 0,50
PTS Não Tratada	47,85 bc ± 0,91	0,87 c ± 0,02	4,98 b ± 0,02	35,75 b ± 1,23	10,55 ± 0,36
Farinha de Soja Tratada	43,79 c ± 0,23	24,71 a ± 0,98	5,00 ab ± 0,01	20,13 e ± 0,91	6,37 ± 0,25
Farinha de Soja Tratada Desengordurada	50,61 b ± 1,15	2,60 b ± 0,11	5,03 a ± 0,02	34,61 b ± 0,17	7,15 ± 0,83
PTS Tratada	54,72 a ± 2,15	0,99 c ± 0,01	4,99 ab ± 0,03	29,04 c ± 1,02	10,26 ± 0,56

Médias de três repetições, em base úmida.

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

*CNN = Compostos Não Nitrogenados

Após a extrusão das farinhas não tratada e tratada (1:3; soja:água; p:p) provenientes de cotilédones da safra 2005, alterações significativas foram observadas na composição química das PTS, havendo aumento no teor de proteína e diminuição no teor de lipídeos (Tabela 8). Conforme Genovese & Lajolo (2002) em PTS o teor protéico médio é de 50%.

5.6 ISOFLAVONAS EM PTS COMERCIAIS

Quatro marcas comerciais de PTS disponíveis no varejo foram avaliadas quanto ao teor e distribuição de isoflavonas. Houve variações no teor de isoflavonas nestes produtos, mas a distribuição das formas de isoflavonas foi semelhante (Tabela 9). Entre as PTS testadas, a PTS da marca Natu's apresentou maior teor de isoflavonas: 168,0 mg/100g, apresentando 41,5% mais isoflavonas em sua composição que a PTS da marca Mais Vita (98,3 mg/100g) com menor teor de isoflavonas entre as marcas testadas. Estas variações podem ser devido as condições ambientais e genéticas sobre a matéria-prima e de processamento (MURPHY et al., 2002), mas por se tratar de produtos comerciais, as informações que confirmem estas hipóteses são restritas. Genovese & Lajolo (2002) quantificaram isoflavonas em três marcas comerciais de PTS e observaram teor total variando de 86,9 a 99,9 mg/100g e, em média 49% de proteínas.

Com base no teor protéico das PTS comerciais analisadas, que apresentaram em média 51% de proteínas, conforme especificado em seus rótulos, conclui-se que foram obtidas a partir de farinha de soja desengordurada. Conforme Genovese & Lajolo (2002), PTS podem ser obtidas a partir de farinha de soja desengordurada, concentrado protéico ou isolado protéico de soja, com aproximadamente 50, 70 e 90% de proteínas, respectivamente. Gliciteína e seus derivados não foram detectados nas amostras, sugerindo que as PTS comerciais foram obtidas a partir de farinhas de cotilédones de soja desengorduradas, pois segundo Tsukamoto et al. (1995), gliciteína e seus derivados estão presentes apenas no hipocótilo dos grãos de soja. Conforme as especificações dos rótulos, após o desengorduramento e moagem dos grãos de soja, a farinha obtida é submetida a pré-cozimento antes de ser extrusada.

Tabela 9– Teor de isoflavonas (mg/100g) nas PTS comerciais e Porcentagem das formas químicas de isoflavonas em relação a massa molar total de isoflavonas nas PTS não tratada e tratada

Marcas	β-Glicosídeos	Malonil	Acetil	Agliconas	Total
Natu's	60,1 a ± 1,55	44,1 a ± 2,89	54,3 a ± 1,32	9,5 a ± 1,12	168,0 a ± 2,83
Jasmine	59,7 a ± 5,34	37,7 b ± 2,36	41,2 b ± 2,02	3,6 b ± 0,78	142,2 b ± 5,49
Vitao	43,0 b ± 3,52	26,6 c ± 1,72	40,6 b ± 3,58	3,1 b ± 1,34	113,3 c ± 8,33
Mais Vita	40,1 b ± 0,46	23,6 c ± 1,58	24,2 c ± 3,01	10,4 a ± 1,99	98,3 d ± 3,55

Médias (\pm desvio padrão) de três repetições em base seca.

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey $p \leq 0,05$.

Nas quatro marcas de PTS analisadas os β -glicosídeos foram as formas químicas presentes em maior quantidade, 36 a 42%, provavelmente em função das reações de descarboxilação dos conjugados malonil durante a extrusão, uma vez que em grãos de soja e produtos de soja minimamente processados, malonil glicosídeos constituem os principais isômeros (COWARD et al., 1998). Os conjugados acetil também foram detectados em quantidades elevadas (25 a 36%) enquanto malonil representaram 23 a 26% do total de isoflavonas (Tabela 10). Genovese & Lajolo (2002) analisaram diferentes produtos comerciais à base de soja e quantificaram 43 a 48% do total de isoflavonas em três marcas de PTS como β -glicosídeos e de 17 a 23% como acetil glicosídeos.

A PTS obtida a partir da farinha de soja não tratada (FSD 2005) apresentou teor dos conjugados β -glicosídeos, acetil e malonil semelhantes aos observados nas PTS comerciais: 37, 30 e 30%, respectivamente (Tabela 5). Já na PTS obtida a partir da farinha de soja tratada por 12 horas a 50⁰C (FSDT 2005), além da diminuição do teor dos conjugados em relação ao total de isoflavonas, conjugados acetil (22%) apresentaram maior teor que os conjugados β -glicosídeos (21%) e malonil glicosídeos (18%) (Tabela 5).

Quanto as agliconas o teor variou entre 3 e 10% do total de isoflavonas sendo a proporção de genisteína 1,6 vezes maior que daidzeína (Figura 16). Considerando a maior instabilidade dos conjugados de daidzeína observada neste trabalho, é possível que o maior teor da aglicona genisteína nas PTS comerciais tenha ocorrido em função de seu maior teor na matéria-prima.

Cassidy et al. (2006) realizaram estudos em humanos para avaliar a biodisponibilidade de isoflavonas presentes em três alimentos distintos: extrato de soja

aquoso, PTS e tempeh, todos ministrados com o mesmo teor de isoflavonas totais (0,44 mg de isoflavonas/Kg de massa corpórea), e observaram que a matriz do alimento bem como a distribuição dos isômeros nesta matriz (tipo de alimento) tem forte influência sobre a biodisponibilidade das isoflavonas. Ao comparar a matriz dos alimentos, os pesquisadores concluíram que isoflavonas foram absorvidas mais rapidamente quando extrato de soja aquoso foi ingerido, apresentando picos de concentração de daidzeína e genisteína no plasma após 6,2 e 5,9 horas, respectivamente, enquanto para PTS e tempeh, os picos de concentração plasmática foram obtidos duas horas mais tarde, indicando que a ingestão de alimentos líquidos contendo isoflavonas leva a maior biodisponibilidade destes compostos. Ao comparar as duas matrizes sólidas de alimento, PTS e tempeh, os pesquisadores observaram picos de concentração plasmática maiores e alcançados mais rapidamente após a ingestão de tempeh, que apresentou em média 49 mg/100g de agliconas, enquanto na PTS o teor de agliconas foi 8,2 mg/100g, comprovando os resultados obtidos por Izumi et al. (2000) de que agliconas são absorvidas mais rapidamente e em maior quantidade que seus β -glicosídeos. Entretanto, Cassidy et al. (2006) relataram que o teor de isoflavonas totais foi 8,3 vezes maior na PTS que nos extratos de soja.

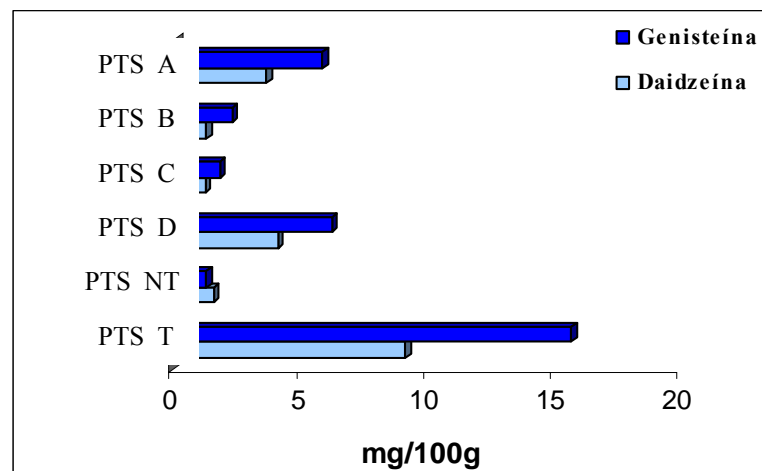


Figura 16 – Teor de agliconas (mg/100g) nas PTS Não Tratada (PTS NT) e Tratada (PTS T) e PTS comerciais das marcas Natu's [A], Jasmine [B], Vitao [C] e Mais Vita [D].

Quando comparadas as PTS comerciais e PTS não tratada com a PTS tratada obtida neste trabalho, observa-se que o teor de agliconas foi em média 5 vezes maior na PTS tratada (Figura 16), sugerindo que os métodos de processamento utilizados foram eficientes na formação e retenção das agliconas.

5.7 INFLUÊNCIA DO PROCESSAMENTO SOBRE A MICROESTRUTURA DAS FARINHAS E PTS NÃO TRATADAS E TRATADAS

As farinhas de soja não tratada e tratada (1:3; soja:água; p:p) obtidas a partir dos grãos da safra 2005 apresentaram microestrutura similar com partículas esféricas aderidas entre si. Na farinha não tratada desengordurada (FSD 2005) as partículas esféricas apresentaram-se maiores (9 μm em média) e mais aglomeradas entre si, enquanto na farinha tratada desengordurada (FSDT 2005) estas partículas apresentaram-se menores (2,5 μm em média) e com formato irregular (Figuras 17 A e B). Nas duas farinhas, não tratada e tratada, foram observados pequenos mas numerosos poros, provavelmente esferossomas vazios que continham lipídeos antes do desengorduramento (Figuras 17 A e B). Conforme Aguilera & Stanley (1990) em micrografias de grãos de soja e produtos derivados de soja integrais são observados esferossomas ($< 1 \mu\text{m}$) dispersos entre as proteínas, porém após o desengorduramento desaparecem restando apenas os poros vazios.

Embora com microestrutura similar, diferenças foram observadas durante o preparo das farinhas para a extrusão. As farinhas de soja não tratada e tratada foram condicionadas com a adição de água para atingir teor de umidade de 23% e neste processo, a farinha de soja tratada (FSDT 2005) incorporou a água mais rapidamente, sem formar grumos sendo de fácil manuseio. Já na farinha não tratada (FSD 2005), o condicionamento foi lento, com formação de muitos grumos e necessidade de re-condicionamento após 24 horas. Ao avaliar a capacidade de absorção de água (CAA) das farinhas não tratada (FSD 2005) e tratada (FSDT 2005) observou-se que a CAA da farinha aumentou 29% após o tratamento hidrotérmico a 50⁰C por 12 horas, sugerindo que este tratamento alterou as propriedades físico-químicas das proteínas (Tabela 10). Conforme Wolf & Tamura *apud* Dahl & Villota (1991), o aquecimento pode promover abertura da estrutura quaternária das proteínas fazendo com que os grupos reativos dos aminoácidos fiquem expostos e mais susceptíveis a ligação com moléculas de água.

Tabela 10 – Capacidade de Absorção de Água (g de água absorvida / g de matéria seca) nas Farinhas de Soja Desengorduradas Não Tratada e Tratada (1:3; soja:água) da safra 2005

	CAA
Farinha de Soja Desengordurada (FSD 2005)	1,77 b ± 0,05
Farinha de Soja Desengordurada Tratada (FSDT 2005)	2,29 a ± 0,01

Média de dez repetições.

Médias (\pm desvio padrão) seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey $p \leq 0,05$.

As diferenças observadas entre as farinhas não tratada e tratada foram refletidas na macro e microestrutura das PTS. A PTS não tratada teve uma texturização incompleta, fragmentada e apresentou baixa razão de expansão enquanto na farinha tratada a extrusão do material foi contínua e a razão de expansão do material foi maior (Figuras 18 A e B) (Tabela 11). Conforme Rokey (2000), se a penetração da água na matriz a ser extrusada não for uniforme, há tendência de que as proteínas fiquem laminadas e não expandidas.

Tabela 11 – Razão de Expansão (RE) e Capacidade de Re-Hidratação (CRH) das PTS Não Tratada e Tratada

	RE	CRH (%)
PTS Não Tratada	2,3 b ± 0,44	201 b ± 21,4
PTS Tratada	5,2 a ± 0,15	461 a ± 17,2

Média de 10 repetições.

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

RE = diâmetro do extrusado/diâmetro da matriz

CRH = [peso do extrusado hidratado/peso do extrusado seco] x 100.

A capacidade de re-hidratação (CRH) da PTS tratada foi, em média, 2,3 vezes maior que da PTS não tratada, confirmando os resultados observados por Dahl & Vilotta (1991) de que a capacidade de re-hidratação das PTS está diretamente relacionada a razão de expansão (Tabela 11).

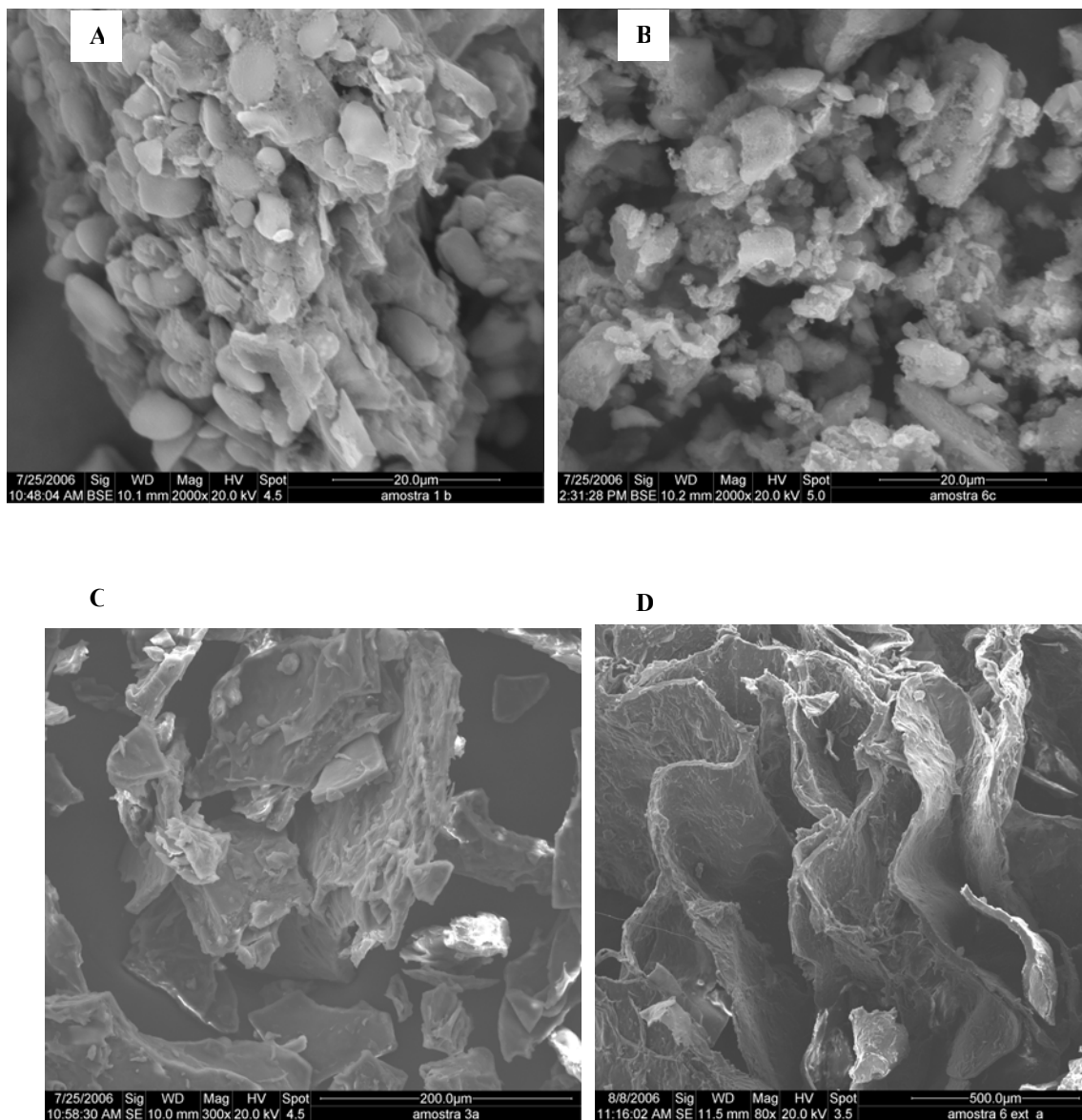


Figura 17 – Micrografia eletrônica de [A] Farinhas de soja Desengorduradas Não Tratada (FSD 2005) e [B] Tratada (FSĐT 2005); [C] PTS Não Tratada e [D] PTS Tratada

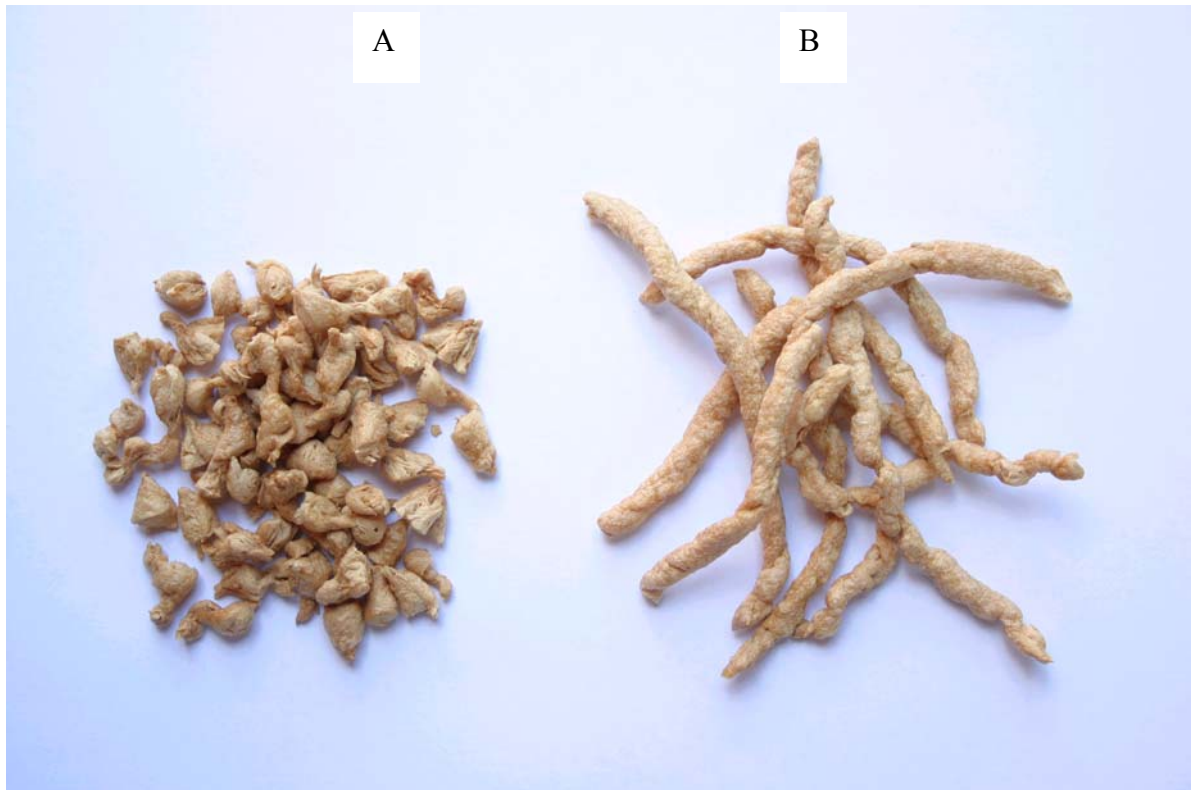


Figura 18 – Fotografia das PTS [A] Não Tratada e [B] Tratada

Através de micrografias foi possível observar que a PTS não tratada apresentou uma formação incompleta da matriz protéica, com superfície irregular, seca, com aspecto quebradiço e laminado (Figura 17 C). Na PTS tratada porém, observou-se claramente que a estrutura foi re-orientada num único sentido, formando uma rede de orifícios (Figura 17 D). Esta estrutura coincide com as observações de Aguilera & Stanley (1990) que descreveram a microestrutura de proteína texturizada de soja como uma rede fibrosa orientada em um só sentido contendo poros na matriz expandida que foram gerados pela evaporação da água. Conforme Dahl & Villota (1991), durante a extrusão a água incorporada à farinha forma uma massa fundida que ao passar pelo orifício da matriz evapora e proporciona a expansão imediata do material. Uma vez que a capacidade de absorção de água na farinha de soja tratada foi maior que na farinha não tratada (Tabela 10), é possível que a água tenha se distribuído mais uniformemente nesta farinha, permitindo a extrusão completa da matriz protéica, levando a maior razão de expansão do material.

6 CONCLUSÃO

O tratamento hidrotérmico e a extrusão, nas condições utilizadas neste trabalho, constituíram métodos eficientes de processamento para obtenção de um alimento funcional (PTS) com elevada concentração de agliconas e alto teor protéico.

O tratamento hidrotérmico a 50⁰C por 12 horas provocou alterações na distribuição das isoflavonas conjugadas em função de inter-conversões entre as formas químicas e lixiviação para a água durante a hidratação. β -glicosidases endógenas da soja promoveram hidrólise dos conjugados β -glicosídeos convertendo-os em agliconas.

Em ambos tratamentos hidrotérmicos (1:1,2 e 1:3, soja:água), a massa molar de agliconas aumentou, porém quando realizado com volume de água reduzido, houve maior retenção destes compostos nos cotilédones. O menor volume de água torna viável o processamento industrial, pois menor volume de resíduo será gerado. Uma vez que a concentração inicial de agliconas foi maior nos cotilédones da safra 2005, após o tratamento hidrotérmico a farinha de soja tratada 2005 apresentou mais agliconas que a farinha de soja tratada proveniente de cotilédones da safra 2004.

A extrusão das farinhas de soja alterou a distribuição das diferentes formas químicas de isoflavonas, mas não as degradou, mantendo o teor de agliconas na PTS obtida a partir da farinha de soja tratada a 50⁰C por 12 horas.

β -glicosidases da soja foram responsáveis pelo aumento de agliconas nos cotilédones durante os tratamentos hidrotérmicos. O nível de atividade da enzima nos cotilédones das safras 2004 e 2005 foram semelhantes, porém diminuiu após o tratamento hidrotérmico, devido a lixiviação da enzima para a água, ocorrendo em maior quantidade quando o tratamento hidrotérmico foi realizado com volume de água maior. Nas PTS não foram detectadas atividades da enzima, provavelmente em função de sua inativação térmica.

A composição centesimal nas farinhas de soja e PTS variou em função do desgorduramento, secagem e saída de compostos não nitrogenados para a água de hidratação.

Quando comparados as PTS comerciais, PTS tratada e não tratada, observa-se que o teor de agliconas foi, em média, 5 vezes maior na PTS tratada, sugerindo que a extrusão, nas condições utilizadas neste trabalho, não alteraram significativamente o teor de agliconas bem como o teor de isoflavonas totais.

O tratamento hidrotérmico provocou alterações significativas na micro e macroestrutura da farinha e PTS, proporcionando maior capacidade de absorção de água pela farinha, texturização completa da matriz protéica, maior razão de expansão e capacidade de re-hidratação do material extrusado. A PTS tratada apresentou microestrutura constituída por uma rede fibrosa orientada em único sentido, com poros da matriz expandida, enquanto na PTS não tratada a texturização foi incompleta e fragmentada, levando a menor razão de expansão da PTS.

REFERÊNCIAS

ADLERCREUTZ, H. Western diet and Western diseases: some hormonal and biochemical mechanisms and associations. **The Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation.** v. 50, n. 201, p. 3-23, 1990.

ADLERCREUTZ, H.; HONJO, H.; HIGASHI, A.; FOTSIS, T.; HÄMÄLÄINEN, E.; HASEGAWA, T.; OKADA, H. Urinary excretion of lignans and isoflavonoid phytoestrogens in Japanese men and women consuming a traditional Japanese diet. **The American Journal of Clinical Nutrition.** v. 54, p. 1093-1100, 1991.

ADLERCREUTZ, H.; MAZUR, W.; BARTELS, P.; ELOMAA, V.; WATANABE, S.; WAHALA, K.; LANDSTROM, M.; LUNDIN, E.; BERGH, A.; DAMBER, J. E.; AMAN, P.; WIDMARK, A.; JOHANSSON, A.; ZHANG, J. X.; HALLMANS, G. Phytoestrogens and prostate disease. **The Journal of Nutrition.** v. 130, p. 658S-659S, 2000.

AGUILERA, J. M. & STANLEY, D. W. Microstructural principles of food processing & engineering. New York: **Elsevier Science Publishers**, 1990. 641p.

ANDERSON, J. W.; JOHNSTONE, B. M.; COOK-NEWELL, M. E. Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. **The New England Journal of Medicine.** v. 133, n. 5, 1995.

ANDERSON, J. W.; SMITH, B. M.; WASHNOCK, C. S. Cardiovascular and renal benefits of dry bean and soybean intake. **The American Journal of Clinical Nutrition.** v. 70, p. 464S-474S, 1999.

ANTHONY, M. S. Soy and cardiovascular disease: cholesterol lowering and beyond. **The Journal of Nutrition.** v. 130, p. 662S-663S, 2000.

ARAÚJO, J. M. A.; CARLOS, J. C. S.; SEDYAMA, C. S. Isoflavonas em grãos de soja: importância da atividade de β -glicosidase na formação do sabor amargo e adstringente. **Ciência e Tecnologia de Alimentos.** v. 17, n. 2, p. 137-141, 1997.

ARÊAS, J. A. G. Extrusion of Food Proteins. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition.** v. 32, n. 4, p. 365-392, 1992.

BADGER, T. M.; RONIS, M. J. J.; HAKKAK, R.; ROWLANDS, J. C.; KOROURIAN, S. The health consequences of early soy consumption. **The Journal of Nutrition**. v. 132, p. 559S-565S, 2002.

BARNES, S.; KIRK, M.; COWARD, L. Isoflavones and their conjugates in soy foods: extraction conditions and analysis by HPLC - mass spectrometry. **The Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 42, p. 2466-2474, 1994.

BERHOW, M. A. Modern analytical techniques for flavonoid determination. In: BUSLIG, B. S.; MANTHEY, J. A. E. **Flavonoids in the Living Cell**. Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York, p. 61-76, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Resolução n. 18*, de 30 de abril de 1999. Aprova o **Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos**. Brasília, 1999.

BROUNS, F. Soya isoflavones: a new and promising ingredient for the health foods sector. **Food Research International**. v. 35, p. 187-193, 2002.

BURR, I. & FOSTER, L. A. A test for equality of variance. West Lafayette, University of Purdue, 1972, 26p.

CARRÃO-PANIZZI, M. C. Modificações químicas, funcionais e nutricionais obtidas por melhoramento genético da soja. In: ATA DE RESUMOS DA XXIV REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO SUL, 1996, Londrina. **Anais...** Londrina: Embrapa Soja, p. 10-11, 1996a.

CARRÃO-PANIZZI, M. C. Avaliação de cultivares de soja quanto aos teores de isoflavonóides. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 31, n. 10, p. 691-698, 1996 b.

CARRÃO-PANIZZI, M. C.; KITAMURA, K.; BELÉIA, A. D. P.; OLIVEIRA, M. C. N. Influence of growth locations on isoflavone contents in Brazilian soybean cultivars. **Breeding Science**. v. 48, p. 409-413, 1998.

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

CARRÃO-PANIZZI, M. C. Melhoramento genético da soja para a obtenção de cultivares mais adequados ao consumo humano. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**. V. 15, n. 2, p. 330-340, 2000.

CARRÃO-PANIZZI, M. C.; BORDIGNON, J. R. Activity of beta-glucosidase and levels of isoflavone glucosides in soybean cultivars affected by the environment. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 35, n. 5, p. 873-878, 2000.

CARRÃO-PANIZZI, M. C.; GÓES-FAVONI, S. P.; KIKUCHI, A. Extraction time for soybean isoflavone determination. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 45, n. 4, p. 515-518, 2002.

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.

CARROL, K. K.; KUROWSKA, E. M. Soy consumption and cholesterol reduction: review of animal and human studies. **The Journal of Nutrition**. v. 125, n. 3S, p. 594S-597S, 1995.

CASSIDY, A.; BROWN, J. E.; HAWDON, A.; FAUGHNAN, M. S.; KING, L. J.; MILLWARD, J.; ZIMMER-NECHEMIAS, L.; WOLFE, B.; SETCHELL, K. D. R. Factors affecting the bioavailability of soy isoflavones in humans after ingestion of physiologically relevant levels from different soy foods. **Journal-of-Nutrition**. v. 136, n. 1, p. 45-51, 2006.

CHAMBÔ FILHO, A.; CHAMBÔ, D.; CHAMBÔ, F. A soja como alimento funcional em ginecologia. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**. v. 15, n. 2, p. 326-329, 2000.

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.

CIABOTTI, S.; BARCELLOS, M. F. P.; MANDARINO, J. M. G.; TARONE, A. G. Avaliações químicas e bioquímicas dos grãos, extratos e tofus de soja comum e de soja livre de lipoxigenase. **Ciência e Agrotecnologia**. v. 30, n. 5, p. 920-929, 2006.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. 6^o Levantamento de Avaliação da safra 2006/2007. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conabweb/>>. Acesso em: 25 Fev. 2007.

COWARD, L.; BARNES, N.C.; SETCHELL, K.D.R.; BARNES, S. Genistein, daidzein, and their β -glycoside conjugates: antitumor isoflavones in soybean foods from american and asian diets. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 41, p. 1961-1967, 1993.

COWARD, L.; SMITH, M.; KIRK, M.; BARNES, S. Chemical modification of isoflavones in soyfoods during cooking and processing. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 68, p. 1486S- 1491S, 1998.

DAHL, S. R.; VILLOTA, R. Effect of thermal denaturation on the texturization of soybean protein via twin-screw extrusion. **Canadian Institute of Food Science and Technology**. v. 24, n. 3/4, p. 143-150, 1991.

ELDRIDGE, A. C.; KWOLEK, W. F. Soybean isoflavones: effect of environment and variety on composition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 31, p. 394-396, 1983.

ESAKI, H.; WATANABE, R.; ONOZAKI, H.; KAWAKISHI, S.; OSAWA, T. Formation mechanism for potent antioxidative o-dihydroxyisoflavone in soybeans fermented with *Aspergillus saitoi* Bioscience. **Biotechnology and Biochemistry**. v. 63, n. 5, p. 851-858, 1999.

FARAJ, A.; VASANTHAN, T. Soybean isoflavones: effects of processing and health benefits. **Food Reviews International**. v. 20, n. 1, p. 51-75, 2004.

FARMAKALIDIS, E.; MURPHY, P. A. Isolation of 6"-O-acetylgenistin and 6"-O-acetyldaidzin from toasted defatted soyflakes. **The Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 33, p. 385-389, 1985.

FENNER, G. P. Low-temperature treatment of soybean (*Glycine max*) isoflavonoid aglycon extracts improves gas chromatographic resolution. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 44, n. 5, p. 3727-3729, 1996.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Department of Health and Human Services. Food labeling: general requirements for health claims for food. **Fed Regist**. v. 56, p. 60537-66, 1991.

FRANKE, A. A.; CUSTER, L. J.; WANG, W.; SHI, C. Y. HPLC analysis of isoflavonoids and other phenolic agents from foods and from human fluids. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**. v. 217, p. 263-273, 1998.

GALLETI, S. R. Introdução a microscopia eletrônica. **Biológico**. V. 65, n. ½, p. 33-35, 2003.

GARCIA, M. C.; MARINA, M. L.; LABORDA, F.; TORRE, M. Chemical characterization of commercial soybean products. **Food Chemistry**. v. 62, n. 3, p. 325-331, 1998.

GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Determinação de isoflavonas em derivados de soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 21, n. 1, p. 86-93, 2001.

GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Isoflavones in soy-based foods consumed in Brazil: levels, distribution, and estimated intake. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 50, p. 5987-5993, 2002.

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

GÓES-FAVONI, S. P.; BELÉIA, A. D. P.; CARRÃO-PANIZZI M. C. Efeito da hidratação sobre a atividade de β -glicosidase da soja [*Glycine max* (L.) Merrill]. In: **XIX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 2004, Recife, Pernambuco. Anais ... Recife, 2004 a

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

GRÜN, I. U.; ADHIKARI, K.; LI, C.; LI, Y.; LIN, B.; ZHANG, J.; FERNANDO, L. N. Changes in the profile of genistein, daidzein and their conjugates during thermal processing of tofu. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 49, n. 6, p. 2839-2843, 2001

HAGER, D. F. Effects of extrusion upon soy concentrate solubility. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 32, p. 293, 1984.

HELFERICH, B. Dietary estrogens: A balance of risk and benefits. **Food Technology**. v. 50, n. 9, p. 158, 1996.

HOECK, J. A.; FEHR, W. R.; MURPHY, P. A.; WELKE, G. A. Influence of genotype and environment on isoflavone contents of soybean. **Crop Science**. v. 40, p. 48-51, 2000.

HORVATH, E.; CZUKOR, B. Effect of extrusion temperature and initial moisture content on the protein solubility and distribution in full fat soybean. **Acta Alimentaria**. v. 22, n. 2, p. 151-167, 1993.

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.

HUANG, H.; LIANG, H.; KWOK, K. C. Effect of thermal processing on genistein, daidzein and glycitein content in soymilk. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 86, p. 1110-1114, 2006.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. São Paulo, v. 1, 1985.

INSTITUTO DE FÍSICA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Microscopia eletrônica de varredura. Disponível em: <http://www.fap01.if.usp.br>. Acesso em: 01 mar. 2007.

IZUMI, T.; PISKULA, M. K.; OSAWA, S.; OBATA, A.; TOBE, K.; SAITO, M.; KATAOKA, S.; KUBOTA, Y.; KIKUCHI, M. Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. **The Journal of Nutrition**. v. 130, p. 1695-1699, 2000

KAO, T. H.; LU, Y. F.; HSIEH, H. C.; CHEN, B. H. Stability of isoflavone glucosides during processing of soymilk and tofu. **Food Research International**. v. 37, p. 891-900, 2004.

KAWAKAMI, Y.; TSURUGASAKI, W.; NAKAMURA, S.; OSADA, K. Comparison of regulative functions between dietary soy isoflavones aglycone and glucoside on lipid metabolism in rats fed cholesterol. **Journal of Nutritional Biochemistry**. v. 16, p. 205-212, 2005.

KOGAN, M. Natural chemical in plant resistance to insects. **Iowa State Journal of Research**. v. 60, n. 4, p. 501-527, 1986.

KOLES, S. The potential effects of soy in the prevention of breast cancer. Disponível em: <http://www.ag.uiuc.edu/~stratsoy/new/indexes/everything.html>. Acesso em: 23 jul. 2000.

- KOSSLAK, R. M.; JOSHI, R. S.; BOWEN, B. A.; PAAREN, E. R. Strain-specific inhibition of nod gene induction in *Bradyrhizobium japonicum* by flavonoid compounds. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 56, n. 5, p. 1333-1341, 1990.
- KUDOU, S.; FLEURY, Y.; WELTI, D.; MAGNOLATO, D.; UCHIDA, T.; KITAMURA, K.; OKUBO, K. Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds (*Glycine max* Merrill). **Agricultural and Biological Chemistry**. v. 55, n. 9, p. 2227-2233, 1991.
- KURZER, M. S.; XU, X. Dietary phytoestrogens. **Annual Reviews Nutrition**. v. 17, p. 353-381, 1997.
- LAJOLO, F.M. Alimentos funcionais: uma visão geral. In: DE ANGELIS, R.C. **Importância de alimentos vegetais na proteção da saúde: fisiologia da nutrição protetora e preventiva de enfermidades degenerativas**, São Paulo: Editora Atheneu, 2001.
- LEE, H. P.; GOURLEY, L.; DUFFY, S. W.; LEE, J. E.; DAY, N. E. Dietary effects on breast-cancer risk in Singapore. **Lancet**. v. 337, p. 1197-1200, 1991.
- LEE, S. J.; AHN, J. K.; KIM, S. H.; KIM, J. T.; HAN, S. H.; JUNG, M. Y.; CHUNG, I. M. Variation in isoflavone of soybean cultivars with location and storage duration. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 51, p. 3382-3389, 2003.
- LI, D.; YEE, J. A.; MCGUIRE, M. H.; MURPHY, P. A.; YAN, L. Soybean isoflavones reduce experimental metastasis in mice. **The Journal of Nutrition**. v. 129, n. 5, p. 1075-1078, 1999.
- LIU, K. Current constraints in soybean food utilization and efforts to overcome them. In: World Soybean Research Conference VI. **Proceedings...** Chicago, 1999. p. 409-418.
- LIU, K. S. **Soybeans: chemistry, technology and utilization**. IPT. New York p. 83-93, 1997.
- MACHADO, W. C. P. Farinha texturizada de soja germinada: avaliação das propriedades funcionais. Londrina, 1993. **Dissertação** (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina.
- MÄKELÄ, S. I.; PYLKKÄNEN, L. H.; SANTTI, R. S. S.; ADLERCREUTZ, H. Dietary soybean may be antiestrogenic in male mice. **The Journal of Nutrition**. v. 125, n. 3, p. 437-445, 1995.

MATSUDA, S.; MIYAZAKI, T.; MATSUMOTO, Y.; OHBA, R.; TERAMOTO, Y.; OHTA, N.; UEDA, S. Hydrolysis of isoflavones in soybean coodek syrup by *Lactobacillus casei* subsp. *Rhamnosus* IFO 3425. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. v. 74, n. 5, p. 301-304, 1992.

MATSUDA, S.; NORIMOTO, F.; MATSUMOTO, Y.; OHBA, R.; TERAMOTO, Y.; OHTA, N.; UEDA, S. Solubilization of a novel isoflavone glycoside-hydrolyzing β -glucosidase from *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. v. 77, n. 4, p. 439-441, 1994.

MATSUURA, M.; OBATA, A.; HUKUSHIMA, D. Objectionable flavor of soy milk developed during the soaking of soybeans and its control. **Journal of Food Science**. v. 54, n. 3, p. 602-605, 1989

MATSUURA, M.; OBATA, A. β -glucosidases from soybeans hydrolyse daidzin and genistin. **Journal of Food Science**. v. 58, n. 1, p. 144-147, 1993.

MENG, Q-E.; LEWIS, P.; WÄHÄLÄ, K.; ADERLERCREUTZ, H.; TIKKANEMN, M. J. Incorporation of esterified soybean isoflavones with antioxidant activity into low density lipoprotein. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1438, p. 369-376, 1999.

MESSINA, M. Soy and breast cancer risk. **The Soy Connection**. v. 7, n. 1, p. 1-7, 1999a.

MESSINA, M. J. Legumes and soybeans: overview of their nutrition profiles and health effects. **American Journal of Clinical Nutrition**. v. 70S, p. 439-450, 1999b.

MESSINA, M. Soy as a possible alternative to hormone replacement therapy. Disponível em: <<http://www.soyfoods.com/symposium>>. Acesso em: 23 jul. 2000.

MOLTENI, A.; BRIZIO-MOLTENI, L.; PERSKY, V. In vitro hormonal effects of soybean isoflavones. **The Journal of Nutrition**. v. 125, n. 3, p. 751S-756S, 1995.

MORAES, R. M. A.; JOSE, I. C.; RAMOS, F. G.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Caracterização bioquímica de linhagens de soja com alto teor de proteína. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 41, n. 5, p. 725-729, 2006.

MORAIS, A. A. C.; SILVA, A. L. Soja: suas aplicações. Rio de Janeiro: **MEDSI**, 259 p. 1996.

MORAIS, A. A. C. Uso da soja em medicina. In: ANAIS DO I SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE OS BENEFÍCIOS DA SOJA PARA A SAÚDE HUMANA, 2001, Londrina. **Anais ...** Londrina: Embrapa Soja, p. 15-18, 2001.

MOREIRA, M. A. Programa de melhoramento genético da qualidade de óleo e proteína da soja desenvolvido na UFV. **In: Congresso Brasileiro de Soja**, Londrina, p. 99-104, 1999.

MURPHY, P. A.; SONG, T.; BUSEMAN, G.; BARUA, K.; BEECHER, G. R.; TRAINER, D.; HOLDEN, J. Isoflavones in retail and institutional soy foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 47, p. 2697-2704, 1999.

MURPHY, P. A.; BARUA, K.; HAUCK, C. C. Solvent extraction selection in the determination of isoflavonas in soy foods. **Journal of Chromatography B**. v. 777, p. 129-138, 2002.

NEVEN, L. Isoflavones - na overview of benefits for health and market. **Agro Food Industry Hi Tech**. p. 39-41, 1998.

NICOLOSI, R. J.; WILSON, T. A. The anti-atherogenic effect of dietary soybean protein concentrate in hamsters. **Nutrition Research**. v. 17, n. 9, p. 1457-1467, 1997.

PARK, Y. K.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; MASCARENHAS, H. A. A.; SCAMPARINI, A. R. P. Avaliação do teor de isoflavonas em soja brasileira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 3, n.3, p. 156-160, 2001.

PARK, K. J. & ANTONIO, G. C. Análise de materiais biológicos. Disponível em: http://www.feagri.unicamp.br/ctea/manuais/analise_matbiologico.pdf. Acesso em: 22 nov. 2006.

PIRES, C. V.; OLIVEIRA, M. G. A.; ROSA, J. C.; COSTA, N. M. B. Qualidade nutricional e escore químico de aminoácidos de diferentes fontes protéicas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 16, n. 1, p. 179-187, 2006.

POTTER, S. M.; BAUM, J. A.; TENG, H.; STILLMAN, R. J.; SHAY, N. F.; ERDMAN JR, J. W. Soy protein and isoflavonas: their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 68, p. 1357S-1359S, 1998.

- REN, M. Q.; KUHN, G.; WEGNER, J.; CHEN, J. Isoflavones, substances with multi-biological and clinical properties. **European Journal of Nutrition**. v. 40, n. 4, p. 135-146, 2001.
- RIAZ, M. N. Introduction to extruders and their principles. In: RIAZ, M. N. Extruders in food applications. **CRC Press**. 2000. cap. 1, p. 1-24.
- RIBEIRO, M. L. L.; MANDARINO, J. M. G.; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; OLIVEIRA, M. C. N.; CAMPO, C. B. H.; 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.
- ROKEY, G. J. Single-screw extruders. In: RIAZ, M. N. Extruders in food applications. **CRC Press**. 2000. cap. 2, p. 25-50.
- ROSTAGNO, M. A.; PALMA, M.; BARROSO, C. G. Short-term stability of soy isoflavones extracts: sample conversion aspects. **Food Chem**, v. 93, p. 557-564, 2005.
- RUIZ-LARREA, M. B.; RUIZ-SANZ, J. I. Fitoestrógenos y salud. **Revisión Temática**. Disponível em: <http://www.antioxidantes.com.ar/Art211.htm>. Acesso em: 26 fev. 2007.
- SAS/STAT® Software Version 8.2 of the system for Windows, Copyright © 1999:2001. SAS Institute Inc. Cary, NC, USA.
- SETCHELL, K. D. R. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology and implications for human health of soy isoflavones. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 68, p. 1333S-1346S, 1998.
- SETCHELL, K. D. CASSIDY, A. Dietary isoflavonas: biological effects and relevance to human health. **The Journal of Nutrition**. v. 129, p. 758S-767S, 1999.
- SETCHELL, K. D. Absorption and metabolism of soy isoflavones – from food to dietary supplements and adults to infants. **The Journal of Nutrition**. v. 130, p. 654S-655S, 2000.
- SETCHELL, K. D. R.; BROWN, N. M.; DESAI, P.; ZIMMER-NECHEMIAS, L.; WOLFE, B. E.; BRASHEAR, W. T.; KIRSCHNER, A. S.; CASSIDY, A.; HEUBI, J. E. Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. **The Journal of Nutrition**. v. 131, p. 1362S-1375S, 2001

SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An analysis of variance test for normality. **Biometrika**, Oxford, v. 52, p. 591-611, 1965.

SINGLETERY, K.; FALLER, J.; LI, J. Y.; MAHUNGU, S. Effect of extrusion on isoflavone content and antiproliferative bioactivity of soy/corn mixtures. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 48, n. 8, p. 3566-3571, 2000.

SONG, T.; BARUA, K.; BUSEMAM, G.; MURPHY, P. A. Soy isoflavone analysis: quality control and a new internal standard. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 68, p. 1474S-1479S, 1998.

TAVARES, G. M.; PITANGA, K. C.; SILVA, M. A. T.; MORAIS, A. A. C. A soja como alimento funcional na prevenção do câncer. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**. v. 15, n. 2, p. 321-325, 2000.

TODA, T.; SAKAMOTO, A.; TAKAYANAGI, T.; YOKOTSUKA, K. Changes in isoflavone compositions of soybean foods during cooking process. **Food Science and Technology Research**. v. 6, n. 4, p. 314-319, 2000.

TODA, T.; SAKAMOTO, A.; TAKAYANAGI, T.; YOKOTSUKA, K. Changes in isoflavone compositions of soybean during soaking in water. **Food Science and Technology Research**. v. 7, n. 2, p. 171-175, 2001.

TSANGALIS, D.; ASHTON, J. F.; MCGILL, A. E. J.; SHAH, N. P. Biotransformation of isoflavones by bifidobacteria in fermented soymilk supplemented with D-glucose and L-cysteine. **Journal of Food Science**. v. 68, n. 2, p. 623-631, 2003.

TSUKAMOTO, C.; SHIMADA, S.; IGITA, K.; KUDOU, S.; KOKUBUN, M.; OKUBO, K.; KITAMURA, K. Factors affecting isoflavone content in soybean seeds: changes in isoflavones, saponins and composition of fatty acids at different temperatures during seed development. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 43, p. 1184-1192, 1995.

TUKEY, J. W. One degree of freedom for non-additivity. **Biometrics**. v. 5, p. 232-242, 1949.

VIEIRA, C. R.; CABRAL, L. C.; PAULA, A. C. O. Proximate composition and amino acid, and fatty acid and mineral contents of six soybean cultivars for human consumption. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 34, p. 1277-1283, 1999.

VIOLA, E. S. Uso de soja integral em dietas de suínos e aves: oportunidades e entraves. In: ANAIS DO CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 1999, Londrina. **Anais...** Londrina: Embrapa Soja, p. 176-182, 1999.

WANG, H-J.; MURPHY, P. A Isoflavone content in commercial soybean foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 42, p. 1666-1673, 1994 a.

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 Cmenistry**. v. 42, p. 1674-1677, 1994 b.

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

WILCOX, J. R.; SHIBLES, R. M. Interrelationships among seed quality attributes in soybean. **Crop Science**. v. 41, p.11-14, 2001

WOLF, W. J. Soybean ultrastructure and its relationship to processing. In: SYMPOSIUM: SEED PROTEINS, 1972, Connecticut. **The Avipub. Co**, 1972.

XIE. L.; HETTIARACHCHY, N. S.; CAI, R.; TSURUHAMI, K.; KOIKEDA, S. Conversion of isoflavone glucosides to aglycones in soy life and soy meal using β -glycosidase. **Journal of Food Science**. v. 68, n. 2, p. 427-430, 2003.

ZHANG, Y.; WANG, G-J.; SONG, T. T.; MURPHY, P. A.; HENDRICH, S. Urinary disposition of the soybean isoflavones daidzein, genistein and glycitein differs among humans with moderate fecal isoflavone degradation activity. **Journal of Nutrition**. v. 129, p. 957-962, 1999.

ZHANG, Y. C.; LEE, J. H.; VODOVOTZ, Y.; SCHWARTZ, S. Changes in distribution of isoflavones and β -Glucosidase activity during soy bread proofing and baking. **Cereal Chemistry**. v. 81, n. 6, p. 741-745, 2004.

ZONTA, E. P.; MACHADO, A. A.; JUNIOR, P. S. Sistema de análise estatística – SANEST, Registro na SEI nº 066060, Pelotas, RS, 1982.

ANEXOS

ANEXO A

**Massa molar das isoflavonas nos cotilédones de soja da safra 2004 tratados
com volume de água reduzido**

ANEXO A –

Massa molar das isoflavonas (μMol) nos cotilédones de soja da safra 2004 submetidos a desengorduramento e tratamento hidrotérmico a 50°C por 12 horas (1:1,2; soja:água; p:p).

	β -Glicosídeos	Malonil	Agliconas	Total
Cotilédones	0,88	1,61	ND*	2,5
Cotilédones Desengordurados	0,88	1,58	0,03	2,5
Cotilédones Tratados	0,68	1,07	0,50	2,2
Cotilédones Tratados Desengordurados	0,67	1,08	0,55	2,3

*ND = Não Detectado

Massa molar das isoflavonas (μMol) nos cotilédones de soja da safra 2005 submetidos a desengorduramento e tratamento hidrotérmico a 50°C por 12 horas (1:3 soja:água; p:p) e na água de hidratação.

	β -Glicosídeos	Malonil	Agliconas	Total
Cotilédones	0,68	1,38	0,07	2,1
Cotilédones Desengordurados	0,64	1,38	0,10	2,1
Cotilédones Tratados	0,29	0,70	0,75	1,7
Cotilédones Tratados Desengordurados	0,29	0,69	0,82	1,8
Água de Hidratação	0,13	0,08	0,09	0,3

*ND = Não Detectado

ANEXO B

Massa molar das isoflavonas (μMol) nas farinhas e PTS não tratadas e tratadas

ANEXO B –**Massa molar das isoflavonas (μMol) nas farinhas e PTS não tratadas e tratadas**

	β-Glicosídeos	Malonil	Acetil	Agliconas	Total
Farinha de Soja Não Tratada (FSD 2005)	0,7	1,3	ND*	0,1	2,1
PTS Não Tratada	0,8	0,6	0,6	0,1	2,1
Farinha de Soja Tratada (FSDT 2005)	0,3	0,7	ND	0,8	1,8
PTS Tratada	0,3	0,2	0,3	1,0	1,8

*ND = Não Detectado