



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

FERNANDO SANCHES DE LIMA

**OTIMIZAÇÃO DO TRATAMENTO HIDROTÉRMICO DA SOJA
PARA CONVERSÃO DE ISOFLAVONAS GLICOSILADAS EM
AGLICONAS**

FERNANDO SANCHES DE LIMA

**OTIMIZAÇÃO DO TRATAMENTO HIDROTÉRMICO DA SOJA
PARA CONVERSÃO DE ISOFLAVONAS GLICOSILADAS EM
AGLICONAS**

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

Orientadora: Profa. Dra. Elza Louko Ida.

Londrina
2013

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

L732o Lima, Fernando Sanches de.
Otimização do tratamento hidrotérmico da soja para conversão de isoflavonas glicosiladas em agliconas / Fernando Sanches de Lima. - Londrina, 2013.
72 f. : il.

Orientador: Elza louko Ida.
Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2013.
Inclui bibliografia.

1. Soja - Tratamento hidrotérmico - Teses. 2. Isoflavonas - Teses. 3. Compostos bioativos - Teses. 4. Soja - Processamento - Teses. I. Ida, Elza louko. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. III. Título.

CDU 664.6/.7

FERNANDO SANCHES DE LIMA

**OTIMIZAÇÃO DO TRATAMENTO HIDROTÉRMICO DA SOJA PARA
CONVERSÃO DE ISOFLAVONAS GLICOSILADAS EM AGLICONAS**

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

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Elza Louko Ida
UEL – Londrina – PR

Profa. Dra. Louise Emy Kurozawa
UEL – Londrina – PR

Prof. Dr. Ivo Mottin Demiate
UEPG – Ponta Grossa – PR

Londrina, 17 de outubro de 2013.

Dedico

A Deus, Pela graça, fé e coragem que tem me concedido durante toda a minha trajetória. O Senhor tem guardado a minha família e nos enchido com a sua paz. À minha mãe Marli Sanches, que sempre tem orado a Deus pela minha vida. Obrigado por entender a minha ausência em muitos momentos e saiba que eu te amo. Aos meus amados irmãos Roberto Sanches de Lima, Lucas Sanches de Oliveira e Luana Sanches de Oliveira, pelo respeito e carinho.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Elza Louko Ida, pela orientação, respeito e incentivo. Obrigado pela sua amizade sincera e confiança no meu trabalho. Agradeço por ter acreditado no meu potencial para mudança de nível Mestrado para Doutorado dentro do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos.

Às minhas grandes amigas Lilian Cândido Aguilár e Mirelle Izzo Fernandes, amigadas sinceras que conquistei durante a minha experiência profissional e que sempre permanecerão.

Aos amigos Tahis R. Baú, Bruna Yoshida, Melina Cardoso, Daniele C. B. Honorato, Alécio Quinhone Júnior, Suzana T. Matsubara, Naiara R. Ricardo, Fernanda C. Henrique, Marcela C. Santos, Karla B. Guergoletto, Paulo T. Carvalho, Angélica Ishikawa, Maria Rita A. Porto e Gislaine S. Simões pelo respeito, colaboração e momentos de descontração. Em especial, às grandes amigas Melissa Pagnan e Cíntia Ladeira Handa. Deus colocou vocês duas no meu caminho.

Aos estagiários de Iniciação Científica Aline Heloisa Vicensoti e Uenifer Couto pelo profissionalismo e comprometimento.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da UEL, pela grande contribuição na minha maturidade intelectual como pesquisador. Em especial, ao Prof. Dr. Fábio Yamashita e Pós-Doutoranda Josemeyre B. da Silva pelas contribuições durante a execução do meu projeto de pesquisa, além da amizade.

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

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

LIMA, Fernando Sanches de. **Otimização do tratamento hidrotérmico da soja para conversão de isoflavonas glicosiladas em agliconas.** 2013. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

RESUMO

Os metabólitos secundários de espécies vegetais têm sido amplamente caracterizados como compostos bioativos. Dentre estas substâncias, as isoflavonas da soja [*Glycine max* (L.) Merrill] são uma das mais estudadas, sendo as agliconas destacadas pelos seus potenciais benefícios à saúde humana. O tratamento hidrotérmico dos grãos de soja ativa a β -glicosidase endógena e favorece a formação de agliconas no grão hidratado. O objetivo deste trabalho foi otimizar as condições de tratamento hidrotérmico dos grãos de soja para máxima conversão de isoflavonas glicosiladas em agliconas. Os grãos de soja, cultivar BRS 257, foram hidratados em solução tampão citrato-fosfato 0,05 M e pH 6 na proporção 1:1,5 (m/m, soja: solução tampão) sob diferentes combinações de tempo e temperatura, utilizando um planejamento composto central rotacional (PCCR). A atividade de β -glicosidase foi avaliada pelo método espectrofotométrico e a separação e quantificação das isoflavonas foram realizadas por cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE). A máxima concentração de agliconas nos grãos hidratados ($1,22 \mu\text{mol g}^{-1}$) foi estimada e validada a $55 \text{ }^\circ\text{C}$ e 6 h de hidratação. Nesta condição, os grãos hidratados apresentaram um conteúdo mínimo de β -glicosídeos ($0,18 \mu\text{mol g}^{-1}$) e baixa atividade de β -glicosidase ($0,015 \text{ UA g}^{-1}$). A máxima concentração de agliconas na solução residual de hidratação ($2,41 \mu\text{mol}/100 \text{ mL}$) foi estimada a $55 \text{ }^\circ\text{C}$ e 8,83 h de hidratação. Os malonilglicosídeos, que representaram 88,76 % da concentração molar de isoflavonas totais no grão de soja bruto, foram as isoflavonas mais instáveis termicamente e um mínimo conteúdo destas no grão hidratado ($4,59 \mu\text{mol g}^{-1}$) foi estimado a $69,14 \text{ }^\circ\text{C}$, independente do tempo de hidratação. Nesta condição, foi estimada uma redução de 29,9 % na massa de isoflavonas no sistema em relação ao grão de soja bruto. Os resultados deste estudo podem contribuir para a elaboração de produtos de soja com maior conteúdo de agliconas a partir de grãos de soja tratados hidrotérmicamente. Além disso, houve uma considerável redução no tempo de hidratação dos grãos de soja em relação aos processos tradicionais que utilizam esta como etapa preliminar ao preparo de alimentos de soja.

Palavras-chave: Compostos bioativos. Isoflavonas. Tratamento hidrotérmico. β -glicosidase. Planejamento composto central rotacional.

LIMA, Fernando Sanches de. **Optimisation of soybean hydrothermal treatment for the conversion of glucosylated isoflavones to aglycones.** 2013. 72 f. Dissertation (Master's Degree in Food Science) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

ABSTRACT

The secondary metabolites of plant species have been widely characterized as bioactive compounds. Among these substances, the isoflavones from soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] have been one of the most studied, and the aglycone highlighted for their potential benefits on human health. The soybean hydrothermal treatment activates the endogenous β -glucosidase and favors the formation of aglycones into soaked grain. The aim of this work was to optimise the conditions of the soybean hydrothermal treatment to convert the maximum glucosylated isoflavones into aglycones. The soybeans, cultivar BRS 257, were soaked in 1:1.5 (w/w) ratio with a 0.05 M phosphate-citrate buffer solution (pH 6.0) under different time and temperature combinations using central composite design rotational (CCDR). The β -glucosidase activity was measured by spectrophotometric method, and the separation and quantification of isoflavones performed by ultra high performance liquid chromatography (UHPLC). The maximum concentration of aglycones in soaked grains ($1.22 \text{ } \mu\text{mol g}^{-1}$) was estimated and validated at $55 \text{ } ^\circ\text{C}$ and 6 h of soaking. In this condition, the soaked soybean grains showed a minimum content of β -glucosides ($0.18 \text{ } \mu\text{mol g}^{-1}$) and low β -glucosidase activity (0.015 AU g^{-1}). The maximum concentration of aglycones in residual soak solution ($2.41 \text{ } \mu\text{mol}/100 \text{ mL}$) was estimated at $55 \text{ } ^\circ\text{C}$ and 8.83 h of soaking. The malonylglucosides accounted 88.76 % of the total isoflavones molar concentration in the whole soybean grain and were more thermally unstable, with minimum content in soaked grain ($4.59 \text{ } \mu\text{mol g}^{-1}$) estimated at $69.14 \text{ } ^\circ\text{C}$ independent of soaking time. In this condition, was estimated a 29.9 % mass reduction of isoflavones in the system in relation to whole soybean. The results of this study may contribute to the preparation of soy products with high content of aglycones from hydrothermally treated soybeans. Furthermore, there was considerable reduction in the soaking time of soybeans by comparing to traditional processes, which use this as preliminary step to the preparation of soy foods.

Keywords: Bioactive compounds. Isoflavones. Hydrothermal treatment. β -glucosidase. Central composite design rotational.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Estrutura química genérica das isoflavonas da soja e possíveis modificações por clivagem de ligações 18
- Figura 2** – Biossíntese da daidzeína 19
- Figura 3** – Estrutura química das agliconas (1, 2, 3), equol (4) e estradiol (5).....25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estrutura química das 12 isoflavonas da soja	18
Tabela 2 – Variáveis independentes e níveis codificados para o tratamento hidrotérmico dos grãos de soja.....	34
Tabela 3 – Planejamento central composto rotacional (PCCR) aplicado ao tratamento hidrotérmico dos grãos de soja	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGLRs	<i>total aglycones in the residual solution</i>
AGLss	<i>total aglycones in the soaked soybean</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
DIAAS	<i>Digestible Indispensable Amino Acid Score</i>
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
GHE	grãos hidratados e enxugados
GL	grãos lavados
GLUss	<i>total / β-glucosides in the soaked soybean</i>
M.GLUss	<i>total malonylglucosides in the soaked soybean</i>
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
Ms	massa do sistema
PCCR	Planejamento Composto Central Rotacional
PDCAAS	<i>Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score</i>
SR	solução residual
ST	solução tampão
TISOss+Rs	<i>total isoflavones in soaked soybean and the residual solution</i>
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i>
USFDA	<i>United States Food and Drug Administration</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
β GLUss	<i>β-glucosidase activity in the soaked soybean</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	13
2.1	OBJETIVO GERAL	13
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1	ASPECTOS GERAIS DA SOJA	14
3.2	ISOFLAVONAS DA SOJA	17
3.2.1	Benefícios à Saúde	22
3.3	TRATAMENTOS HIDROTÉRMICOS DE GRÃOS DE SOJA	26
4	MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1	MATÉRIA-PRIMA E REAGENTES	32
4.2	PROCEDIMENTOS	32
4.2.1	Tratamento Hidrotérmico dos Grãos de Soja	32
4.3	MÉTODOS ANALÍTICOS	35
4.3.1	Determinação da Atividade da β -glicosidase	35
4.3.2	Análise de Isoflavonas	36
4.3.2.1	Extração e quantificação de isoflavonas por cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE)	36
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
6.1	ARTIGO CIENTÍFICO	49
6.1.1	Optimisation of Soybean Hydrothermal treatment for the Conversion of β -glucoside Isoflavones to Aglycones	49
7	CONCLUSÃO	71
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	72

1 INTRODUÇÃO

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é uma cultura agrícola de grande importância na economia mundial, sendo que na safra de 2012/2013 a expectativa é que o Brasil lidere o *ranking* de maior produtor mundial de soja (USDA, 2013).

O interesse da população ocidental por uma alimentação mais saudável, de alta qualidade proteica e baixo teor de gordura saturada, tem estimulado cada vez mais o consumo de produtos à base de soja, tais como o *tofu*, *miso*, *tempeh*, *natto*, *shoyu* e a proteína texturizada de soja (LIU, 2004; RIAZ, 2006).

Com base em evidências científicas, a *Food and Drug Administration* (FDA), desde 1999, aprovou que os produtos de soja contendo no mínimo 6,25 g de proteína de soja por porção pudessem ter a seguinte alegação no rótulo: "O consumo diário de 25 g de proteína de soja, como parte de uma dieta pobre em gordura saturada e colesterol, pode reduzir o risco de doença cardíaca" (USFDA, 1999). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), desde 2002, também aprova descrições similares na rotulagem de alimentos derivados de soja (BRASIL, 2013). Contudo, há grande variabilidade dos resultados de ensaios clínicos e uma relação de causa e efeito não tem sido bem estabelecida entre o consumo de proteína de soja e a redução das concentrações de colesterol LDL no sangue. Desta forma, a comunidade científica das áreas afins tem sugerido uma reavaliação por parte da FDA sobre a categoria "A" de alegações de saúde, que indica o nível máximo de evidência científica, relacionada à proteína de soja (GIRGIH et al., 2013).

O papel fisiológico de vários compostos bioativos presentes em diversas espécies vegetais tem sido extensivamente investigado. Dentre estas substâncias, as isoflavonas da soja vêm sendo amplamente estudadas (LARKIN; PRICE; ASTHEIMER, 2008; FILIBERTO et al., 2013; VITALE et al., 2013).

Na soja e em seus derivados, as isoflavonas ocorrem em quatro classes distintas de estrutura química: agliconas, (β -glicosídeos, malonilglicosídeos e acetilglicosídeos, sendo que cada classe é composta por três formas distintas de isoflavonas, totalizando assim doze formas (KUDOU et al., 1991; LIU, 2004). A capacidade das isoflavonas de reduzir a ocorrência de alguns tipos de câncer e outras doenças crônicas depende em grande parte das propriedades farmacocinéticas destes compostos, em particular, da absorção e distribuição no

tecido-alvo, sendo as agliconas destacadas pela sua maior atividade biológica (LARKIN; PRICE; ASTHEIMER, 2008; GREENDALE et al., 2012; VITALE et al., 2013; WADA et al., 2013). Entretanto, a ANVISA não autoriza nenhuma alegação na rotulagem de alimentos a respeito das isoflavonas, "seja de conteúdo ("contém"), funcional, de saúde e terapêutica (prevenção, tratamento e cura de doenças)" (BRASIL, 2013). Ressalta-se que as isoflavonas são consideradas medicamentos fitoterápicos e necessitam obrigatoriamente de registro para sua comercialização, sendo reconhecidas apenas as indicações para alívio das ondas de calor associadas à menopausa ("fogachos") e como auxiliares na redução dos níveis de colesterol.

O conteúdo e o perfil de isoflavonas nos grãos de soja são dependentes de muitos fatores, como genética e clima da região de cultivo (WANG; MURPHY, 1994; CARRÃO-PANIZZI et al., 1999; BRITZ; SCHOMBURG; KENWORTHY, 2011). As isoflavonas estão sujeitas às conversões em suas formas químicas por meio da ação das β -glicosidases e de processamentos térmicos (WANG; MURPHY, 1996; UZZAN; LABUZA, 2004; VILLARES et al., 2011; MO et al., 2013).

A hidratação da soja é uma etapa muito importante utilizada previamente no preparo de vários produtos de soja. Este processo é responsável pelas mudanças nas características de textura do grão e favorece processamentos posteriores, como trituração e cocção. Uma vez que as isoflavonas glicosiladas podem ser convertidas em agliconas pela ação das (β -glicosidases endógenas da soja, alguns autores têm apontado o tratamento hidrotérmico dos grãos como meio de aumentar a atividade da enzima e, em consequência, favorecer a formação de agliconas (MATSUURA; OBATA; FUKUSHIMA, 1989; SUTIL et al., 2008; GÓES-FAVONI; CARRÃO-PANIZZI; BELÉIA, 2010).

Os tratamentos térmicos empregando calor seco ou úmido, utilizados na elaboração de muitos produtos à base de soja, influenciam significativamente o teor e perfil de isoflavonas (WANG; MURPHY, 1996; HUANG; LIANG; KWOK, 2006; NIAMNUY et al., 2012; SHIN; KIM; KIM, 2013).

Considerando os potenciais benefícios das isoflavonas agliconas à saúde humana, o objetivo deste trabalho foi otimizar o processo de tratamento hidrotérmico dos grãos de soja, visando a conversão de isoflavonas glicosiladas em agliconas. Este trabalho poderá contribuir para a elaboração de produtos de soja com maior teor de agliconas a partir de grãos de soja tratados hidrotérmicamente.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Otimizar as condições de tratamento hidrotérmico dos grãos de soja para máxima conversão de isoflavonas glicosiladas em agliconas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito do tempo e temperatura de tratamento hidrotérmico dos grãos de soja sobre a atividade de (β -glicosidase nos grãos hidratados.

Investigar a migração das isoflavonas para a solução de hidratação, bem como a degradação destas, por meio de um balanço de massa de isoflavonas no sistema.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ASPECTOS GERAIS DA SOJA

A soja teve sua origem há cerca de 5000 anos na China, nas regiões norte e central (LIU, 1997). No Brasil, a soja foi introduzida por volta de 1882. Nesta época, o interesse pela cultura estava ligado principalmente ao seu uso como forrageira e na rotação de culturas agrícolas no campo. A utilização dos grãos era basicamente na alimentação animal, já que seu emprego na indústria ainda era desconhecido (EMBRAPA, 2013).

Essa leguminosa tem se mostrado uma importantíssima *commodity* agrícola na economia de alguns países. Atualmente, os líderes mundiais na produção de soja são os Estados Unidos, Brasil, Argentina, china, Índia e Paraguai (USDA, 2013).

Da produção mundial de soja, 10 % são utilizadas diretamente na alimentação humana (RIAZ, 2006). Muitos dos alimentos à base de soja são utilizados na forma *in natura*, enquanto outros são elaborados com diversos ingredientes proteicos derivados de soja (farinha de soja, concentrado e isolado proteico de soja).

As lipoxigenases (linoleato:oxigênio oxidoredutase, EC 1.13.11.12) são enzimas que catalisam a hidroperoxidação dos ácidos graxos poli-insaturados, principalmente os ácidos linoleico e linolênico, produzindo os mono-hidroperóxidos correspondentes (GIRI; MANGARAJ, 2012). Os compostos voláteis (aldeídos e cetonas) são formados a partir da decomposição dos hidroperóxidos, sendo o hexanal descrito como o principal responsável pelo sabor de "feijão" cru e *flavor* de ranço nos produtos de soja (SILVA et al., 2010). Por meio de melhoramento genético foi possível desenvolver cultivares de soja com características sensoriais desejáveis para alimentação humana. A Empresa Brasileira de pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) desenvolveu a cultivar BRS 257 (genealogia BR93-32109 X BR94-23396) para alimentação humana e a mesma foi testada em ensaios de avaliação preliminar nas safras de 2001 a 2004. Devido à característica de não possuir as enzimas lipoxigenases L1, L2 e L3, torna-se uma matéria-prima importante para a elaboração de produtos de soja, como farinhas e extrato de soja, com sabor mais aceitável pelos ocidentais (MORAES et al., 2007).

A soja se destaca pela sua composição química única. Quando comparada a alguns cereais e outras leguminosas, possui o maior conteúdo proteico, com 40 % de proteínas em base seca. Dentre as leguminosas, apresenta o segundo maior teor lipídico, com 20 % de lipídeos em base seca, perdendo apenas para o amendoim, que apresenta 48 % em base seca. É composta ainda por 30 % de carboidratos, 10 a 13 % de umidade e 5 % de cinzas. Destaca-se, contudo, que essa composição depende de vários fatores, como genótipo da planta, estágio de maturação, localização geográfica de cultivo e outros (LIU, 1997; RIAZ, 2006).

A proteína da soja possui um balanço bastante satisfatório de aminoácidos essenciais (CHEN et al., 2012). A FDA, em 1990, além dos métodos que já haviam sido aprovados para avaliação da qualidade proteica dos alimentos, também adotou o método *protein digestibility corrected amino acid score* (PDCAAS), com o objetivo de melhor estimar a digestibilidade proteica dos alimentos (USFDA, 1990; CHEN, et al., 2012). Contudo, em 2011, os especialistas da FAO sobre a avaliação da qualidade proteica na nutrição humana reavaliaram as limitações e precisão do método PDCAAS e recomendaram a implementação de um novo método, denominado *digestible indispensable amino acid score* (DIAAS), com a finalidade de melhor refletir a quantidade absorvida de cada aminoácido por meio da determinação da digestibilidade destes na porção final do intestino delgado (FAO, 2013). Destaca-se que os índices PDCAAS e DIAAS para os produtos de soja avaliados apresentaram ótimos valores, entre 0,90 e 1,00. Ressalta-se que a caseína, proteína do leite, é tida como referência em qualidade proteica (FAO, 2012).

Após uma sistemática revisão bibliográfica de estudos clínicos relacionados à proteína de soja com alegações de benefícios à saúde a FDA, em 1999, considerou os dados publicados consistentes no que tange à redução dos níveis de colesterol total e colesterol LDL no sangue. A agência autorizou, desde então, que os produtos comercializados nos Estados Unidos com no mínimo 6,25 g de proteína de soja por porção tivessem a seguinte descrição no rótulo "o consumo diário de 25 g de proteína de soja, como parte de uma dieta pobre em gordura saturada e colesterol, pode reduzir o risco de doença cardíaca" (USFDA, 1999). Contudo, há grande variabilidade dos resultados de ensaios clínicos e uma relação de causa e efeito não tem sido bem estabelecida entre o consumo de proteína de soja e a redução das concentrações de colesterol LDL no sangue. Desta forma, a

comunidade científica das áreas afins tem sugerido uma reavaliação por parte da FDA sobre a categoria "A" de alegações de saúde, que indica o nível máximo de evidência científica, relacionada à proteína de soja (GIRGIH et al., 2013).

Tipicamente, o óleo de soja é composto de 25 % de ácido graxo oleico (C18:1n-9), 53 % de ácido graxo linoleico (C18:2n-6) e 7 % de ácido α -linolênico (C18:3n-3). Estes dois últimos são ácidos graxos essenciais conhecidos como ω -6 e ω -3, respectivamente, sendo que o ω -3 está associado à diminuição do risco de doenças cardiovasculares (NAIR et al., 1997; ZHAO et al., 2004; DECKELBAUM; TORREJON, 2012). Devido às insaturações presentes na cadeia do ácido linolênico, o mesmo torna-se bastante suscetível à oxidação pela ação da enzima lipoxigenase, sendo o *n*-hexanal um dos produtos secundários da reação oxidativa. O teor de *n*-hexanal tem apresentado uma correlação positiva com o atributo aroma de grão cozido em produtos derivados de soja (WILSON, 1996; SILVA et al., 2010; SILVA et al., 2012).

Os carboidratos solúveis e insolúveis também são constituintes importantes da soja. A rafinose e estaquiose são oligossacarídeos solúveis, não redutores e não digeríveis no sistema digestório de humanos, sendo metabolizados por bactérias bífidas que sintetizam a enzima α -galactosidase (hidrolisam as ligações α -galactosídicas presentes nesses oligossacarídeos), produzindo gases que criam desconforto e flatulência em alguns indivíduos. Contudo, há evidências de contribuições benéficas destes açúcares, utilizando-os como prebióticos na estimulação do crescimento de bifidobactérias, que são promotoras de saúde do cólon (HOU; YU; CHOU, 2000; YEO; LIONG, 2010; INOBUCHI et al., 2012). Os carboidratos não disponíveis ou fibra alimentar são constituídos essencialmente por celulose, hemicelulose e pectina. Quantidades adequadas de fibra na alimentação ajudam a melhorar o trânsito intestinal. Várias pesquisas médicas têm demonstrado a importância das fibras na saúde humana, como na redução dos níveis de colesterol em alguns indivíduos hiperlipidêmicos (KUSHI; MEYER; JACOBS, 1999) e efeitos anti-inflamatórios e anticancerígenos no sistema digestório (SCHEPPACH et al., 2004; ANDERSON et al., 2009; COLEMAN et al., 2013).

Os principais minerais da soja são: potássio, sódio, cálcio, magnésio, enxofre e fósforo. As principais vitaminas hidrossolúveis da soja incluem a tiamina, riboflavina, niacina, ácido pantotênico, biotina, ácido fólico, inositol e colina (LIU, 2004).

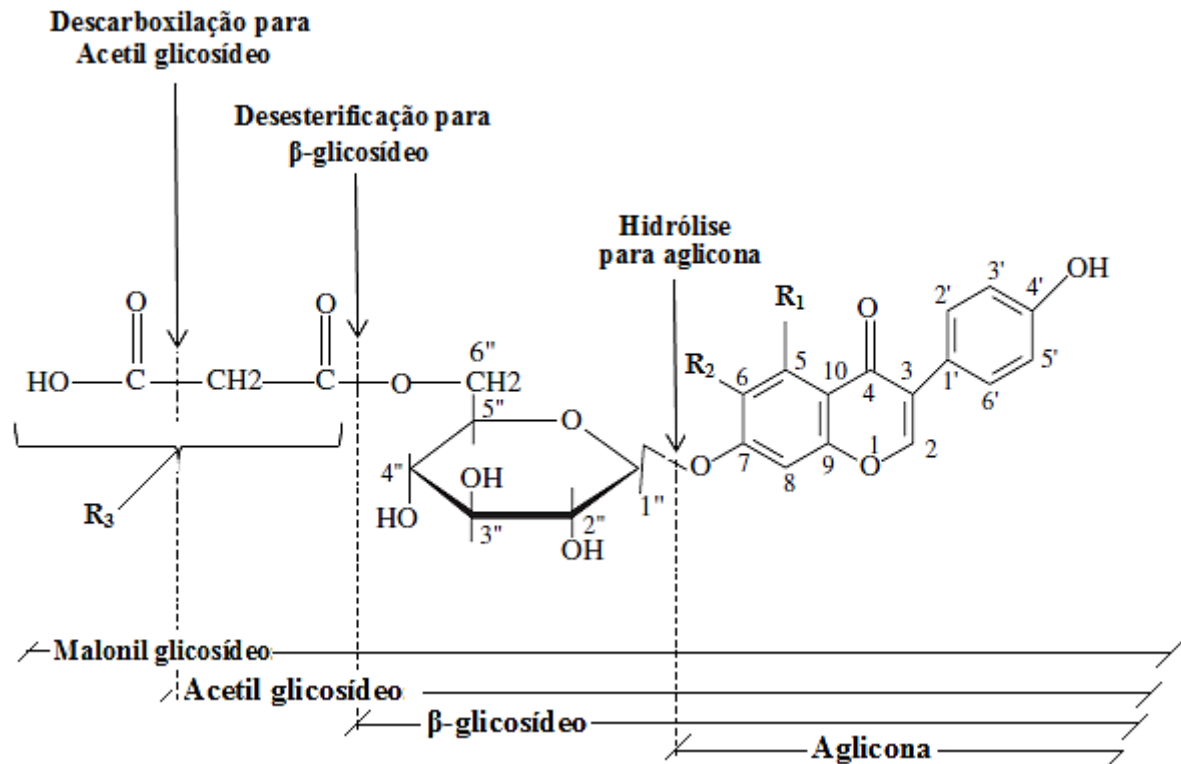
Ressalta-se que as excelentes propriedades funcionais tecnológicas de derivados proteicos de soja (farinhas, proteína texturizada, concentrados e isolados proteicos), como a capacidade de absorção e retenção de água, propriedades emulsificantes e geleificantes, além das suas características nutricionais, têm estimulado cada vez mais a inserção da soja nos sistemas alimentares (JOHSON; WHITE; GALLOWAY, 2008; CHEN et al., 2012).

3.2 ISOFLAVONAS DA SOJA

As isoflavonas correspondem a uma subclasse de substâncias dentro do grupo dos flavonoides. Este compreende um grande número de compostos polifenólicos (além das isoflavonas) encontrados em diversas espécies vegetais. A estrutura química básica das isoflavonas tem em comum um anel aromático condensado a uma cadeia alifática, geralmente um anel pirano, que se liga a outro anel aromático por meio do carbono de posição 3 (LIU, 2004).

Na soja e em seus derivados podem existir doze formas de isoflavonas, divididas em quatro grupos: agliconas (daidzeína, genisteína e gliciteína), (β -glicosídeos (daidzina, genistina e glicitina), acetilglicosídeos (6"-O-acetildaidzina, 6"-O-acetilgenistina e 6"-O-acetilglicitina) e malonilglicosídeos (6"-O-malonildaidzina, 6"-O-malonilgenistina e 6"-O-malonilglicitina) (LIU, 2004; KUDOU et al., 1991). Estas estruturas diferem entre si na constituição dos radicais R_1 , R_2 e R_3 indicados na Figura 1 e relacionados na Tabela 1.

Figura 1 – Estrutura química genérica das isoflavonas da soja e possíveis modificações por clivagem de ligações.



Fonte: Adaptado de Faraj e Vasanthan (2004).

Tabela 1 – Estrutura química das 12 isoflavonas da soja.

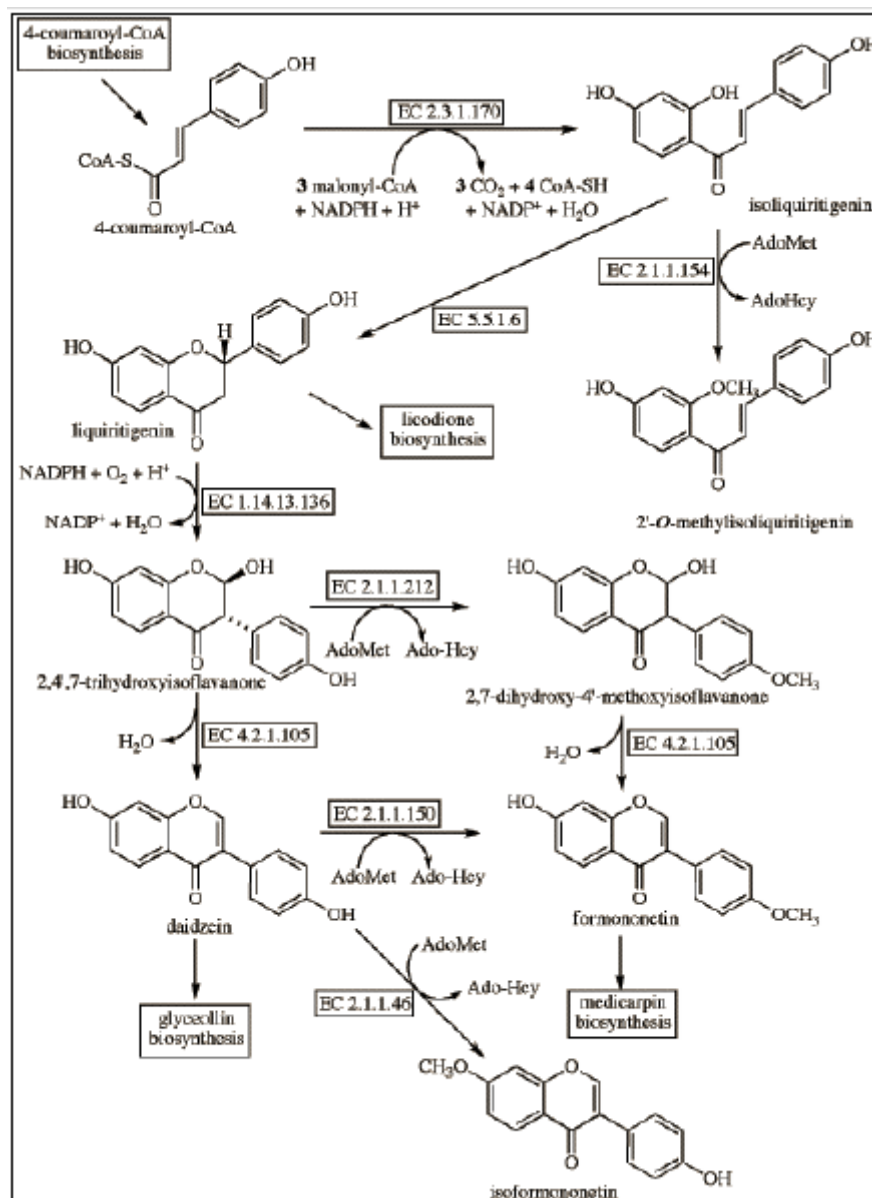
Grupos	Isoflavonas	R ₁	R ₂	R ₃
Agliconas	Daidzeína	-H	-H	-
	Genisteína	-OH	-H	-
	Gliciteína	-H	-OCH ₃	-
β-glicosídeos	Daidzina	-H	-H	-H
	Genistina	-OH	-H	-H
	Glicitina	-H	-OCH ₃	-H
Acetilglicosídeos	6''-O-acetildaidzina	-H	-H	-COCH ₃
	6''-O-acetilgenistina	-OH	-H	-COCH ₃
	6''-O-acetilglicitina	-H	-OCH ₃	-COCH ₃
Malonilglicosídeos	6''-O-malonildaidzina	-H	-H	-COCH ₂ COOH
	6''-O-malonilgenistina	-OH	-H	-COCH ₂ COOH
	6''-O-malonilglicitina	-H	-OCH ₃	-COCH ₂ COOH

Fonte: Adaptado de Liu (2004).

A soja é capaz de sintetizar uma grande variedade de metabólitos secundários (fitoquímicos); por exemplo, as isoflavonas. Estas são biossintetizadas

como parte da rota fenil-propanoide (CHENNUPATI et al., 2012; WESTON; MATHESIUS, 2013) e apresentam ocorrência limitada no reino vegetal, já que a enzima 2-hidroxi-isoflavanona sintase - IFS (EC 1.14.13.136), responsável pela conversão dos precursores flavanonas em isoflavonas, é quase que exclusiva de algumas leguminosas (LARKIN; PRICE; ASTHEIMER, 2008; VISNEVSCHI-NECRASOV et al., 2013). Entretanto, a regulação genética da biossíntese de isoflavonas em plantas ainda não é bem compreendida (BALISTEIRO; ROMBALDI; GENOVESE, 2013). A biossíntese da isoflavona daidzeína é apresentada na Figura 2.

Figura 2 – Biossíntese da daidzeína.



Fonte: IUBMB (2004).

As isoflavonas são importantes no estabelecimento da simbiose rizóbio-leguminosa (ANTUNES; RAJCAN; GOSS, 2006; COOPER, 2007). Podem induzir a resistência de rizóbios contra infecções da raiz causadas por patógenos microbianos (WERNER, 2007). Guo et al. (2011), em um estudo de 13 anos envolvendo monoculturas contínuas de soja, quantificaram as isoflavonas na rizosfera e monitoraram as alterações na comunidade microbiana do solo examinando o seu perfil de fosfolipídeos (biomarcadores). Os autores descreveram que as concentrações de genisteína variaram de 0,4 a 1,2 $\mu\text{g g}^{-1}$ de solo em base seca ao longo dos diferentes anos, enquanto que as concentrações de daidzeína raramente excederam 0,6 $\mu\text{g g}^{-1}$ de solo em base seca. Houve uma correlação positiva entre as concentrações de daidzeína e fungos presentes no solo. A concentração de genisteína mostrou uma correlação com o total de fosfolipídeos, fungos, bactérias, bactérias Gram (+) e bactérias aeróbias na comunidade microbiana do solo. Ambas as isoflavonas foram facilmente degradadas no solo, resultando em meia-vida curta; $t_{1/2} = 37,2$ min para daidzeína e $t_{1/2} = 6,0$ min para genisteína a uma concentração inicial de 50 $\mu\text{g g}^{-1}$ de solo em base seca. Concentrações mínimas de isoflavonas (1,0 $\mu\text{g g}^{-1}$, base seca) no solo foram suficientes para alterar o perfil da comunidade microbiana. Foi concluído que tanto a daidzeína quanto a genisteína liberadas na rizosfera podem atuar como alelos químicos nas interações entre raiz e comunidade microbiana do solo em um cultivo de monoculturas de soja de longo prazo, podendo o estudo contribuir para a resolução de problemas de queda de produtividade nesse sistema produtivo.

O conteúdo e perfil de isoflavonas nos grãos de soja são dependentes de muitas variáveis: genética da cultivar, estágio de maturação, ano-safra, clima da região de cultivo, condições de estocagem, dentre outras (WANG; MURPHY, 1994; CARRÃO-PANIZZI et al., 1999; KIM et al., 2005; CHENG; YU; YU, 2008; BRITZ; SCHOMBURG; KENWORTHY, 2011).

Wang e Murphy (1994) avaliaram a composição de isoflavonas em diferentes cultivares de soja americana e japonesa em relação ao ano-safra e localização de cultivo. Nas cultivares de soja japonesas, o conteúdo de isoflavonas nas amostras da safra de 1992 foi de apenas 60 % da quantidade encontrada para as mesmas cultivares em 1991. As cultivares de soja japonesas tiveram maior conteúdo de 6"-0-malonilglicetina e maior razão de 6"-0-malonildaidzina/daidzina e 6"-0-malonilgenistina/genistina quando comparadas às cultivares americanas.

Ribeiro et al. (2007), avaliando o conteúdo de isoflavonas em cultivares de soja brasileira de diferentes grupos de maturidade, descreveram que as isoflavonas malonildaidzina e malonilgenistina foram as isoflavonas predominantes em todas as cultivares analisadas, correspondendo a 67 % do conteúdo total de isoflavonas.

Carrão-Panizzi et al. (1999) analisaram os efeitos da genética e de fatores ambientais sobre o conteúdo de isoflavonas em cultivares de soja oriundas de diferentes regiões do Brasil, na safra de 1993/94. As cultivares IAS 5 e FT-Abyara, cultivadas no estado do Rio Grande do Sul, com temperatura média de 19 °C, apresentaram concentrações mais altas de isoflavonas (218,7 e 163,8 mg/100 g, respectivamente). Já no estado do Paraná, onde a temperatura média foi de 24 °C, as concentrações de isoflavonas para as referidas cultivares foram de 105,9 e 86,8 mg/100 g, respectivamente. Os menores teores de isoflavonas foram encontrados nas cultivares FT-Estrela e FT-Cristalina (27,6 e 46,5 mg/100 g, respectivamente), cultivadas no estado do Mato Grosso, cuja temperatura média foi de 27 °C.

Kim et al. (2005) investigaram as alterações no perfil e concentração de isoflavonas em oito cultivares de soja, cujos grãos depois de colhidos foram submetidos a duas temperatura de armazenamento (25 °C e -30 °C) por mais de três anos. As concentrações iniciais de isoflavonas nos grãos de soja variaram de 699,7 a 2581,6 $\mu\text{g g}^{-1}$, sendo as formas acetilglicosídeos e gliciteína detectadas apenas em pequenas quantidades ou traços em todas as cultivares. Esta observação está de acordo com as descrições de Balisteiro, Rombaldi e Genovese (2013). O armazenamento dos grãos a 25 °C acarretou diminuição do conteúdo de agliconas e acetilglicosídeos. Para a maioria das cultivares, o conteúdo total de isoflavonas se mostrou maior em grãos de soja submetidos a -30 °C, sendo este conteúdo correlacionado com a concentração dos β -glicosídeos ($r^2 = 0,80$) e malonilglicosídeos ($r^2 = 0,88$). Os autores sugeriram futuras investigações com a avaliação da influência da umidade.

Ressalta-se que a concentração e o perfil de isoflavonas também variam conforme as diferentes partes estruturais do grão de soja (KUDOU et al., 1991; TSUKAMOTO et al., 1995). Tsukamoto et al. (1995) relataram que a concentração total de isoflavonas no hipocótilo foi 5,5 a 6 vezes maior do que nos cotilédones. Contudo, nos cotilédones houve a maior proporção de isoflavonas, de 80 a 90 %. Isto porque os cotilédones correspondem a uma maior proporção em massa na estrutura do grão, ao contrário do hipocótilo, que apresenta 2 % do total

de matéria seca do grão. A aglicona gliciteína e suas formas químicas derivadas ocorrem exclusivamente no hipocótilo (YUAN et al., 2009) enquanto que o tegumento da semente é praticamente isento de isoflavonas.

Devido ao grande número de variáveis que afetam o conteúdo de isoflavonas desde a matéria-prima, grande parte dos produtos derivados de soja desenvolvidos pelas indústrias de alimentos apresentam teor e perfil de isoflavonas distintos. Assim, há uma dificuldade de padronização da concentração de isoflavonas contida nestes produtos. Um banco de dados com o conteúdo de flavonoides em diversos alimentos, além de um específico para isoflavonas, foi elaborado pelo *Nutrient Data Laboratory* (NDL) do USDA e vem sendo atualizado com os dados de pesquisas relacionadas e indústrias de alimentos (USDA, 2008). No Brasil, há também um esforço na compilação de dados de concentração de flavonoides nos alimentos, porém há algumas limitações devido às descrições incompletas dos planos de amostragem e processos metodológicos publicados nas áreas afins (MENEZES et al., 2011).

3.2.1 Benefícios à Saúde

A atividade biológica das isoflavonas tem sido amplamente investigada, seja em estudos epidemiológicos com humanos ou em ensaios com animais. Estes estudos sugerem potenciais efeitos benéficos das isoflavonas, principalmente das agliconas, sobre a redução da ocorrência ou tratamento de artrite reumatoide, doenças cardiovasculares em mulheres no período pré-menopausa, câncer de próstata, hiperglicemia, sintomas da menopausa, dentre outros (ESPÍN; GARCÍA-CONESA; TOMÁS-BARBERÁN, 2007; LARKIN; PRICE; ASTHEIMER, 2008; DONG et al., 2013; FILIBERTO et al., 2013; LI et al., 2013; PARK et al., 2013; REED et al., 2013; VITALE et al., 2013).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), as isoflavonas são consideradas medicamentos fitoterápicos e necessitam obrigatoriamente de registro para sua comercialização. Os produtos registrados na ANVISA como medicamentos fitoterápicos contendo isoflavonas, devem possuir indicações nos rótulos apenas como auxiliares na redução de colesterol e alívio nos sintomas da menopausa ("fogachos"). Para os alimentos que naturalmente contenham isoflavonas, nenhuma alegação de conteúdo ("contém isoflavonas",

"fonte de isoflavonas", "rico em isoflavonas", dentre outras), de função ou de saúde é autorizada na rotulagem desses alimentos (ANVISA, 2013; BRASIL, 2013).

As isoflavonas glicosiladas são pouco absorvidas no intestino delgado de humanos devido a sua alta massa molar e hidrofobicidade (CEDERROTH; ZIMMERMANN; NEF, 2012). Diferentemente, as isoflavonas agliconas são absorvidas rapidamente pelas microvilosidades do tecido epitelial presentes ao longo do intestino delgado (LARKIN; PRICE; ASTHEIMER, 2008). A enzima β -glicosidase, responsável pela hidrólise das isoflavonas glicosiladas em agliconas, pode ser secretada naturalmente pela microbiota do cólon (SETCHELL; BROWN; LYDEKING-OLSEN, 2002). A microbiota intestinal desempenha um papel chave na biodisponibilidade de compostos fenólicos, particularmente os de alta massa molar. Contudo, são escassos os estudos que relacionam o impacto dos polifenóis sobre a microbiota intestinal e os seus mecanismos de ação no organismo humano (LARKIN; PRICE; ASTHEIMER, 2008; CARDONA et al., 2013).

Após a ingestão de soja e seus derivados, as isoflavonas contidas nestes podem ocorrer em diversos tecidos e fluidos do organismo de humanos e animais. Detecções e quantificações dessas substâncias na saliva, plasma sanguíneo, urina, fezes, fluido da próstata, tecido mamário, leite e outros, tem sido reportadas (XU et al., 1994; WATANABE et al., 1998; MAUBACH et al., 2003; CASSIDY et al., 2006; BARANOWSKA; MAGIERA, 2011; VITALE et al., 2013).

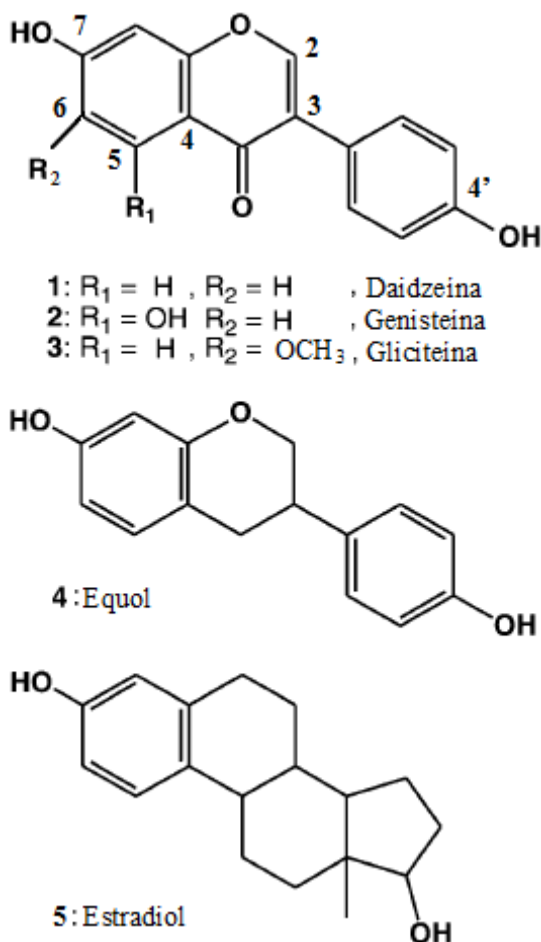
Cassidy et al. (2006) avaliaram em humanos a influência da matriz de três alimentos à base de soja (extrato, proteína vegetal texturizada e *tempeh*), assim como o efeito da idade e sexo dos participantes do estudo sobre a biodisponibilidade e farmacocinética das isoflavonas (formas agliconas e glicosiladas). Os produtos de soja foram fornecidos aos participantes em quantidades correspondentes a 0,44 mg das referidas isoflavonas kg^{-1} de massa corpórea de cada indivíduo. Quando fornecido o extrato de soja aos participantes, houve a mais rápida taxa de absorção e um pico de concentração maior de isoflavonas no plasma sanguíneo quando comparado às matrizes sólidas (proteína vegetal texturizada e *tempeh*). As agliconas no alimento fermentado (*tempeh*) foram absorvidas mais rapidamente do que as isoflavonas glicosiladas. Os picos de concentração de daidzeína no plasma sanguíneo foram mais elevados em mulheres, sendo que a idade dos participantes não teve grande influência nos resultados deste estudo.

Reed et al. (2013) avaliaram a associação da frequência de sintomas vasomotores, manifestado pelas "ondas de calor" ou "fogachos", com a raça/etnia entre um grupo populacional diversificado de mulheres, com idades entre 45 e 58 anos, nos períodos perimenopausa e pós-menopausa, e investigaram as diferenças na ocorrência desses sintomas com o consumo de isoflavonas (genisteína + daidzeína) na dieta. A classificação de acordo com o consumo de isoflavonas compreendeu grupos com ingestão de 1,0 mg de isoflavonas dia⁻¹ até com ingestão de 25 mg (ou mais) de isoflavonas dia⁻¹. Segundo Messina, Nagata e Wu (2006) e Cederroth, Zimmermann e Nef (2012), o consumo médio diário de soja pela população asiática é de 4 a 9 vezes maior em relação à população norte-americana e europeia, que consomem menos que 4 g de soja dia⁻¹. Os sintomas da menopausa, independente da quantidade ingerida de isoflavonas, variaram consideravelmente com a raça/etnia e foram menos frequentes entre as mulheres asiáticas. Na população norte-americana, devido à ingestão extremamente baixa de soja, foi difícil afirmar se essas diferenças poderiam estar relacionadas, em parte, com o consumo de soja na dieta.

Estima-se que o consumo de isoflavonas da soja pela população asiática varia entre 20 a 100 mg de isoflavonas dia⁻¹. Já a população ocidental consome pouca soja e seus derivados e, conseqüentemente, ingerem uma quantidade menor de isoflavonas, de 1 a 10 mg dia⁻¹ (NAKAMURA; TSUJI; TONOGAI, 2000; BROUNS, 2002; MESSINA; NAGATA; WU, 2006; SONG et al., 2007; GIRGIH et al., 2013). Contudo, nenhuma dose-resposta de isoflavonas tem sido bem estabelecida para exercer potenciais efeitos benéficos à saúde humana.

As isoflavonas agliconas são também denominadas de fitoestrógenos, que apresentam estrutura (Figura 3) e funcionalidade similar ao estrógeno 17 β -estradiol, hormônio endógeno de humanos e animais, porém com menor atividade (UZZAN; LABUZA, 2004; VITALE et al., 2013).

Figura 3 – Estrutura química das agliconas (1, 2, 3), equol (4) e estradiol (5).



Fonte: Adaptado de Dixon e Ferreira (2002).

Sathyamoorthy e Wang (1997) descreveram que o equol [7-hidroxi-3-(4'-hidroxifenil)cromano], metabólito secundário da daidzeína, é 100 vezes mais potente do que esta na estimulação de uma resposta estrogênica. Entretanto, estima-se que 1/3 dos humanos possuem uma microbiota intestinal capaz de metabolizar a daidzeína em equol (HENDRICH, 2002; JU et al., 2006).

Ressalta-se que uma melhor compreensão dos mecanismos de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e biodisponibilidade das isoflavonas da soja faz-se necessária para avaliar a variabilidade dos resultados encontrados em ensaios clínicos, buscando esclarecer e diferenciar os benefícios reais relacionados à saúde humana coletiva de determinados grupos de população (UZZAN; LABUZA, 2004; ESPÍN; GARCÍA-CONESA; TOMÁS-BARBERÁN, 2007; WUTTKE; JARRY; SEIDLOVÁ-WUTTKE, 2007). Desta forma, o complexo mecanismo de biotransformação envolvendo as isoflavonas deve ser explorado melhor a partir do papel chave desempenhado pela microbiota intestinal. Contudo, isto não é tão

simples visto a estimativa de mais de 400 espécies de bactérias presentes no cólon humano (LARKIN; PRICE; ASTHEIMER, 2008).

3.3 TRATAMENTOS HIDROTÉRMICOS DE GRÃOS DE SOJA

A hidratação da soja é uma etapa muito importante utilizada previamente no preparo de vários produtos de soja, como extrato de soja, *tofu* e *tempeh*. Este processo é responsável pelas mudanças nas características de textura do grão e afeta processamentos posteriores, como extração de proteínas, trituração e cocção. Nos processos tradicionais para a elaboração do extrato de soja, como o método de Illinois, a soja é hidratada por 12 h à temperatura de 25 °C. Recomenda-se que a soja seja hidratada até atingir uma umidade mínima, em base seca, de 120 g de água/100 g de sólidos antes de processos de moagem. Para isto, temperaturas de hidratação acima de 30 °C podem reduzir significativamente o tempo de hidratação requerido para atingir essa umidade final (PAN; TANGRATANAVALEE, 2003; GOWEN et al., 2007).

Alguns estudos têm mostrado que o tratamento hidrotérmico de grãos de soja influencia o conteúdo e perfil de isoflavonas no grão hidratado, favorecendo a atividade da β -glicosidase na conversão das isoflavonas glicosiladas em agliconas (MATSUURA; OBATA; FUKUSHIMA, 1989; CARRÃO-PANIZZI; SIMÃO; KIKUCHI, 2003; GÓES-FAVONI; CARRÃO-PANIZZI; BELEIA, 2010).

As β -glicosidases (β -D-glicosídeo-0-glicohidrolase, EC 3.2.1.21) são enzimas que hidrolisam as ligações (β -glicosídicas dos dissacarídeos, oligossacarídeos e outros glicosídeos conjugados. Estas constituem um grupo heterogêneo de enzimas, presentes em alguns vegetais ou sintetizadas por diversos micro-organismos, e desempenham um papel muito importante nos processos biológicos, como na hidrólise de glicolipídeos e nas modificações de metabólitos secundários; por exemplo, as isoflavonas e glicosídeos terpênicos (ESEN, 1993; HSIEH; GRAHAM, 2001; GONZÁLES-POMBO et al., 2011). Estas enzimas vêm sendo empregadas em processamento de alimentos, colaborando na formação de compostos aromáticos desejáveis em chás, vinhos e sucos (EYZAGUIRRE; HIDALGO; LESCHOT, 2005; GONZÁLES-POMBO et al., 2011; WANG et al., 2013). Além disso, contribuem na degradação da celulose para produção de etanol (MEKO'0 et al., 2012; WANG et al., 2013).

No tecido vegetal, as (β -glicosidases estão compartimentalizadas e isoladas dos seus substratos (MORANT et al., 2008). Quando o tecido vegetal de alguma forma sofre injúria, algumas isoflavonas são bioativadas pelas β -glicosidases e atuam como fitoanticipinas, que são compostos de defesa pré-formados/pré-existentes, fornecendo à planta uma defesa imediata contra o ataque de herbívoros e patógenos (SUZUKI et al., 2006). A planta também pode sintetizar os compostos de defesa em resposta a este ataque, denominados de fitoalexinas (YOO et al., 2013). A genisteína foi relatada ser tóxica aos fungos patogênicos, como *Phytophthora sojae* (RIVERA-VARGAS; SCHMITTHENNER; GRAHAM, 1993; YOO et al., 2013).

Matsuura, Obata e Fukushima (1989) avaliaram o efeito do tempo de hidratação/maceração dos grãos de soja, temperatura e pH da água de hidratação sobre o teor de agliconas nos grãos hidratados. Quando os grãos foram mantidos hidratados (1:5, m/m; soja: água destilada) a 20 °C por 16 h, a proporção de agliconas em relação ao total de isoflavonas aumentou de aproximadamente 3,3 % para 12,4 % após o tratamento hidrotérmico. Em uma amostra controle, 0,5 % (m/m) de glucona- δ -lactona (inibidor competitivo da (β -glicosidase) foi adicionada à água de hidratação dos grãos. Com isto, a formação de daidzeína e genisteína, que antes aumentaram com o tempo de hidratação, passou a não ser significativa ao longo das 16 h. Paralelamente, também foram quantificadas as isoflavonas nos grãos de soja hidratados por um período fixo de 6 h e com a temperatura da água de hidratação variando de 10 °C a 80 °C, em intervalos de 10 °C entre cada ensaio. Os teores de daidzeína e genisteína aumentaram significativamente até atingir 50 °C, variando de 5 e 7 mg/100 g em base seca a 10 °C para 30 e 40 mg/100 g em base seca a 50 °C, respectivamente. Em temperaturas acima de 50 °C a formação de agliconas foi reduzida drasticamente, sendo atribuída à inativação da enzima (β -glicosidase). O pH ótimo para a formação de agliconas foi em torno de pH 6, quando mantidas a 50 °C por 6 h. Observações semelhantes foram relatadas por Ha, Morr e Seo (1992), ao investigarem o efeito de três diferentes tratamentos hidrotérmicos em grãos de soja (6 h em água destilada a 50 °C, 6 h em solução de NaHCO₃ a 0,5 % e pH 7,6 a 50 °C e 30 min de branqueamento em solução de NaHCO₃ a 0,25 %) sobre a formação de agliconas daidzeína e genisteína. No tratamento com água em ebulição, ou seja, no branqueamento contendo o NaHCO₃, apenas 4,5 % de daidzeína e 6,5 % de genisteína foram produzidas em relação aos resultados obtidos no tratamento com

água destilada a 50 °C pois o branqueamento provavelmente inativou as enzimas β -glicosidases.

Toda et al. (2000) investigaram o perfil de isoflavonas em grãos de soja hidratados (1:3, m/m; soja: água destilada) por 1, 2, 5, 10 e 15 h a 20 °C e evidenciaram um aumento discreto e significativo na quantidade de isoflavonas agliconas e diminuição dos β -glicosídeos conjugados ao longo do tempo de tratamento. Este ligeiro efeito sobre a distribuição total de isoflavonas foi atribuído à temperatura da água de hidratação, que não foi adequada para proporcionar uma boa atividade da β -glicosidase. Quando adicionado 0,5 % de glucona- δ -lactona à água de hidratação, o aumento de agliconas foi suprimido; sendo assim, a ação de enzimas β -glicosidases endógenas da soja sobre os β -glicosídeos foi confirmada durante o tratamento hidrotérmico sem a presença do inibidor.

Góes-Favoni (2002), visando o aumento do teor de genisteína em farinha de soja processada a partir de grãos de soja, submeteu estes em água destilada (1:3, m/m; soja: água destilada) a 50 °C por 1, 4, 8, 12, 16, 20 e 24 h. A quantidade de agliconas aumentou em função do tempo de hidratação dos grãos, sendo que após 12 h de tratamento não houve mudanças significativas no teor de genisteína. Com isso, tendo em vista os custos envolvendo essa operação em escala industrial, foi considerado o tratamento hidrotérmico com o binômio temperatura-tempo de 50 °C por 12 h o mais indicado para a obtenção de farinha de soja otimizada em quantidade de genisteína. Observações semelhantes foram descritas por Kao et al. (2004), que encontraram teores de agliconas em base seca nos grãos de soja antes da hidratação iguais a 120,4 ug de daidzeína g⁻¹ de amostra, 5,3 ug de gliciteína g⁻¹ de amostra e 148,7 de genisteína ug g⁻¹ de amostra, sendo que após o tratamento hidrotérmico dos grãos (1:3, m/v; soja: água destilada) a 45 °C por 12 h as concentrações em base seca aumentaram para 523,5 ug de daidzeína g⁻¹ de amostra, 196,2 ug de gliciteína g⁻¹ de amostra e 928,6 ug de genisteína g⁻¹ de amostra.

O efeito do tratamento hidrotérmico sobre o teor de isoflavonas agliconas em grãos de soja também foi avaliado por Carrão-Panizzi, Simão e Kikuchi (2003), que submeteram os grãos de soja à hidratação por 12 e 18 h a 40, 50 e 60 °C. Após o tratamento hidrotérmico, as concentrações de agliconas nos grãos aumentaram oito vezes em relação aos grãos não hidratados. O maior teor de daidzeína e genisteína foi observado nos grãos hidratados a 50 °C por 12 h e a 40

°C por 18 h. A 60 °C notou-se uma redução no teor de agliconas, possivelmente devido à inativação das β -glicosidases.

Góes-Favoni, Beléia e Carrão-Panizzi (2004), ao analisarem os grãos de soja após hidratação (1:3, m/m; soja: água destilada) por 12 h a 50 °C, observaram um aumento no teor de agliconas de 0,5 para 41,5 % em relação ao conteúdo total de isoflavonas presente no grão. Também foi observado que a atividade da β -glicosidase diminuiu 80 % após o tratamento hidrotérmico, sugerindo uma perda de estabilidade ou migração desta para a água de hidratação dos grãos. Wardhani, Vázquez e Pandiella (2008) observaram uma atividade máxima de β -glicosidase nos grãos de soja hidratados a 50 °C e 60 °C após 1 h de hidratação, que foi seguida por uma redução acentuada da atividade da enzima após este período. Essas observações estão de acordo com as descritas por Toda et al. (2001), que avaliaram a atividade da β -glicosidase na água residual de hidratação dos grãos de soja de quatro cultivares diferentes. Após o tratamento hidrotérmico dos grãos (1:3, m/m; soja: água destilada) a 15 °C por 5, 10, 15 e 20 h, a atividade de β -glicosidase na água residual de hidratação variou de 0,1 mU mL⁻¹ (menor atividade, após 5 h de tratamento) para 6,0 mU mL⁻¹ (maior atividade, após 20 h de tratamento). Ressalta-se que houve diferença na taxa de absorção de água dos grãos de soja de cada cultivar, bem como na quantidade de componentes eluídos/lixiados, incluindo as isoflavonas e a β -glicosidase.

Sutil et al. (2008) investigaram o efeito do tratamento hidrotérmico em diferentes valores de pH na formação de agliconas em grãos de soja e farinha de soja. Os ensaios foram conduzidos em soluções tampão citrato-fosfato com pH variando de 3,5, 4,5, 5,5, 6,0, 6,5 e 7,5, sendo que todas as amostras foram mantidas à temperatura de 50 °C por 15 h. Após os tratamentos, foi evidenciado maior formação de agliconas na farinha de soja hidratada em relação aos grãos hidratados em todos os pH, que foi atribuída à maior interação entre a enzima β -glicosidase e os 3-glicosídeos devido à trituração dos grãos. Em geral, com o aumento do pH de 6,0 para 6,5, houve uma maior conversão de isoflavonas glicosiladas em agliconas tanto nos grãos hidratados quanto na farinha de soja hidratada. A faixa de pH a qual foi evidenciado maior produção de agliconas está de acordo com a descrita por Matsuura, Obata e Fukushima (1989), que encontraram máxima formação destas isoflavonas em grãos de soja submetidos à hidratação (1:5, m/m; soja: água destilada) a 50 °C e pH 6,0.

Góes-Favoni, Carrão-Panizzi e Beléia (2010) avaliaram as mudanças no perfil de isoflavonas em cotilédones de soja hidratados em dois volumes de água. Os grãos de soja das safras de 2004 e 2005 foram submetidos ao descascamento, com remoção do tegumento e hipocótilo, deixando apenas os cotilédones. Estes foram hidratados em água deionizada a 50 °C por 12 h nas proporções 1:1,2 (m/m; cotilédone:água), para os grãos da safra de 2004, e 1:3 (m/m; cotilédone:água), para os grãos da safra de 2005. Nenhum teor de agliconas foi detectado nos cotilédones dos grãos da safra de 2004 antes do tratamento hidrotérmico, enquanto que nos cotilédones dos grãos da safra de 2005 foram detectados 2,0 mg de agliconas/100 g de amostra em base seca. Após a hidratação dos cotilédones dos grãos das safras de 2004 e 2005, as concentrações de agliconas em base seca nos cotilédones hidratados foram de 13,0 mg/100 g e 20,0 mg/ 100 g, respectivamente. Destaca-se que a razão entre o teor de agliconas nos cotilédones hidratados e o teor de agliconas nos cotilédones antes da hidratação foi maior quando foi empregado o menor volume de água no tratamento hidrotérmico. Parte das agliconas presentes nos cotilédones dos grãos da safra de 2005 foram lixiviadas para a água de hidratação. No ensaio que envolveu a proporção 1:1,2 (m/m; cotilédone:água) não foi possível a quantificação de isoflavonas na água residual de hidratação, uma vez que esta foi quase que totalmente absorvida pelos cotilédones.

A perda de sólidos da soja para a água de hidratação pode ser considerável em temperaturas de hidratação mais elevadas e isto deve ser avaliado ao selecionar as condições de tratamento hidrotérmico (PAN; TANGRATANAVALEE, 2003). As transformações das isoflavonas da soja durante o tratamento hidrotérmico podem ser descritas por reações cinéticas de primeira ordem com uma constante cinética de conversão, degradação e transferência de massa para a fase aquosa (WARDHANI; VAZQUEZ; PANDIELLA, 2008).

Ressalta-se que durante alguma etapa do processamento de ingredientes ou produtos de soja é empregado calor, seja desde um procedimento de secagem até o controle microbiano do produto antes do seu envase. Os tratamentos térmicos adequados inativam as lipoxigenases, além dos fatores antinutricionais naturalmente presentes na soja, como lectinas e inibidores de tripsina e quimotripsina. Por conseguinte, a concentração e o perfil de isoflavonas nos produtos finais também são afetados e isto pode ser relacionado com o binômio

tempo-temperatura de tratamento. Os malonilglicosídeos, dentre as isoflavonas da soja, apresentaram maior instabilidade térmica e foram afetados principalmente pela temperatura de processamento (VAIDYA et al., 2007; BENEDETTI et al., 2013). De forma geral, os processamentos que empregam altas temperaturas por um curto tempo, como *ultra high temperature* (UHT), minimizam a degradação das agliconas (UZZAN; LABUZA, 2004; HUANG; LIANG; KWOK, 2006).

Devido à variabilidade encontrada no perfil e conteúdo de isoflavonas em diversas cultivares de soja, assim como os diferentes comportamentos destas frente ao processo de hidratação, a otimização das condições de tratamento hidrotérmico dos grãos de soja torna-se necessária para obter grãos hidratados com máximo conteúdo de agliconas. Desta forma, poderão ser elaborados produtos de soja com maior teor destes compostos bioativos a partir de grãos de soja tratados hidrotermicamente.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATÉRIA-PRIMA E REAGENTES

Os grãos de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] da cultivar BRS 257 (genealogia BR93-32109 X BR94-23396), isenta das enzimas lipoxigenases L1, L2 e L3 e pertencente à safra de 2012, foram fornecidos pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-Embrapa Soja, Londrina-PR. Inicialmente, esta soja foi caracterizada quanto ao teor das diferentes formas de isoflavonas por cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE). Foram utilizados os seguintes padrões individuais de isoflavonas: 6"-0-acetilglicosídeos e 6"-0-malonilglicosídeos (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japão), β -glicosídeos e agliconas (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA). Para a determinação da atividade de β -glicosidase foi utilizado o substrato cromogênico *p*-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (*p*-NPG) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA). Os outros reagentes utilizados foram de grau analítico ou específicos para cromatografia.

4.2 PROCEDIMENTOS

4.2.1 Tratamento Hidrotérmico dos Grãos de Soja

Os grãos de soja, limpos e selecionados, foram submetidos ao tratamento hidrotérmico para avaliar os efeitos do tempo (x1) e temperatura (x2) de hidratação sobre o teor das diferentes formas de isoflavonas no grão hidratado e na solução residual não absorvida pelos grãos de soja. A atividade de β -glicosidase foi avaliada apenas no grão hidratado. Foi utilizado um planejamento composto central rotacional (PCCR) constituído de um fatorial 2², com dois níveis (Tabela 2) e dois fatores x1 (tempo de hidratação, h) e x2 (temperatura de hidratação, °C), incluindo quatro pontos axiais e três pontos centrais, totalizando onze ensaios (Tabela 3), que foram realizados aleatoriamente. Para cada ensaio, 100 g de grãos de soja, com umidade inicial de 8,73 % em base úmida, foram lavados rapidamente com água destilada e enxugados com papel absorvente. Os 100 g de grãos de soja inicial foram utilizados na proporção 1:1,5 (m/m) com solução tampão de citrato-fosfato 0,05 M e pH 6,0 e mantidos em banho-maria sob diferentes combinações de tempo

e temperatura, conforme o planejamento experimental (Tabela 3). Ao final de cada ensaio, os grãos tratados hidrotermicamente foram drenados e imediatamente resfriados em banho de gelo até atingirem a temperatura ambiente de 25 °C.

Os grãos de soja hidrotermicamente tratados e a solução residual foram liofilizados (Christ Alpha 2-4 LD plus, Osterode am Harz, Alemanha), sendo que os grãos foram moídos (Ika A11 basic, St. Louis, MO, EUA) e mantidos a -22 °C até a realização das análises.

As funções respostas avaliadas no grão hidratado foram: GLU_{ss} (umol de β-glicosídeos g⁻¹ de sólidos de grão tratado), AGL_{ss} (umol de agliconas g⁻¹ de sólidos de grão tratado), MGLU_{ss} (umol de malonilglicosídeos g⁻¹ de sólidos de grão tratado) e βGLU_{ss} (unidade de atividade de β-glicosidase g⁻¹ de sólidos de grão tratado).

Com relação à solução residual, a função resposta avaliada foi AGL_{RS} (umol de agliconas/100 mL de solução residual).

O excesso de água dos grãos foi removido com papel absorvente. A massa da solução residual foi obtida pela diferença entre a massa do sistema (soma da massa dos grãos de soja lavados mais a massa da solução tampão de citrato-fosfato) e a massa dos grãos hidratados e enxugados com papel absorvente, como segue:

$$MS = GL + ST \quad \text{(Equação 1)}$$

$$SR = (GL + ST) - GHE \quad \text{(Equação 2)}$$

onde:

MS = massa (g) do sistema, GL = massa (g) dos grãos lavados, ST = massa (g) da solução tampão, SR = massa (g) da solução residual, GHE = massa (g) dos grãos hidratados e enxugados.

A massa dos grãos lavados foi padronizada em todos os ensaios. Foi considerado que durante os ensaios não houve nenhuma perda de massa para o ambiente. Desta forma, a função resposta TISO_{ss+Rs} (mg de isoflavonas totais nos grãos tratados e solução residual) foi avaliada por meio de um balanço de massa de isoflavonas no sistema.

Os níveis de variação (-1, 0 e +1) das variáveis independentes (x_1 e x_2 , conforme Tabela 2, foram definidos com base em ensaios preliminares e dados da literatura, conforme Matsuura, Obata e Fukushima (1989) e Sutil et al. (2008).

Tabela 2 – Variáveis independentes e níveis codificados para o tratamento hidrotérmico dos grãos de soja.

Fatores	Níveis Codificados				
	-1,41	-1	0	1	+1,41
X_1 = tempo (h) de hidratação	3,17	04	06	08	8,83
X_2 = temperatura (°C) de hidratação	40,86	45	55	65	69,14

Tabela 3 – Planejamento central composto rotacional (PCCR) aplicado ao tratamento hidrotérmico dos grãos de soja.

Pontos	Ensaio	Variáveis Independentes ^a	
		$x_1(X_1)$	$x_2(X_2)$
Fatoriais	01	-1 (04)	-1 (45)
	02	-1 (04)	1 (65)
	03	1 (08)	-1 (45)
	04	1 (08)	1 (65)
Axiais	05	-1,41 (3,17)	0 (55)
	06	+1,41 (8,83)	0 (55)
	07	0 (06)	-1,41 (40,86)
	08	0 (06)	+1,41 (69,14)
Centrais	09	0 (06)	0 (55)
	10	0 (06)	0 (55)
	11	0 (06)	0 (55)

a x_1 e x_2 representam os níveis codificados das variáveis independentes x_1 (tempo de hidratação, h) e x_2 (temperatura de hidratação, °C).

A metodologia de superfície de resposta (MSR) foi aplicada, por meio do planejamento composto central rotacional (PCCR), para otimizar o tratamento hidrotérmico dos grãos de soja para máxima conversão de isoflavonas glicosiladas em agliconas e retenção destas no grão hidratado. Para isto, um modelo de superfície de resposta de segunda ordem foi utilizado para ajustar os dados experimentais:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \epsilon \quad (\text{Equação 3})$$

onde:

y = função resposta, x_1 e x_2 variáveis independentes codificadas, β = coeficientes de regressão estimados, ϵ = erro experimental.

As análises de regressão e de variância (ANOVA) foram realizadas, por meio do programa Statistica 8.0 (StatSoft Inc., Tulsa, EUA), para estimar e verificar a significância ($\alpha = 0,05$) dos parâmetros dos modelos matemáticos. Os gráficos de superfície de resposta foram construídos a partir dos modelos ajustados e os perfis para os valores preditos das respostas e desejabilidade foram avaliados. A validação do modelo da função resposta AGL_{ss} (μmol de agliconas g^{-1} de sólidos de grão tratado hidrotermicamente) foi realizada comparando a resposta estimada pelo modelo com a média ($n = 3$) do conteúdo de agliconas obtida experimentalmente no grão de soja tratado hidrotermicamente na condição ótima de hidratação, aplicando o teste t-Student ($\alpha = 0,05$).

4.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.3.1 Determinação da Atividade da β -glicosidase

Para a extração da β -glicosidase foram utilizados 200 mg de grãos de soja tratados hidrotermicamente e 3,0 mL de tampão citrato 0,05 M e pH 4,5 contendo NaCl 0,1 M, com agitação a cada 15 min por 1 h à temperatura ambiente de 25 °C, conforme descrito por Carrão-Panizzi e Bordignon (2000). Em seguida, foram centrifugados (4 °C, 8200 x g, 15 min; Eppendorf centrifuge 5804R, Hamburg, Alemanha) e o extrato foi utilizado para a determinação da atividade de β glicosidase, conforme descrição de Matsuura e Obata (1993), com modificações. Assim, 0,8 mL do substrato cromogênico p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo 1 mM, preparado em solução tampão citrato-fosfato 0,1 M e pH 5, foi colocado em tubos testes e incubados a 30 °C por 10 min em banho-maria. Em seguida, 0,2 mL do extrato foram adicionados aos tubos e mantidos a 30 °C por 30 min. A reação foi interrompida com a adição de 1,0 mL de solução de carbonato de sódio 0,5 M, centrifugado (25 °C, 6800 x g, 15 min; Eppendorf centrifuge 5804R, Hamburg, Alemanha) para eliminar a turbidez, e a leitura foi realizada em espectrofotômetro (Biochrom Libra S22, Cambridge, Inglaterra) a 420 nm. O ensaio do branco foi realizado em paralelo às amostras e constituído por 0,2 mL de tampão citrato 0,05 M e pH 4,5 contendo NaCl

0,1 M, 0,8 mL da solução de substrato e 1,0 mL da solução de carbonato de sódio 0,5 M. O ensaio do controle de cada amostra foi constituído por 0,8 mL de tampão citrato-fosfato 0,1 M e pH 5, 0,2 mL do extrato e 1 mL de solução de carbonato de sódio 0,5 M. A absorbância final foi igual à diferença entre a leitura da amostra e seu respectivo controle. A concentração de p-nitrofenol (p-NP), produto da reação com a enzima, foi determinada utilizando uma curva de calibração preparada a partir do padrão de p-NP, com concentração variando de 0,04 a 0,32 μmol em 5 mL de volume reacional total. Foi definida uma unidade de atividade de β -glicosidase (UA) como a quantidade de enzima requerida para liberar 1 μmol de p-NP por minuto nas condições do ensaio. A atividade de β -glicosidase foi expressa como UA g^{-1} de sólidos de grão tratado hidrotêrmicamente.

4.3.2 Análise de Isoflavonas

4.3.2.1 Extração e quantificação de isoflavonas por cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE)

As amostras, depois de liofilizadas e moídas, foram desengorduradas com n-hexano (1:10, m/v) à temperatura ambiente de 25 °C por 1 h com uma agitação contínua e rotativa, seguida por filtração a vácuo antes da extração das isoflavonas. Em seguida, 0,3 g de amostra desengordurada foi adicionada a 6 mL de solução extratora (água, etanol e acetona, 1:1:1, v/v/v) e agitados a cada 15 min por 1 h à temperatura ambiente de 25 °C. Logo após, a mistura foi colocada em banho ultrassônico por 15 min à temperatura ambiente de 25 °C conforme a metodologia descrita por Yoshiara et al. (2012). Em seguida, o extrato foi centrifugado (4 °C, 794 x g, 15 min; Eppendorf centrifuge 5804R, Hamburg, Alemanha) e o sobrenadante filtrado em membranas hidrofílicas de PVDF com 0,22 μm de tamanho de poro (Millex-GV, Millepore, Billerica, MA, USA) e, então, aplicado no cromatógrafo líquido de ultra eficiência.

Para a separação e quantificação das isoflavonas por CLUE foi utilizado o cromatógrafo UPLC® (Acquity UPLC® System, Waters, EUA), equipado com injetor automático de amostras, bomba quaternária, forno com temperatura controlada de 35 °C e detector com arranjo de diodos (DAD), controlado pelo software *Empower 3*. A eluição das amostras foi conduzida em coluna de fase

reversa Acquity™ UPLC BEH 18 (50 mm x 2,1 mm d.i.; 1,7 µm de diâmetro de partícula; Waters), com fase móvel constituída de um sistema gradiente binário, com fase inicial de 90 % de solução aquosa de ácido acético pH 3 (solvente A) e 10 % de acetonitrila (solvente B). Em 8 min de eluição foi atingida uma proporção de 0 % do solvente A e 100 % do solvente B, retornando às condições iniciais em 9 min. O tempo total de corrida foi de 10 min. A vazão da fase móvel foi de 0,70 mL min⁻¹ e o sistema de detecção foi constituído por um detector com arranjo de diodos (DAD-Waters), ajustado ao comprimento de onda de 260 nm.

A identificação de cada forma química de isoflavona nos cromatogramas foi realizada por comparação dos espectros de absorção e tempos de retenção dos seus respectivos padrões. A quantificação das isoflavonas foi realizada por padronização externa a partir de soluções padrão (0,1; 0,05; 0,01; 0,005; 0,001 e 0,0005 mg mL⁻¹) de cada isoflavona. De cada amostra foram realizadas três corridas cromatográficas.

Nos grãos hidratados, foi calculada a concentração molar de cada isoflavona individual e depois estes valores foram somados para expressar a concentração molar total dos respectivos grupos de isoflavonas. Desta forma, as diferenças de massas molares das isoflavonas glicosiladas foram normalizadas para suas agliconas correspondentes (MALAYPALLY; ISMAIL, 2010). Os resultados foram expressos em µmol de 3-glicosídeos, µmol de malonilglicosídeos e µmol de agliconas g⁻¹ de amostra seca e integral, como segue:

$$I_{BS} = \frac{[I_{BSD} \times (100 - LP)] \times 10}{100 \times MM_{isoflavona}} \quad (\text{Equação 4})$$

onde:

I_{BS} = µmol de isoflavonas g⁻¹ de amostra seca e integral, I_{BSD} = mg de isoflavonas/100 g de amostra seca e desengordurada, LP = % de lipídeos em base seca extraídos no preparo da amostra antes da extração das isoflavonas, $MM_{isoflavona}$ = massa molar de cada isoflavona.

Um balanço de massas de isoflavonas do sistema foi avaliado e expresso em mg de isoflavonas totais, após a normalização das diferenças entre as

massas molares das isoflavonas glicosiladas para suas agliconas correspondentes (WANG; MURPHY, 1996), como segue:

$$m_N = \frac{m \times MM_{\text{aglicona}}}{MM_{\text{glicosilada}}} \quad (\text{Equação 5})$$

onde:

m_N = massa (mg) normalizada da isoflavona, m = massa (mg) não normalizada da isoflavona, MM_{aglicona} = massa molar (g mol^{-1}) da aglicona correspondente, $MM_{\text{glicosilada}}$ = massa molar (g mol^{-1}) da isoflavona glicosilada.

Massas molares (g mol^{-1}): malonildaidzina = 502,42; malonilglicitina = 532,45; malonilgenistina = 518,42; daidzina = 416,38; glicitina = 446,40; genistina = 432,38; daidzeína = 254,24; gliciteína = 284,26; genisteína = 270,24.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Perguntas Frequentes/Medicamentos. **Medicamentos fitoterápicos-Isoflavonas**. 2013. Disponível em: <<http://s.anvisa.gov.br/wps/s/r/boHk>>. Acesso em: 27 jul. 2013.

ANDERSON, J. W.; BAIRD, P.; DAVIS-Jr, R. H.; FERRERI, S.; KNUDTSON, M.; KORAYM, A.; WATERS, V.; WILLIAMS, C. L. Health benefits of dietary fiber. **Nutrition reviews**, v. 67, p. 188-205, 2009.

ANTUNES, P. M.; RAJCAN, I.; GOSS, M. J. Specific flavonoids as interconnecting signals in the tripartite symbiosis formed by arbuscular mycorrhizal fungi, *Bradyrhizobium japonicum* (Kirchner) Jordan and soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). **Soil Biology & Biochemistry**, v. 38, p. 533-543, 2006.

BALISTEIRO, D. M.; ROMBALDI, C. V.; GENOVESE, M. I. Protein, isoflavones, trypsin inhibitory and in vitro antioxidant capacities: Comparison among conventionally and organically grown soybeans. **Food Research International**, v. 51, p. 8-14, 2013.

BARANOWSKA, I.; MAGIERA, S. Analysis of isoflavones and flavonoids in human urine by UHPLC. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 399, p. 3211-3219, 2011.

BENEDETTI, S.; PRUDENCIO, E. S.; MANDARINO, J. M. G.; REZZADORI, K.; PETRUS, J. C. C. Concentration of soybean isoflavones by nanofiltration and the effects of thermal treatments on the concentrate. **Food Research International**, v. 50, p. 625-632, 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos**. IX - Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. 2013. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>. Acesso em: 27 jul. 2013.

BRITZ, S. J.; SCHOMBURG, C. J.; KENWORTHY, W. J. Isoflavones in seeds of field-grown soybean: variation among genetic lines and environmental effects. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 88, p. 827-832, 2011.

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

CARDONA, F.; ANDRÉS-LACUEVA, C.; TULIPANIA, S.; TINAHONES, F. J.; QUEIPO-ORTUÑO, M. I. Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, p. 1415-1422, 2013.

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, p. 1787-1795, 1999.

CARRAO-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, p. 873-878, 2000.

CARRAO-PANIZZI, M. C.; SIMAO, 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.

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. **The Journal of Nutrition**, v. 136, p. 45-51, 2006.

CEDERROTH, C. R.; ZIMMERMANN, C.; NEF, S. Soy, phytoestrogens and their impact on reproductive health. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 355, p. 192-200, 2012.

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

CHENG, H.; YU, O.; YU, D. Polymorphisms of *FS1* and *IFS2* gene are associated with isoflavone concentrations in soybean seeds. **Plant Science**, v. 175, p. 505-512, 2008.

CHENNUPATI, P.; SEGUIN, P.; CHAMOUN, R.; JABAJI, S. Effects of high-temperature stress on soybean isoflavone concentration and expression of key genes involved in isoflavone synthesis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 12421-12427, 2012.

COLEMAN, H. G.; MURRAY, L. J.; HICKS, B.; BHAT, S. K.; KUBO, A.; CORLEY, D. A.; CARDWELL.; C. R.; CANTWELL.; M. M. Dietary fiber and the risk of precancerous lesions and cancer of the esophagus: a systematic review and meta-analysis. **Nutrition Reviews**, v. 71, p. 474-482, 2013.

COOPER, J. E. Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 1355-1365, 2007.

DECKELBAUM, R. J.; TORREJON, C. The omega-3 fatty acid nutritional landscape: health benefits and sources. **The Journal of Nutrition**, v. 142, p. 587S-591S, 2012.

DIXON, R. A.; FERREIRA, D. Genistein. **Phytochemistry**, v. 60, p. 205-211, 2002.

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

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). **A soja no Brasil**. Disponível em: <<http://www.cnpso.embrapa.br/producaosoja/SojanoBrasil.htm>>. Acesso em: 24 jul. 2013.

ESEN, A. (3-glucosidases, overview. In: ESEN, A. (Ed.). **p-glucosidases: Biochemistry and Molecular Biology**. Washington, D.C: American Chemical Society, 1993. p. 1-14.

ESPÍN, J. C.; GARCÍA-CONESA, M. T.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Nutraceuticals: facts and fiction. **Phytochemistry**, v. 68, p. 2986-3008, 2007.

EYZAGUIRRE, J.; HIDALGO, M.; LESCHOT, A. Glucosidases from filamentous fungi: properties, structure, and applications. In: YAREMA, K. J. **Handbook of Carbohydrate Engineering**. Boca Raton, Filadélfia: CRC Press, 2005. p. 645-685.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Report of a Sub-Committee of the 2011 FAO Consultation on "Protein Quality Evaluation in Human Nutrition" on: **The assessment of amino acid digestibility in foods for humans and including a collation of published ileal amino acid digestibility data for human foods**. 2012. Disponível em: <<http://www.fao.org/ag/humannutrition/nutrition/63158/en/>>. Acesso em: 08 jul. 2013.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). **Protein Quality Evaluation in Human Nutrition**. Report of an FAO Expert Consultation. 2013. Disponível em: <<http://www.fao.org/ag/humannutrition/nutrition/63158/en/>>. Acesso em: 08 jul. 2013.

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

FILIBERTO, A. C.; MUMFORD, S. L.; POLLACK, A. Z.; ZHANG, C.; YEUNG, E. H.; PERKINS, N. J.; WACTAWSKI-WENDE, J.; SCHISTERMAN, E. F. Habitual dietary isoflavone intake is associated with decreased C-reactive protein concentrations among healthy premenopausal women. **The Journal of Nutrition**, v. 143, p. 900906, 2013.

GIRGIH, A. T.; MYRIE, S. B.; ALUKO, R. E.; JONES, P. J. H. Is category "A" status assigned to soy protein and coronary heart disease risk reduction health claim by the United States Food and Drug Administration still justifiable? **Trends in Food Science & Technology**, v. 30, p. 121-132, 2013.

GIRI, S. K.; MANGARAJ, S. Processing influences on composition and quality attributes of soymilk and its powder. **Food Engineering Reviews**, v. 4, p. 149-164, 2012.

GOÉS-FAVONI, S. P. **Desenvolvimento de farinha de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] com maior teor de genisteína**. 2002. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2002.

GÓES-FAVONI, S. P.; BELÉIA, A. D. P.; CARRÃO-PANIZZI, M. C. Efeito da hidratação sobre a atividade de (3-glicosidase da soja [*Glycine max* (L.) Merrill]. In:

Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 19., 2004, Recife-PE. **Anais...** Recife, 2004.

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

GONZALES-POMBO, P.; FARINA, L.; CARRAU, F.; BATISTA-VIERA, F.; BRENA, B. M. A novel extracellular (3-glucosidase from *Issatchenkia terricola*: Isolation, immobilization and application for aroma enhancement of white Muscat wine. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 385-389, 2011.

GOWEN, A.; ABU-GHANNAM, N.; FRIAS, J.; OLIVEIRA, J. Influence of pre-blanching on the water absorption kinetics of soybeans. **Journal of Food Engineering**, v. 78, p. 965-971, 2007.

GREENDALE, G. A.; HUANG, M.-H.; LEUNG, K.; CRAWFORD, S. L.; GOLD, E. B.; WIGHT, R.; WAETJEN, E.; KARLAMANGLA, A. S. Dietary phytoestrogen intakes and cognitive function during the menopausal transition: results from the Study of Women's Health Across the Nation Phytoestrogen Study. **Menopause**, v. 19, p. 894-903, 2012.

GUO, Z.-Y.; KONG, C.-H.; WANG, J.-G.; WANG, Y.-F. Rhizosphere isoflavones (daidzein and genistein) levels and their relation to the microbial community structure of mono-cropped soybean soil in field and controlled conditions. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 43, p. 2257-2264, 2011.

HA, E. Y. W.; MORR, C. V.; SEO, A. Isoflavone aglucones and volatile organic compounds in soybeans; effects of soaking treatments. **Journal of Food Science**, v. 57, p. 414-417, 1992.

HENDRICH, S. Bioavailability of isoflavones. **Journal of Chromatography B**, v. 777, p. 203-210, 2002.

HOU, J.-W.; YU, R.-C.; CHOU, C.-C. Changes in some components of soymilk during fermentation with bifidobacteria. **Food Research Internacional**, v. 33, p. 393-397, 2000.

HSIEH, M.-C.; GRAHAM, T. L. Partial purification and characterization of a soybean (3-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.

INOBUCHI, S.; OHASHI, Y.; NARAI-KANAYAMA, A.; ASO, K.; NAKAGAKI, T.; FUJISAWA, T. Effects of non-fermented and fermented soybean milk intake on faecal microbiota and faecal metabolites in humans. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 63, p. 402-410, 2012.

International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB). **Daidzein Biosynthesis**. Disponível em: <<http://www.enzyme-database.org/reaction/phenol/daidzein.html>>. Acesso em 19. Jul. 2013.

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

JU, Y. H.; FULTZ, J.; ALLRED, K. F.; DOERGE, D. R.; HELFERICH, W. G. Effects of dietary daidzein and its metabolite, equol, at physiological concentrations on the growth of estrogen-dependent human breast cancer (MCF-7) tumors implanted in ovariectomized athymic mice. **Carcinogenesis**, v. 27, n. 4, p. 856-863, 2006.

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.

KIM, J. J.; KIM, S. H.; HAHN, S. J.; CHUNG, I. M. Changing soybean isoflavone composition and concentrations under two different storage conditions over three years. **Food Research International**, v. 38, p. 435-444, 2005.

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, p. 2227-2233, 1991.

KUSHI, L. H.; MEYER, K. A.; JACOBS-Jr, D. R. Cereals, legumes, and chronic disease risk reduction: evidence from epidemiologic studies. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 50, p. 451S-458S, 1999.

LARKIN, T.; PRICE, W. E.; ASTHEIMER, L. The key importance of soy isoflavone bioavailability to understanding health benefits. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, p. 538-552, 2008.

LI, J.; GANG, D.; YU, X.; HU, Y.; YUE, Y.; CHENG, W.; PAN, X.; ZHANG, P. Genistein: the potential for efficacy in rheumatoid arthritis. **Clinical Rheumatology**, v. 32, p. 535-540, 2013.

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

LIU, K. **Soybeans as functional foods and ingredients**. Champaign, Illinois: AOCS Press, 2004.

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

MATSUURA, M.; OBATA, A. (3-glucosidases from soybeans hydrolyse daidzin and genistin. **Journal of Food Science**, v. 58, p. 144-147, 1993.

MAUBACH, J.; BRACKE, M. E.; HEYERICK, A.; DEPYPERE, H. T.; SERREYN, R. F.; MAREEL, M. M.; KEUKELEIRE, D. D. Quantitation of soy-derived phytoestrogens

in human breast tissue and biological fluids by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 784, p. 137-144, 2003.

MEKO'O, D. J. L.; XING, Y.; SHEN, L. L.; BOUNDA, G.-A.; WU, J.; LI, T.; CAO, R.; LIU, J. J. Production of ethanol from cellobiose by recombinant (3-glucosidase-expressing *Pichia pastoris*: Submerged shake flask fermentation. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, p. 9108-9117, 2012.

MENEZES, E. W.; SANTOS, N. C.; GIUNTINI, E. B.; DAN, M. C. T.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Brazilian flavonoid database: Application of quality evaluation system. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, p. 629-636, 2011.

MESSINA, M.; NAGATA, C.; WU, A. H. Estimated asian adult soy protein and isoflavone intakes. **Nutrition and Cancer**, v. 55, p. 1-12, 2006.

MO, H.; KARILUOTO, S.; PIIRONEN, V.; ZHUC, Y.; SANDERS, M. G.; VINCKEN, J.-P.; WOLKERS-ROOIJACKERS, J.; NOUT, M. J. R. Effect of soybean processing on content and bioaccessibility of folate, vitamin B12 and isoflavones in tofu and tempe. **Food Chemistry**, v. 141, p. 2418-2425, 2013.

MORAES, R. M. A.; BERTAGNOLLI, P. F.; VERNETTI-JR, F.; ANTUNES, I. F.; GARRAFA, M.; BENEDETTI, V. A.; CARRÃO-PANIZZI, M. C. Extensão de indicação da cultivar BRS 257 para o estado do Rio Grande do Sul. In: Reunião de Pesquisa de Soja da Região Sul, 35., 2007, Santa Maria. **Atas e resumos...** Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2007. p. 46. Disponível em <<http://www.cnpt.embrapa.br/culturas/soja/Ata2007.pdf>>. Acesso em: 25 jul. 2013.

MORANT, A. V.; JORGENSEN, K.; JORGENSEN, C.; PAQUETTE, S. M.; SÁNCHEZ-PÉREZ, R.; MOLLER, B. L.; BAK, S. (3-glucosidases as detonators of plant chemical defense. **Phytochemistry**, v. 69, p. 1795-1813, 2008.

NAIR, S. S. D., LEITCH, J. W.; FALCONER, J.; GARG, M. L. Prevention of cardiac arrhythmia by dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids and their mechanism of action. **The Journal of Nutrition**, v. 127, p. 383-393, 1997.

NAKAMURA, Y.; TSUJI, S.; TONOGAI, Y. Determination of the levels of isoflavonoids in soybeans and soy-derived foods and estimation of isoflavonoids in the Japanese daily intake. **Journal of AOAC International**, v. 83, p. 635-650, 2000.

NIAMNUY, C.; NACHAISIN, M.; POOMSA-ad, N.; DEVAHASTIN, S. Kinetic modelling of drying and conversion/degradation of isoflavones during infrared drying of soybean. **Food Chemistry**, v. 133, p. 946-952, 2012.

PAN, Z.; TANGRATANAVALEE, W. Characteristics of soybeans as affected by soaking conditions. **LWT - Food Science and Technology**, v. 36, p. 143-151, 2003.

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

REED, S. D.; LAMPE, J. M.; QU, C.; GUNDERSEN, G.; FULLER, S.; COPELAND, W. K.; NEWTON, K. M. Self-reported menopausal symptoms in a racially diverse population and soy food consumption. **Maturitas**, v. 75, p. 152-158, 2013.

RIAZ, M. N. **Soy applications in food**. Boca Raton, Flórida: CRC Press, 2006.

RIBEIRO, M. L. L.; MANDARINO, J. M. G.; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; OLIVEIRA, M. C. N.; CAMPOB, C. B. H.; NEPOMUCENO, A. L.; IDA, E. I. Isoflavone content and (3- β -glucosidase activity in soybean cultivars of different maturity groups. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, p. 19-24, 2007.

RIVERA-VARGAS, L. I.; SCHMITTHENNER, A. F.; GRAHAM, T. L. Soybean flavonoid effects on and metabolism by *Phytophthora sojae*. **Phytochemistry**, v. 32, p. 851-857, 1993.

SATHYAMOORTHY, N.; WANG, T. T. Differential effects of dietary phyto-oestrogens daidzein and equol on human breast cancer MCF-7 cells. **European Journal of Cancer**, v. 33, p. 2384-2389, 1997.

SCHEPPACH, W.; LUEHRS, H.; MELCHER, R.; GOSTNER, A.; SCHAUBER, J.; KUDLICH, T.; WEILER, F.; MENZEL, T. Antiinflammatory and anticarcinogenic effects of dietary fibre. **Clinical Nutrition Supplements**, v. 1, p. 51-58, 2004.

SETCHELL, K. D. R.; BROWN, N. M.; LYDEKING-OLSEN, E. The clinical importance of the metabolite equol- A clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. **The Journal of Nutrition**, v. 132, p. 3577-3584, 2002.

SHIN, D.-J.; KIM, W.; KIM, Y. Physicochemical and sensory properties of soy bread made with germinated, steamed, and roasted soy flour. **Food chemistry**, v. 141, p. 517-523, 2013.

SILVA, J. B.; FELBERG, I.; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; LEE, S. Y.; PRUDENCIO, S. H. Relationships among sensory analysis, isoflavone and hexanal contents of soymilk powder. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, p. 1197-1204, 2010.

SILVA, J. B.; PRUDENCIO, S. H.; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; GREGORUT, C.; FONSECA, F.; MATTOSO, L. Study on the flavour of soybean cultivars by sensory analysis and electronic tongue. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 47, p. 1630-1638, 2012.

SONG, W. O.; CHUN, O. K.; HWANG, I.; SHIN, H. S.; KIM, B.-G.; KIM, K. S.; LEE, S.-Y.; SHIN, D.; LEE, S. G. Soy isoflavones as safe functional ingredients. **Journal of Medicinal Food**, v. 10, p. 571-580, 2007.

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

SUZUKI, H.; TAKAHASHI, S.; WATANABE, R.; FUKUSHIMA, Y.; FUJITA, N.; NOGUCHI, A.; YOKOYAMA, R.; NISHITANI, K.; NISHINO, T.; NAKAYAMA, T. An

isoflavone conjugate-hydrolyzing (3-glucosidase from the roots of soybean (*Glycine max*) seedlings: purification, gene cloning, phylogenetics, and cellular localization. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p. 30251-30259, 6 out. 2006.

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, p. 171 -175, 2001.

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, p. 314-319, 2000.

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.

U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. **USDA database for the isoflavone content of selected foods**, Release 2.0. Nutrient Data Laboratory. 2008. Disponível em <<http://www.ars.usda.gov/nutrientdata/isoflav>>. Acesso em: 11 jul. 2013.

United States Department of Agriculture (USDA). **World Agricultural Production**. Table 11: Soybean area, yield, and production. 2013. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/wap/current/default.asp>>. Acesso em: 27 jul. 2013.

U. S Food and Drug Administration (FDA). **Food labeling; reference daily intakes and daily reference values; mandatory status of nutrition labeling and nutriente content revision; serving sizes; proposed rules**. Fed. Reg. 55, p. 29476—29573, 1990.

U. S Food and Drug Administration (FDA). **Food labeling. Health claims: soy protein and risk of coronary heart disease (CHD)**. Fed. Reg. 57732, 21CFR101.82. 1999. Disponível em: <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=101.82>>. Acesso em: 23 jul. 2013.

UZZAN, M.; LABUZA, T. P. Critical issues in R&D of soy isoflavone — enriched foods and dietary supplements. **Journal of Food Science**, v. 69, p. 77—86, 2004.

VAIDYA, N. A.; MATHIAS, K.; ISMAIL, B.; HAYES, K. D.; CORVALAN, C. M. Kinetic modeling of malonylgenistin and malonyldaidzin: conversions under alkaline conditions and elevated temperatures. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 3408—3413, 2007.

VILLARES, A.; ROSTAGNO, M. A.; GARCÍA-LAFUENTE, A.; GUILLAMÓN, E.; MARTÍNEZ, J. A. Content and profile of isoflavones in soy-based foods as a function of the production process. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, p. 27—38, 2011.

- VISNEVSCHI-NECRASOV, T.; FARIA, M. A.; CUNHA, S. C.; HARRIS, J.; MEIMBERG, H. W. E.; CURTO, M. A. C.; PEREIRA, M. C.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; NUNES, E. Isoflavone synthase (IFS) gene phylogeny in *Trifolium* species associated with plant isoflavone contents. **Plant Systematics and Evolution**, v. 299, p. 357—367, 2013.
- VITALE, D. C.; PIAZZA, C.; MELILLI, B.; DRAGO, F.; SALOMONE, S. Isoflavones: estrogenic activity, biological effect and bioavailability. **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 38, p. 15—25, 2013.
- WADA, K.; NAKAMURA, K.; TAMAI, Y.; TSUJI, M.; KAWACHI, T.; HORI, A.; TAKEYAMA, N.; TANABASHI, S.; MATSUSHITA, S.; TOKIMITSU, N.; NAGATA, C. Soy isoflavone intake and breast cancer risk in Japan: from the Takayama study. **International Journal of Cancer**, v. 133, p. 952—960, 2013.
- WANG, G.; LIU, C.; HONG, J.; MA, Y.; ZHANG, K.; HUANG, X.; ZOU, S.; ZHANG, M. Comparison of process configurations for ethanol production from acid- and alkali-pretreated corncob by *Saccharomyces cerevisiae* strains with and without (3-glucosidase expression. **Bioresource Technology**, v. 142, p. 154-161, 2013.
- WANG, H.-J.; MURPHY, P. A. Isoflavone composition of American and Japanese soybeans in Iowa: effects of variety, crop year, and location. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 1674-1677, 1994.
- WANG, H.-J.; MURPHY, P. A. Mass balance study of isoflavones during soybean processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 2377-2383, 1996.
- WANG, Y.; ZHANG, C.; LI, J.; XU, Y. Different influences of (3-glucosidases on volatile compounds and anthocyanins of Cabernet Gernischt and possible reason. **Food Chemistry**, v. 140, p. 245-254, 2013.
- WARDHANI, D. H.; VAZQUEZ, J. A.; PANDIELLA, S. S. Kinetics of daidzin and genistin transformations and water absorption during soybean soaking at different temperatures. **Food Chemistry**, v. 111, p. 13-19, 2008.
- WATANABE, S.; YAMAGUCHI, M.; SOBUE, T.; TAKAHASHI, T.; MIURA, T.; ARAI, Y.; MAZUR, W.; WÀHÀLÀ, K.; ADLERCREUTZ, H. Pharmacokinetics of soybean isoflavones in plasma, urine and feces of men after ingestion of 60 g baked soybean powder (kinako). **The Journal of Nutrition**, v. 128, p. 1710-1715, 1998.
- WERNER, D. Molecular biology and ecology of the Rhizobia-legume symbiosis. In: PINTON, R., VARANINI, Z., NANNIPIERI, P. (Eds.). **The rhizosphere: biochemistry and organic substances at the soil-plant interface**. 2. ed. Boca Raton, Filadélfia: CRC Press, 2007, p. 237-266.
- WESTON, L. A.; MATHESIUS, U. Flavonoids: their structure, biosynthesis and role in the rhizosphere, including allelopathy. **Journal of Chemical Ecology**, v. 39, p. 283-297, 2013.

WILSON, L. A. Comparison of lipoxygenase-null and lipoxygenase-containing soybeans for foods. In: PIAZZA, G. J (Ed.). **Lipoxygenase and Lipoxygenase Pathway Enzymes**. Champaign, Illinois: AOCS Press, 1996. p. 209-225.

WUTTKE, W.; JARRY, H.; SEIDLOVÁ-WUTTKE, D. Isoflavones - Safe food additives or dangerous drugs? **Ageing Research Reviews**, v. 6, p. 150-188, 2007.

XU, X.; WANG, H.-J.; MURPHY, P. A.; COOK, L.; HENDRICH, S. Daidzein is a more bioavailable soymilk isoflavone than is genistein in adult women. **The Journal of Nutrition**, v. 124, p. 825-832, 1994.

YEO, S.-K.; LIONG, M.-T. Effect of prebiotics on viability and growth characteristics of probiotics in soymilk. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, p. 267-275, 2010.

YOO, D. C.; HARA, T.; FUJITA, N.; WAKI, T.; NOGUCHI, A.; TAKAHASHI, S.; NAKAYAMA, T. Transcription analyses of *GmICHG*, a gene coding for a (3-glucosidase that catalyzes the specific hydrolysis of isoflavone conjugates in *Glycine max* (L.) Merr. **Plant Science**, v. 208, p. 10-19, 2013.

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

YUAN, J.-P.; LIU, Y.-B.; PENG, J.; WANG, J.-H.; LIU, X. Changes of isoflavone profile in the hypocotyls and cotyledons of soybeans during dry heating and germination. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 9002-9010, 2009.

ZHAO, G.; ETHERTON, T. D.; MARTIN, K. R.; WEST, S. G.; GILLIES, P. J.; KRIS-ETHERTON, P. M. Dietary α -linolenic acid reduces inflammatory and lipid cardiovascular risk factors in hypercholesterolemic men and women. **The Journal of Nutrition**, v. 134, p. 2991-2997, 2004.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos foram redigidos na forma de artigo científico. Este foi submetido à avaliação da Journal of Agricultural and Food Chemistry.

5.1 ARTIGO CIENTÍFICO

5.1.1 Optimisation of Soybean Hydrothermal Treatment for the Conversion of β -glucoside Isoflavones to Aglycones

Fernando Sanches de Lima^a, Elza louko Ida^{a,b}

ABSTRACT: The objective of this work was to optimise the conditions for the soaking process of soybean for maximal conversion of β -glucoside isoflavones into aglycones using response surface methodology. The variables investigated were the time (3.17, 4, 6, 8, and 8.83 h) and temperature (40.86, 45, 55, 65, and 69.14 °C) for the soaking of soybean in 1:1.5 (w/w) ratio with a buffer solution pH 6. The maximum aglycones content (1.22 $\mu\text{mol g}^{-1}$) in soaked soybeans was estimated and validated at 55 °C and 6 h of soaking. In this condition, the hydrothermally treated soybean grains showed a minimum content of β -glucoside isoflavones and low β -glucosidase activity. A 29.9% reduction in total isoflavone content of the system was estimated at 69.14 °C independent of soaking time, attributed to the thermal instability of malonylglucosides. This work may contribute to the preparation of soy products rich in aglycones from hydrothermally treated soybean.

Keywords: Soybean isoflavones. Aglycones. Hydrothermal processing. β glucosidase.

INTRODUCTION

During the physiological processes of vegetables, many secondary metabolites are formed that are called phytochemicals. These secondary metabolites have been extensively investigated and characterised as bioactive compounds that can benefit human health.¹ The soybean isoflavones have been one of the most investigated phytochemicals due to their ability in reducing the incidence some types of cancer,² osteoporosis,³ and cardiovascular disease⁴ as well as relieve climacteric

^a Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, 86057-970, Londrina, PR, Brazil

^b Corresponding author. Tel.: +55 43 3371 5971; fax: +55 43 3371 4080. E-mail address: elida@uel.br (E.I. Ida).

symptoms^{5,6} in postmenopausal women. The effect of these isoflavones is strongly influenced by their chemical structure.⁷

The isoflavones in soybeans and soy products occur in four distinct chemical classes of structures: the β -glucosides (daidzin, genistin and glycitin), 6"-O-acetylglucosides, 6"-O-malonylglucosides and aglycones (daidzein, genistein and glycitein). Together, these compounds total 12 different isoflavone forms (Figure 1). The malonylglucoside isoflavones are the major forms found in different soybeans cultivars and account for 67 to 82% of the total isoflavones.^{8,9} The aglycone forms are present in lower levels, varying from 1 to 7% of the total isoflavones molar concentration from soybeans,^{8,10} and there is an interest in their potential health benefits.^{11,12} The genistein aglycone, with hydroxyl groups at carbon positions 5, 7 and 4' of the aromatic rings, exhibits greater antioxidant power.¹³ The content and composition of the different isoflavones forms in soybean grains are influenced by many factors, such as genetic,¹⁴ growing location,¹⁵ harvest year,¹⁵ and pathogen load in soybean growing season.¹⁶ The total isoflavone content of 18 soybean cultivars with groups of different maturities ranged from 71.1 to 174.30 mg/100 g.⁹

The gut microbiota play a significant role in the bioavailability of polyphenols and their biological activities *in vivo*.^{12,17} The glucosylated isoflavones are poorly absorbed in the human small intestine because of their molecular weight and hydrophilicity.¹¹ After ingestion of β -glucoside isoflavones the daidzin, genistin, and glycitin forms are hydrolysed by β -glucosidase enzymes present in gut microbiota to their corresponding aglycones; daidzein, genistein, and glycitein, respectively.^{12,18} These enzymes catalyse the hydrolysis of the isoflavones β -glucosidic bonds and are also present in soybeans themselves or may be produced by various microorganisms.¹⁹ Several studies²⁻⁷ have shown that aglycone isoflavones have high bioactivity; thus, there is a growing interest in enriching soy products with these compounds.²⁰

The soaking of soybean grains is a very important process used for the preparation of various soy products, such as soymilk, tofu and tempeh. This process is responsible for softening the grain and affects subsequent processes, such as milling, cooking and extraction of soy proteins.²¹ The hydrothermal treatment of soybeans influences the isoflavone profile, favouring β -glucosidase activity in the conversion of β -glucoside isoflavones to aglycones.^{22,23} In the soybean soaking at different temperatures for 6 h the conversion of β -glucoside isoflavones into

aglycones occurred at an optimal temperature of 50 °C.²² Hydrothermally treated soybean cotyledons at 50 °C for 12 h in 1:1.2 (w/w) ratio with deionised water showed a molar concentration of aglycones of 0.49 $\mu\text{mol g}^{-1}$.²³ Differences in the conversion of β -glucoside isoflavones to aglycones during soaking process of soybean cultivars occurred due to differences in the water absorption rate and the quantity of the eluted components, such as isoflavones and β -glucosidases.²⁴

The aim of the present study was to optimise the conditions of the soybean grain soaking process to convert the maximum β -glucoside isoflavones into aglycones using central composite design (CCD).

MATERIAL AND METHODS

Materials and Standards. The soybean [*Glycine max* (L.) Merr.], lipoxygenase-null cultivar BRS 257 (BR93-32109 X BR94-23396 genealogy) from crop year 2012, was provided by Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Soja), Londrina/Paraná, Brazil. Initially, the soybean grains were characterised by ultra performance liquid chromatography (UPLC) to determine the content of the different isoflavone forms. The 6"-0-acetylglucosides and the 6"-0-malonylglucosides (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan), and the β -glucosides and the aglycones (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) were used as standards of the isoflavones. For the determination of β -glucosidase activity, *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (*p*-NPG) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) was used as the substrate, and for construction of the calibration curve was used chromogenic reagent *p*-nitrophenol (*p*-NP) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA).

The reagents used in the analyses were analytical grade or liquid chromatography grade.

Hydrothermal treatment. The whole soybean grains (selected and cleaned) were subjected to hydrothermal treatment to evaluate the effects of the time (X_1) and temperature (X_2) of soaking on the different isoflavone forms in both the soaked grain and the residual solution (solution not absorbed by the soybean grains). The β -glucosidase activity was evaluated only in the soaked grain. CCD with 2^2 factorial, 4 axial points and 3 replicates at the central point was used, and a total of 11 randomised experiments were evaluated (Table 1). Table 1 presents the code and

the real levels of the independent variables: X_1 (soaking time, h) and X_2 (soaking temperature, °C) for the CCD.

For each assay, 100 g whole soybean grains was used in 1:1.5 (w/w) ratio with a 0.05 M phosphate-citrate buffer solution (pH 6.0) and kept in a water bath under different time and temperature combinations as specified by the experimental design (Table 1). This pH value was used on the basis of preliminary study and literature data^{22,25} in relation to the optimum activity for β -glucosidase. At the end of each assay, the hydrothermally treated soybean grains were drained and immediately cooled in an ice bath until they reached 25 °C. The excess solution was removed and the mass of the residual solution was obtained by calculating the difference between the total mass of the system (the sum of the mass of washed soybeans and the mass of the phosphate-citrate buffer solution) and the mass of the soaked grains dried with absorbent paper. For this quantification, there was no consideration for mass loss to the environment. The hydrothermally treated soybeans and the residual solution were lyophilised (Christ Alpha 2-4 LD plus, Osterode am Harz, Germany), and additionally, the grains were milled (Ika A11 basic, St. Louis, MO, USA) and kept at -22 °C until the analyses.

The response functions were evaluated in the hydrothermally treated soybean grains as follows: GLU_{SS} (umol of β -glucosides g^{-1} of dry hydrothermally treated soybean), AGL_{SS} (umol of aglycones g^{-1} of dry hydrothermally treated soybean), βGLU_{SS} (β -glucosidase activity unit g^{-1} of dry hydrothermally treated soybean), $M.GLU_{SS}$ (umol of malonylglucosides g^{-1} of dry hydrothermally treated soybean). The response function of the residual solution was measured as AGL_{RS} (umol of aglycones/100 mL of residual solution). In addition, a mass balance of isoflavones of the system was evaluated by response function $TISO_{SS+RS}$ (mg of total isoflavones in hydrothermally treated soybeans and the residual solution).

Activity of β -glucosidase. A 200 mg sample of hydrothermally treated soybeans and 3.0 mL of 0.05 M citrate buffer (pH 4.5) containing 0.1 M NaCl was shaken every 15 min for 1 h at 25 °C.²⁶ The samples was centrifuged (4 °C, 8200 x g , 15 min; Centrifuge 5804R - Eppendorf, Hamburg, Germany) and the supernatant was kept for enzyme activity analysis using the method of Matsuura and Obata,²⁷ with minor modifications. The substrate, p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (p-NPG, 0.8 mL, 1 mM; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) in phosphate-citrate buffer (0.1 M, pH 5) was transferred to a test tube and kept in a water bath at 30 °C

for 10 min . Then, 0.2 mL of aforementioned supernatant was added and the tube was kept in the water bath at 30 °C for another 30 min. The reaction was quenched with 1.0 mL of 0.5 M sodium carbonate and the contents were immediately measured in a spectrophotometer (Biochrom Libra S22, Cambridge, England) at 420 nm. The blank solution was composed of 0.2 mL of 0.05 M citrate buffer (pH 4.5) containing 0.1 M, 0.8 mL of substrate solution and 1 mL of 0.5 M sodium carbonate solution. The quantity of p-nitrophenol (p-NP) released by the enzymatic reaction was determined by comparison to a calibration curve prepared from varying the concentration of p-NP from 0.04 to 0.32 μmol in a 5 mL total reaction. One activity unit (AU) was defined as the quantity of enzyme necessary to release 1 μmol of p-NP min^{-1} under the experimental conditions. The results were expressed as β - glucosidase activity levels (AU g^{-1} of sample, dry weight).

Determination of isoflavones by UPLC. The samples, lyophilised and milled, were defatted with hexane in 1:10 (w/v) ratio by continuous rotary agitation for 1h at 25 °C followed by vacuum filtration. The isoflavone extraction of defatted samples and residual solution was performed using a extraction solution containing ultra-pure water, acetone and ethanol (1:1:1, v/v/v).²⁸ The extraction was performed in triplicate with 0.3 g samples in 6 mL of extraction solution. The samples were then vortexed each 15 min for 1 h at 25 °C. The mixture was then placed in an ultrasonic bath for 15 min at 25 °C, centrifuged ($794 \times g$ for 15 min at 4 °C; Centrifuge 5804R - Eppendorf, Hamburg, Germany) and filtered (Millex-GV, PVDF hydrophilic membrane, 0.22 μm pore size; Millipore, Billerica, MA, USA). Triplicate 1.4 μL aliquots of filtrate were automatically injected into a Waters UPLC (Acquity UPLC® System, Waters, USA). A 2.1 mm x 50 mm reversed-phase column (model ACQUITY- UPLC BEH C18, Waters, USA) with a 1.7 μm particle size was used. Elution gradient was performed by using glacial acetic acid solution at pH 3 (eluent A) and acetonitrile (eluent B), which were both applied at a flow rate of 0.7 mL min^{-1} at 35 °C. The gradient began with 90% A and 10% B and after 8 min running the elution ratio ultimately reached 0% A and 100% B. After 9 min, the eluent ratio was returned to the initial conditions with a total run time of 10 min. A diode array detector (DAD-Waters) was used to monitor at a wavelength of 260 nm. External calibrations were calculated from standard solutions (0.1, 0.05, 0.01, 0.005, 0.001, and 0.0005 mg mL^{-1}) for each isoflavone. The standards were injected in triplicate to yield the corresponding chromatograms for each of the isoflavones with their corresponding

retention times e UV spectra. The peaks for each isoflavone compound sample were identified by comparing the retention times and UV spectra in the respective reference standard regions. External calibrations were calculated from standard solutions (0.1, 0.05, 0.01, 0.005, 0.001, and 0.0005 mg mL⁻¹) for each isoflavone. The application used to process the data was coupled with the chromatograph-generated calibration curves. Since different isoflavone forms have different molecular weights, for better comparison, the isoflavone concentrations were expressed as molar basis. Thus, the isoflavone concentrations (made from triplicates of each sample) were calculated and expressed in umol of β -glucosides g⁻¹ of dry weight and full fat, umol of malonylglucosides g⁻¹ of dry weight and full fat, umol of aglycones g⁻¹ of dry weight and full fat, and umol of aglycones/100 mL of residual solution. A mass balance of isoflavones of the system was evaluated and expressed as mg of total isoflavones (hydrothermally treated soybeans and the residual solution) after normalization of the differences of the glucosylated forms molecular weights into their corresponding aglycones.

Statistical Analysis. The response surface methodology (RSM) was applied using CCD to optimise the hydrothermal treatment of soybeans for the maximal conversion of β -glucoside isoflavones into aglycones. The model for each response was expressed in the form of Equation 1, where Y = the response, x_1 and x_2 = the levels of the coded variables, β = the estimated coefficients on the response surface and e = the error.

$$Y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{12}x_1x_2 + e \quad (1)$$

The response functions were obtained and followed by analysis of variance (ANOVA) and regression analysis conducted using the software program Statistic 8.0 (Statsoft, Tulsa, OK, USA). The response surface graphs were constructed from the adjusted models and the profiles for the predicted values and desirability of the responses were evaluated. The validation of the model response function AGL_{SS} (umol of aglycones g⁻¹ of dry hydrothermally treated soybeans) was performed by comparing the estimated response by the model with the average ($n = 3$) content of aglycones obtained experimentally in the optimum condition of soaking using the Student t-test ($\alpha = 0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

Isoflavone content in the whole soybean. In the whole soybean grains from cultivar BRS 257, the total isoflavone content was $9.79 \text{ } \mu\text{mol g}^{-1}$ of dry weight. Wang and Murphy⁸ showed a variation in the total isoflavone content from 2.62 to $8.97 \text{ } \mu\text{mol g}^{-1}$ at different soybean cultivars. The total isoflavone content in soybeans is genetically determined and influenced by environmental conditions²⁹ with the temperature as the main factor.³⁰ Furthermore, the pathogen load in soybean growing season also affects isoflavone concentration in seeds,¹⁶ since isoflavones play an important role in the defense response of soybean to pathogen attack.³¹ The different isoflavone forms showed the following contents: $0.99 \text{ } \mu\text{mol } \beta\text{-glucosides g}^{-1}$ ($0.34 \text{ } \mu\text{mol daidzin g}^{-1}$, $0.20 \text{ } \mu\text{mol glycitin g}^{-1}$ and $0.45 \text{ } \mu\text{mol genistin g}^{-1}$); $8.69 \text{ } \mu\text{mol malonylglucosides g}^{-1}$ ($2.48 \text{ } \mu\text{mol malonyldaidzin g}^{-1}$, $1.73 \text{ } \mu\text{mol malonylglycitin g}^{-1}$ and $4.48 \text{ } \mu\text{mol malonylgenistin g}^{-1}$) and $0.11 \text{ } \mu\text{mol aglycones g}^{-1}$ ($0.11 \text{ } \mu\text{mol genistein g}^{-1}$). The acetylglucosides were not detected by UPLC confirming the trace amounts or complete absence described in most soybean cultivars^{8,29,32} On the other hand, the content of the malonylglucosides was elevated and represented 88.76% of the total isoflavones molar concentration. The Maple Arrow soybean cultivar showed $10.69 \text{ } \mu\text{mol malonylglucosides}$, which represented 65% of the total isoflavones molar concentration.³³ The content and profile of the different isoflavones forms in soybean grains are influenced by many factors, such as genetic,¹⁴ growing location¹⁵, harvest year,¹⁵ but the genetic regulation of isoflavone biosynthesis in plants is not well understood.³⁴

Relationship among β -glucosides, malonylglucosides and aglycones content and β -glucosidase activity. The effect of the independent variables X1 (soaking time, h) and X2 (soaking temperature, °C) was studied during hydrothermal treatment of soybean grains (Table 1) using the central composite design (CCD).

According to the analysis of regression and analysis of variance (ANOVA) to the response functions GLU_{SS}, AGL_{SS} and β GLU_{SS} the variable X2 (soaking temperature, °C) exhibited a significant linear effect ($p < 0.05$) on the response functions GLU_{SS} and β GLU_{SS}, whereas the quadratic effect of variable X₂ (soaking temperature, °C) was significant ($p < 0.05$) on these three response functions (Table 2). The X1 (soaking time, h) and X2 (soaking temperature, °C)

variables as well as the X_1X_2 interaction were significant on the response function M.GLUSS (umol malonylglucosides g^{-1}). However, when were excluded the non-significant terms of the equation only the linear effect of variable X_2 became significant.

The linear and quadratic effects of variables X_1 (soaking time, h) and X_2 (soaking temperature, °C), respectively, were significant on the response function AGLRS (umol aglycones/100 mL of residual solution) (Table 2). In these estimated models, was observed that the interaction of variables X_1 and X_2 did not show a significant effect ($p > 0.05$) on the response functions, indicating that these variables exerted independent effects. Regarding the coded variables, the mathematical models can be described as:

$$GLU_{SS} = 0.18 + 0.20x_2 + 0.40x_2^2 \quad (2)$$

$$M.GLU_{SS} = 6.73 - 1.51x_2 \quad (3)$$

$$AGL_{SS} = 1.22 + 0.07x_1 - 0.11x_1^2 + 0.08x_2 - 0.49x_2^2 \quad (4)$$

$$\beta GLU_{SS} = 0.015 - 0.050x_2 + 0.030x_2^2 \quad (5)$$

$$AGL_{RS} = 2.08 + 0.41x_1 - 0.13x_1^2 + 0.32x_2 - 0.89x_2^2 \quad (6)$$

The models exhibited determination coefficients (R^2) of 0.90, 0.90, 0.92, 0.95 and 0.87, respectively, and the experimental data were properly adjusted to the model.

As shown in Equation 2 and Figure 2a-b, was observed that variable X_2 (soaking temperature, °C) had a positive quadratic effect on the GLU_{SS} (umol β -glucosides g^{-1}) and when $x_2 = 0$ or $X_2 = 55$ °C the response function estimated showed a minimum value (0.18 umol β -glucosides g^{-1}).

Equation 3 and Figure 3g-h show that the linear effect of X_2 (soaking temperature, °C) was negative on M.GLU_{SS} (umol malonylglucosides g^{-1}) and when $x_2 = +1.41$ or $X_2 = 69.14$ °C the estimated response function has a low value (4.59 umol malonylglucosides g^{-1}). This low estimated value of the malonylglucosides can be attributed to the thermal instability of these isoflavones.^{33,35,36} The reduction in content of malonylglucosides with increasing soaking temperature were probably not due to enzymatic hydrolysis, since they are poor substrates for β -glucosidase.³⁷³⁸

In Equation 4 and Figure 2c-d verifies that the quadratic term of the variable X_2 (soaking temperature, °C) had a negative effect on the response function

AGL_{SS} (umol aglycones g⁻¹) and when $x_2 = 0$ or $X_2 = 55$ °C, combined with $X_1 = 6$, the desirability and response function estimated by the model showed a maximum value (1.22 umol aglycones g⁻¹) in the experimental range investigated. Through model validation at this point, the contribution to the molar concentration of aglycone isoflavones was 49.63% and 50.37% of genistein and daidzein, respectively. Glycitein was not detectable, confirming the complete absence described^{23,29} in most soybean cultivars as well as apparent lower affinity of β -glucosidase toward glycitin.³⁷ When $X_2 = 55$ °C for soaking, the minimum content for GLU_{SS} (0.18 umol β -glucosides g⁻¹) and a maximum value of AGL_{SS} (1.22 umol aglycones g⁻¹) were estimated according to response surface, desirability and profiles of the predicted values (Figure 2a-b, c-d). Therefore, to obtain the maximum value for the AGL_{SS} response function, the recommended treatment for the soybean grains is the condition of the central point, which is 6 h of soaking (X_1) at a temperature of 55 °C (X_2).

In this study, a soaking time of 6 h at 55 °C reached 132.82% moisture content based on dry weight, where the minimum value recommended for soy grinding processes has been described as 120% dry weight.²¹ Thus, a soybean soaking time over 6 h would not be necessary as a preliminary step for the preparation or processing of soy products rich in aglycone isoflavones from hydrothermally treated soybean grains. However, the aglycone isoflavones in soybean cotyledons soaked²³ for 12 h in water at different ratios (1:1.2 to 1:3, w/w, cotyledons: water) were 0.49 and 0.76 umol (total aglycones g⁻¹, dry weight), respectively, and were lower than the results found herein. This may have been due to soaking under optimal conditions for β -glucosidase activity used herein, whose pH range of the enzyme toward glucosylated isoflavones is between 5 and 7.^{22,25,39}

In Equation 5, the linear term of the variable X_2 (soaking temperature, °C) was negative while the quadratic term of this variable was positive, and when $x_2 = 0$ and +1.41, or $X_2 = 55$ °C and 69.14 °C, respectively, the estimated response by the model for β GLU_{SS} (AU g⁻¹) had the lowest values of β -glucosidase activity (0.015 and 0.003 AU g⁻¹, respectively) within the experimental range investigated (Figure 2e-f). According to Wardhani, Vázquez and Pandiella,⁴⁰ the maximum β -glucosidase activity in soaked soybeans occurred after 1 h of soaking at 50 °C, which was followed by a reduction in enzymatic activity in soaked grains after this time. Thus, the β -glucosidase activity found in this study has already been reduced in the

soaked grains at the central point condition after 6 h of soaking at 55 °C. In addition, when the combination of coded variables $x_1 = 0$ (soaking time of 6 h) and $x_2 = +1$ (soaking temperature at 65 °C) were used, there was also a contribution to an increased content of aglycones ($AGL_{SS} = 0.81 \text{ } \mu\text{mol aglycones g}^{-1}$) in the hydrothermally treated soybean grains. The proteins may have a protective effect against the thermal degradation of isoflavones and influence the process of conversion of isoflavones.⁴¹ Thus, hydrolytic activity of β -glucosidase must have been favored by exposure of β -glucosides following the partial denaturation of the globular soy proteins with increasing soaking temperature of the soybean. However, β -glucosidase activity was not detected in this condition, which is likely due to the loss of enzyme stability after its peak activity. Furthermore, the β -glucosidase enzyme may be inhibited by the products formed from its reaction, such as glucose and aglycones,⁴² which also justifies its low activity in the hydrothermally treated soybean grains at the central point condition in this study.

In Eq. 6 and Fig. 3i-j, the variable X_2 (soaking temperature, °C) had negative quadratic effect on the response function AGL_{RS} ($\mu\text{mol aglycones}/100 \text{ mL}$ of residual solution), and when $x_2 = 0$ or $X_2 = 55 \text{ } ^\circ\text{C}$ was estimated the highest migration of aglycones into soaking medium ($2.41 \text{ } \mu\text{mol aglycones}/100 \text{ mL}$ of residual solution) within the experimental range investigated. After soaking cotyledons²³ for 12 h at a 1:3 ratio (cotyledons:water, w/w), $11 \text{ } \mu\text{mol}$ of aglycones/100 g of residual solution was observed. This observation²³ was likely due to the migration of these isoflavones, which was favoured by dehulling the grains and by the concentration of isoflavones in a small volume of the residual solution. The excessive diffusion of isoflavones into the aqueous phase observed herein must have been impeded, in part, due to use of a low ratio of soy to soaking solution (1:1.5, w/w), where there was a solids concentration in the soaking medium with increasing water absorption by soybean.

Soaking at the conditions of the central point ($X_1 = 6 \text{ h}$ and $X_2 = 55 \text{ } ^\circ\text{C}$) also contributed to an increase in the estimated value for this response function ($AGL_{RS} = 2.08 \text{ } \mu\text{mol aglycones}/100 \text{ mL}$ of residual solution). This condition was responsible for the maximum estimated value of aglycones in the soaked soybean grains ($AGL_{SS} = 1.22 \text{ } \mu\text{mol aglycones g}^{-1}$), which again indicated that the optimum point was reached for the greatest retention of aglycones in the soaked soybeans (Figure 2c-d). The difference in the rate of water absorption by different soybean cultivars interferes with the amount of leached components, including isoflavones and

the β -glucosidase enzyme.²⁴ The mass balance of the isoflavones³⁵ in various soy processing methods showed a 12% loss of isoflavones in step involving soybean soaking in tap water for 13 h at 25 °C, but the ratio was not described. The aglycone isoflavones have intermediate polarity⁴³ and, therefore, are less soluble in aqueous media in relation to glucosylated isoflavones. On the other hand, the glucosylated isoflavones have high molecular weights and hydrophilicity and they can also be associated with soy protein, glycinin and β -conglycinin, in cases involving migration, extraction and precipitation of these proteins.⁴⁴ The hydrothermal treatment of soybean grains with a lower ratio of soy to water reduces isoflavone losses to the aqueous medium and may contribute to better isoflavone retention in the soaked soybeans.²³

Mass balance of isoflavones of the systems. The analysis of variance (ANOVA) and the regression analysis for the response function TISOSS+SR (mg of total isoflavones of hydrothermally treated soybean grains and the residual solution) indicated that only the linear term of the variable X_2 (soaking temperature, °C) was significant (Table 1). Thus, the estimated mathematical model was constructed as follows:

$$\text{TISO}_{\text{SS}+\text{SR}} = 199.91 - 22.44X_2 \quad (7)$$

The model had a determination coefficient (R^2) of 0.83, indicating that the model has been adjusted properly to the experimental data. In Equation 7, was observed that variable X_2 (soaking temperature, °C) has a negative linear effect on the response function TISO_{SS+RS} (mg total isoflavones) and when $x_2 = +1.41$ ($X_2 = 69.14$ °C), the estimated response function by the model showed a low value of 168.17 mg of total isoflavones (Figure 3k-l). The estimated model of this response function was similar to the M.GLU_{SS} ($\mu\text{mol malonylglucosides g}^{-1}$) response function and is associated with a high proportion of the malonylglucosides in soybean grains, which represent 88.76% of the total isoflavones molar concentration. While 100 g of whole soybean grains contained 239.91 mg of total isoflavones, the model estimated a 29.9% reduction in total isoflavone content when the grain was hydrothermally treated at $X_2 = 69.14$ °C independent from the X_1 variable, which was mainly attributed to the thermal instability of malonylglucosides. Thus, the sum of the total isoflavone content in the treated grains and the residual solution did not correspond

to the observed total isoflavone content in the soybeans used as the raw material. These results showed that reactions occurred during hydrothermal treatment to convert and/or degrade isoflavones.^{23,40} Furthermore, the protein may have a protective effect against the thermal degradation of isoflavones,⁴¹ but denaturation state of protein in this soaking condition may have reduced this effect. The transformation of soy isoflavones during soaking was described⁴⁰ as a first-order reaction with a kinetic constant of conversion, degradation and mass transfer to the aqueous phase. The chemical structure of isoflavones dictates their stability under variable pH and temperature conditions,⁴⁵ where the daidzin series has been shown to contribute to the greater loss in total isoflavones during soybean processing.^{45,46}

Overall, the results showed that the soybean hydrothermal treatment favored β -glucosidase activity for the conversion of β -glucoside isoflavones to aglycones, wherein the buffer solution at pH 6 used as soaking medium contributed to these results. Thus, it was possible to optimise the content of aglycones in the soaked soybean with reduced soaking time, which was achieved for 6 h at 55 °C. The reduction in total isoflavones content of the system with increasing treatment temperature was attributed to the thermal instability of malonylglucosides. This work may contribute to the preparation of soy products rich in aglycones from hydrothermally treated soybean.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was partially funded by Fundação Araucária/CNPq, PRONEX Program. FSL would like to thank CNPq for a graduate scholarship, and EII is a CNPq Research Fellow.

REFERENCES

- (1) Hooper, L.; Cassidy, A. A review of the health care potential of bioactive compounds. *J. Sci. Food Agric.* **2006**, 86, 1805-1813.
- (2) Wada, K.; Nakamura, K.; Tamai, Y.; Tsuji, M.; Kawachi, T.; Hori, A.; Takeyama, N.; Tanabashi, S.; Matsushita, S.; Tokimitsu, N.; Nagata, C. Soy isoflavone intake and breast cancer risk in Japan: from the Takayama study. *Int. J. Cancer.* **2013**, 133, 952-960.

- (3) Atteritano, M.; Mazzaferro, S.; Frisina, A.; Cannata, M. L.; Bitto, A.; Anna, R. D'; Squadrito, F.; Macrì, I.; Frisina, N.; Buemi, M. Genistein effects on quantitative ultrasound parameters and bone mineral density in osteopenic postmenopausal women. *Osteoporosis Int.* **2009**, *20*, 1947-1954.
- (4) Chan, Y.-H.; Lau, K.-K.; Yiu, K.-H.; Li, S.-W.; Chan, H.-T.; Tam, S.; Shu, X.-O.; Lau, C.-P.; Tse, H.-F. Isoflavone intake in persons at high risk of cardiovascular events: implications for vascular endothelial function and the carotid atherosclerotic burden. *Am. J. Clin. Nutr.* **2007**, *86*, 938-945.
- (5) Messina, M. J.; Hughes, C. Efficacy of soyfoods and soybean isoflavone supplements for alleviating menopausal symptoms is positively related to initial hot flush frequency. *J. Med. Food.* **2003**, *6*, 1-11.
- (6) Williamson-Hughes, P. S.; Flickinger, B. D.; Messina, M. J.; Empie, M. W. Isoflavone supplements containing predominantly genistein reduce hot flash symptoms: a critical review of published articles. *Menopause.* **2006**, *13*, 831-839.
- (7) Villares, A.; Rostagno, M. A.; García-Lafuente, A.; Guillaumon, E.; Martinez, J. A. Content and profile of isoflavones in soy-based foods as a function of the production process. *Food Bioprocess Technol.* **2011**, *4*, 27-38.
- (8) Wang, H.-J.; Murphy, P. A. Isoflavone composition of american and Japanese soybeans in Iowa: effects of variety, crop year, and location. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 1674-1677.
- (9) Ribeiro, M. L. L.; Mandarino, J. M. G.; Carrão-Panizzi, M. C.; Oliveira, M. N.; Hoffmann-Campo, C. B.; Nepomuceno, A. L.; IDA, E. I. Isoflavone content and β -glucosidase activity in soybean cultivars of different maturity groups. *J. Food Compos. Anal.* **2007**, *20*, 19-24.
- (10) Wang, H.-J.; Murphy, P. A. Isoflavone content in commercial soybean foods. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 1666-1673.
- (11) Pyo, Y.-H.; Lee, T.-C.; Lee, Y.-C. Enrichment of bioactive isoflavones in soymilk fermented with β -glucosidase-producing lactic acid bacteria. *Food Res. Int.* **2005**, *38*, 551-559.
- (12) Simons, A. L.; Renouf, M.; Hendrich, S.; Murphy, P. A. Metabolism of glycitein (7,4'-Dihydroxy-6-methoxy-isoflavone) by human gut microflora. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 8519-8525.
- (13) Arora, A.; Nair, M. G.; Strasburg, G. M. Antioxidant activities of isoflavones and their biological metabolites in a liposomal system. *Arch. Biochem. Biophys.* **1998**, *356*, 133-141.
- (14) Cheng, H.; Yu, O.; Yu, D. Polymorphisms of *IFS1* and *IFS2* gene are associated with isoflavone concentrations in soybean seeds. *Plant Sci.* **2008**, *175*, p. 505512.

- (15) Lee, S. J.; Yan, W.; Ahn, J. K.; Chung, I. M. Effects of year, site, genotype and their interactions on various soybean isoflavones. *Field Crop. Res.* **2003**, *81*, 181-192.
- (16) Wegulo, S. N.; Yang, X.-B.; Martinson, C. A.; Murphy, P. A. Effects of wounding and inoculation with *Sclerotinia sclerotiorum* isoflavone concentrations in soybean. *Can. J. Plant Sci.* **2005**, *85*, 749-760.
- (17) Cardona, F.; Andres-Lacueva, C.; Tulipanina, S.; Tinahones, F. J.; Queipo-Ortuno, M. I. Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *J. Nutr. Biochem.* **2013**, *24*, 1415-1422.
- (18) Cederroth, C. R.; Nef, S. Soy, phytoestrogens and metabolism: a review. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2009**, *304*, 30-42.
- (19) Yeom, S.-J.; Kim, B.-N.; Kim, Y.-S.; Oh, D.-K. Hydrolysis of isoflavone glycosides by a thermostable β -glucosidase from *Pyrococcus furiosus*. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 1535-1541.
- (20) Song, X.; Xue, Y.; Wang, Q.; Wu, X. Comparison of three thermostable (3-glucosidases for application in the hydrolysis of soybean isoflavone glycosides. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 1954-1961.
- (21) Pan, Z.; Tangratnavalee, W. Characteristics of soybeans as affected by soaking conditions. *LWT- Food Sci. Technol.* **2003**, *36*, 143-151.
- (22) Matsuura, M.; Obata, A.; Fukushima, D. Objectionable flavor of soy milk developed during the soaking of soybeans and its control. *J. Food Sci.* **1989**, *54*, 602-605.
- (23) Góes-Favoni, S. P.; Carrão-Panizzi, M. C.; Beléia, A.. Changes of isoflavone in soybean cotyledons soaked in different volumes of water. *Food Chem.* **2010**, *119*, 1605-1612.
- (24) Toda, T.; Sakamoto, A.; Takayanagi, T.; Yokotsuka, K. Changes in isoflavone compositions of soybean during soaking in water. *Food Sci. Technol. Res.* **2001**, *7*, 171-175.
- (25) Sutil, G. A.; Mandarino, J. M.; Laurindo, J. B.; Benassi, V.; Góes-Favoni, S.; Petrus, J. C. C. Effect of hydrothermal treatment and pH on the formation of aglycones in soybean. *Eur. Food Res. Technol.* **2008**, *227*, 1729-1731.
- (26) Carrão-Panizzi, M. C.; Bordignon, J. R. Activity of beta-glucosidase and levels of isoflavone glucosides in soybean cultivars affected by the environment. *Pesqui. Agropecu. Bras.* **2000**, *35*, 873-878.
- (27) Matsuura, M.; Obata, A. β -glucosidases from soybeans hydrolyse daidzin and genistin. *J. Food Sci.* **1993**, *58*, 144-147.
- (28) Yoshiara, L. Y.; Madeira, T. B.; Ribeiro, M. L. L.; Mandarino, J. M. G.; Carrão-Panizzi, M. C.; Ida, E. I. β -glucosidase activity of soybean (*Glycine max*)

embryonic axis germinated in the presence or absence of light. *J. Food Biochem.* **2012**, 36, 699-705.

- (29) Britz, S. J.; Schomburg, C. J.; Kenworthy, W. J. Isoflavones in seeds of field-grown soybean: variation among genetic lines and environmental effects. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2011**, 88, 827-832,.
- (30) 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. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, 43, 1184-1192.
- (31) Yoo, D. C.; Hara, T.; Fujita, N.; Waki, T.; Noguchi, A.; Takahashi, S.; Nakayama, T. Transcription analyses of *GmICHG*, a gene coding for a β -glucosidase that catalyzes the specific hydrolysis of isoflavone conjugates in *Glycine max* (L.) Merr. *Plant Sci.* **2013**, 208, 10-19.
- (32) Kim, J. J.; Kim, S. H.; Hahn, S. J.; Chung, I. M. Changing soybean isoflavone composition and concentrations under two different storage conditions over three years. *Food Res. Int.* **2005**, 38, 435-444.
- (33) Kudou, S.; Fleury, Y.; Welti, D.; Magnolato, D.; Uchida, T.; Kitamura, K.; Okubo, K. Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds (*Glycine max* Merrill). *Agric. Biol. Chem.* **1991**, 55, 2227-2233.
- (34) Balisteiro, D. M.; Rombaldi, C. V.; Genovese, M. I. Protein, isoflavones, trypsin inhibitory and in vitro antioxidant capacities: comparison among conventionally and organically grown soybeans. *Food Res. Int.* **2013**, 51, 8-14.
- (35) Wang, H.-J.; Murphy, P. A. Mass balance study of isoflavones during soybean processing. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, 44, 2377-2383.
- (36) 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 Chem.* **2005**, 91, 425-434.
- (37) Ismail, B.; Hayes, K. D. β -Glucosidase activity toward different glycosidic forms of isoflavones. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 4918-4924.
- (38) Yeom, S.-J.; Kim, B.-N.; Kim, Y.-S.; Oh, D.-K. Hydrolysis of isoflavone glycosides by a thermostable β -glucosidase from *Pyrococcus furiosus*. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, 60, 1535-1541.
- (39) Santos, R. F.; Oliveira, C. F.; Varea, G. S.; Silva, M. L. C. O.; Ida, E. I.; Mandarino, J. M. G.; Carrao-Panizzi, M. C.; Ribeiro, M. L. Purification and characterization of soy cotyledon β -glucosidase. *J. Food Biochem.* **2013**, 37, 302-312.
- (40) Wardhani, D. H.; Vazquez, J. A.; Pandiella, S. S. Kinetics of daidzin and genistin transformations and water absorption during soybean soaking at different temperatures. *Food Chem.* **2008**, 111, 13-19.

- (41) Malaypally, S. P.; Ismail, B. Effect of protein content and denaturation on the extractability and stability of isoflavones in different soy systems. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 8958-8965.
- (42) Esen, A. β -glucosidase. In *Handbook of Food Enzymology*; Whitaker, J. R., Voragen, A. G. J., Wong, D. W. S., Eds.; Marcel Dekker Inc.: New York, N.Y., 2003, pp. 774-786.
- (43) Jackson, C.-J. C.; Dini, J. P.; Lavandier, C.; Rupasinghe, H. P. V.; Faulkner, H.; Poysa, V.; Buzzell, D.; DeGrandis, S. Effects of processing on the content and composition of isoflavones during manufacturing of soy beverage and tofu. *Process Biochem.* **2002**, *37*, 1117-1123.
- (44) Speroni, F.; Milesi, V.; Ahön, M. C. Interactions between isoflavones and soybean proteins: applications in soybean-protein-isolate production. *LWT-Food Sci. Technol.* **2010**, *43*, 1265-1270.
- (45) Mathias, K.; Ismail, B.; Corvalan, C. M.; Hayes, K. D. Heat and pH effects on the conjugated forms of genistin and daidzin isoflavones. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 7495-7502.
- (46) Grün, I. U.; Adhikari, K.; Li, C.; Li, Y.; Lin, B.; Zhang, J.; Lakdas, Fernando, L. N. Changes in the profile of genistein, daidzein, and their conjugates during thermal processing of tofu. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 2839-2843.

Figure Captions

Figure 1 – Chemical structure of isoflavones classified into different groups.

Figure 2 – Response surfaces and profiles for the predicted values and desirability plots as a function of time and temperature of soybean hydrothermal treatment. GLU_{SS} (total β -glucosides in the soaked soybean), AGL_{SS} (total aglycones in the soaked soybean), βGLU_{SS} β -glucosidase activity in the soaked soybean). Results of isoflavones were expressed as the sum of the molar concentration of individual isoflavones in their respective groups.

Figure 3 – Response surfaces and profiles for the predicted values and desirability plots as a function of time and temperature of soybean hydrothermal treatment. $M.GLU_{SS}$ (total malonylglucosides in the soaked soybean), AGL_{RS} (total aglycones in the residual solution), $TISO_{SS+RS}$ (mg of total isoflavones in hydrothermally treated soybeans and the residual solution) after normalization of the differences of the glucosylated forms molecular weights into their corresponding aglycone.

Table 1 – Central composite design (CCD) with the coded and real levels of the independent variables and the response function to hydrothermal treatment.

Assays	Independent variables and coded levels ^a		Response functions ^b					
	$x_1 (X_1)$	$x_2 (X_2)$	GLU_{SS} ($\mu\text{mol } \beta\text{-glucosides } g^{-1}$)	$M.GLU_{SS}$ ($\mu\text{mol malonylglucosides } g^{-1}$)	AGL_{SS} ($\mu\text{mol aglycones } g^{-1}$)	βGLU_{SS} ($AU g^{-1}$)	AGL_{RS} ($\mu\text{mol aglycones}/100 \text{ mL}$)	$TISO_{SS+RS}$ ($\text{mg total isoflavones}$)
01	-1 (04)	-1 (45)	0.52	8.24	0.41	0.118	0.13	221.21
02	-1 (04)	1 (65)	0.77	5.95	0.59	0.000	1.06	188.08
03	1 (08)	-1 (45)	0.46	8.49	0.47	0.105	0.75	221.88
04	1 (08)	1 (65)	1.03	4.60	0.61	0.000	1.25	164.92
05	-1.41 (3.17)	0 (55)	0.07	6.62	0.93	0.024	1.22	192.01
06	+1.41 (8.83)	0 (55)	0.23	5.95	1.25	0.002	2.98	189.53
07	0 (06)	-1.41 (40.86)	0.58	9.10	0.23	0.127	0.19	237.93
08	0 (06)	+1.41 (69.14)	1.12	4.93	0.44	0.000	0.97	174.68
09	0 (06)	0 (55)	0.10	6.32	1.08	0.011	2.01	190.88
10	0 (06)	0 (55)	0.12	6.94	1.29	0.009	2.00	213.58
11	0 (06)	0 (55)	0.12	6.87	1.30	0.009	2.25	204.35

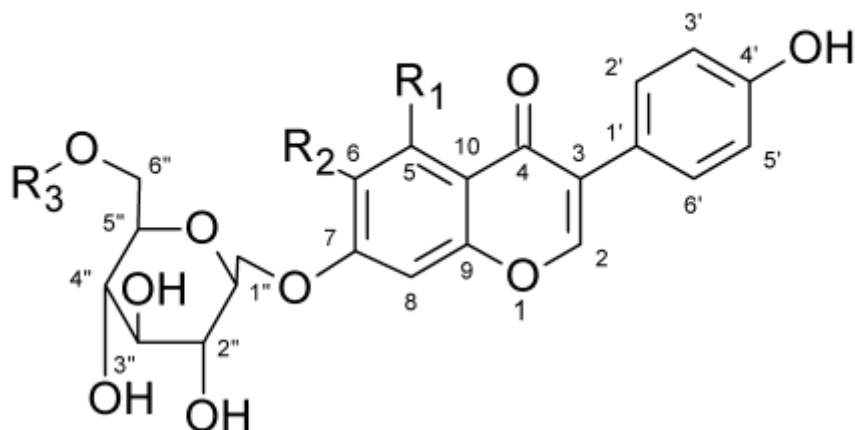
a x_1 and x_2 are the coded levels of the X_1 (soaking time, h) and X_2 (soaking temperature, °C) independent variables. b Average of triplicate of chromatographic analysis.

Table 2 – ANOVA of the models obtained by the response surface methodology applied to the experimental data.

Source	Sum of squares	DF	Mean Square	F-value	p- value
GLU_{SS} ($\mu\text{mol } \beta\text{-glucosides g}^{-1}$)					
X_1	0.023	1	0.023	1.50	0.275
X_1^2	0.024	1	0.024	1.52	0.272
X_2	0.319	1	0.319	20.56	0.006*
X_2^2	0.974	1	0.974	62.69	<0.001*
X_1X_2	0.026	1	0.026	1.68	0.252
Error	0.078	5	0.016		
Total	1.441	10			
$R^2 = 0.90$					
M.GLU_{SS} ($\mu\text{mol malonylglucosides g}^{-1}$)					
X_1	0.525	1	0.525	8.89	0.031*
X_1^2	0.161	1	0.161	2.73	0.159
X_2	18.215	1	18.215	308.26	<0.001*
X_2^2	0.216	1	0.216	3.66	0.114
X_1X_2	0.644	1	0.644	10.90	0.021*
Error	0.295	5	0.059		
Total	20.214	10			
$R^2 = 0.90$					
AGL_{SS} ($\mu\text{mol aglycones g}^{-1}$)					
X_1	0.035	1	0.035	1.46	0.280
X_1^2	0.074	1	0.074	3.08	0.140
X_2	0.051	1	0.051	2.09	0.207
X_2^2	1.371	1	1.371	56.86	<0.001*
X_1X_2	0.0005	1	0.0005	0.02	0.896
Error	0.121	5	0.024		
Total	1.584	10			
$R^2 = 0.92$					
βGLU_{SS} (AU g^{-1})					
X_1	0.000252	1	0.000252	1.39	0.291
X_1^2	0.000206	1	0.000206	1.14	0.334
X_2	0.020336	1	0.020336	112.36	<0.001*
X_2^2	0.005602	1	0.005602	30.95	0.003*
X_1X_2	0.000043	1	0.000043	0.24	0.646
Error	0.000905	5	0.000181		
Total	0.027202	10			
$R^2 = 0.95$					
AGL_{RS} ($\mu\text{mol aglycones}/100 \text{ mL}$)					
X_1	1.365	1	1.365	6.87	0.047*
X_1^2	0.092	1	0.092	0.46	0.526
X_2	0.797	1	0.797	4.01	0.102
X_2^2	4.448	1	4.448	22.39	0.005*
X_1X_2	0.046	1	0.046	0.23	0.649
Error	0.993	5	0.199		
Total	7.760	10			
$R^2 = 0.87$					
TISO_{SS+RS} (mg of total isoflavones of the system)					
X_1	84.478	1	84.478	1.38	0.293
X_1^2	200.738	1	200.738	3.28	0.130
X_2	4029.904	1	4029.904	65.76	<0.001*
X_2^2	18.396	1	18.396	0.30	0.607
X_1X_2	141.957	1	141.957	2.32	0.189
Error	306.428	5	61.286		
Total	4841.782	10			
$R^2 = 0.83$					

* Significant parameters ($p < 0.05$).Coefficient of determination (R^2) of the final models.

Figure 1



Group	Isoflavone	R ₁	R ₂	R ₃
Aglycones	Daidzein	-H	-H	-
	Genistein	-OH	-H	-
	Glycitein	-H	-OCH ₃	-
β -glucosides	Daidzin	-H	-H	-H
	Genistin	-OH	-H	-H
	Glycitin	-H	-OCH ₃	-H
Acetylglucosides	6''-O-acetyldaidzin	-H	-H	-COCH ₃
	6''-O-acetylgenistin	-OH	-H	-COCH ₃
	6''-O-acetylglycitin	-H	-OCH ₃	-COCH ₃
Malonylglucosides	6''-O-malonyldaidzin	-H	-H	-COCH ₂ COOH
	6''-O-malonylgenistin	-OH	-H	-COCH ₂ COOH
	6''-O-malonylglycitin	-H	-OCH ₃	-COCH ₂ COOH

Figure 2

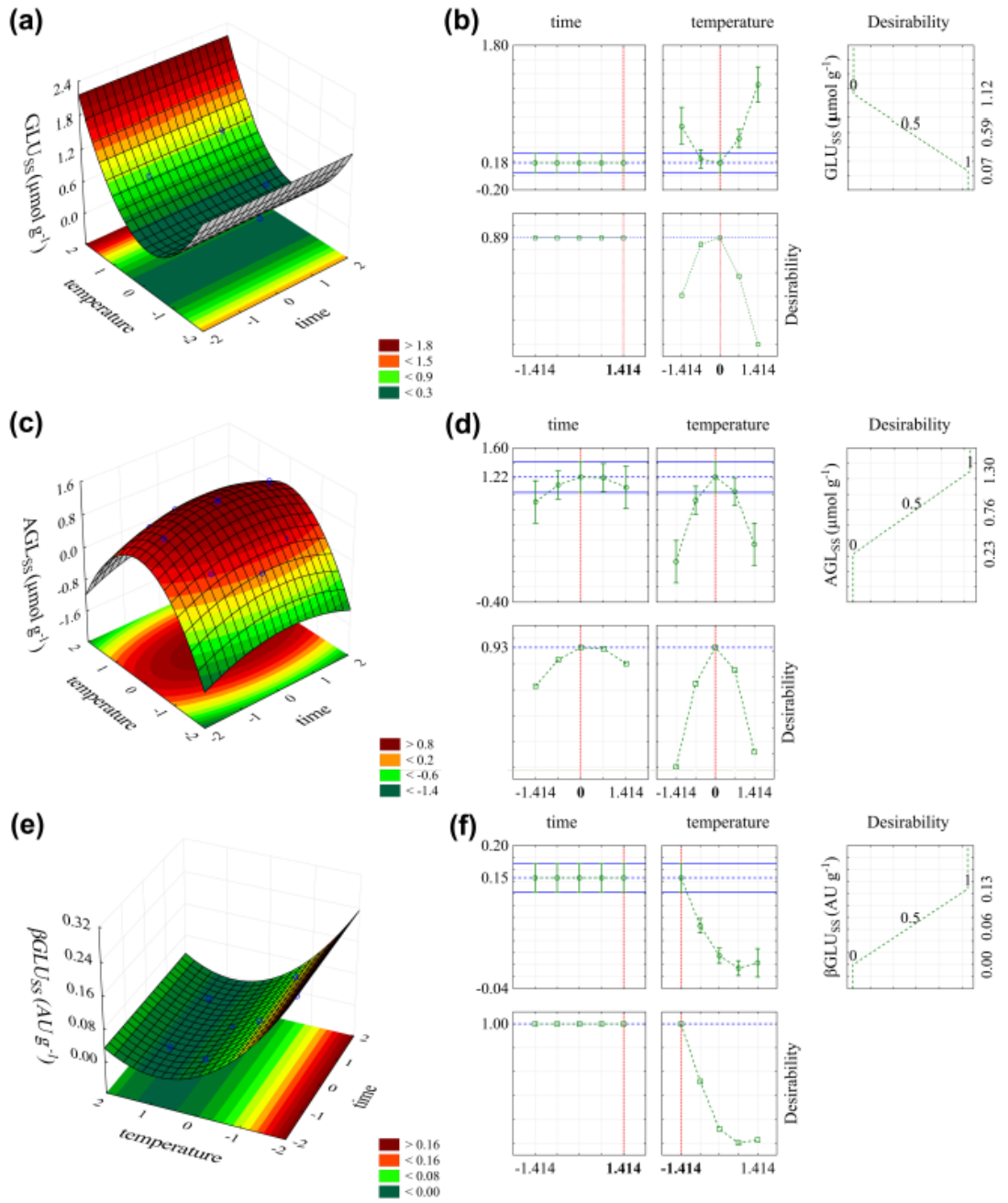


Figure 3

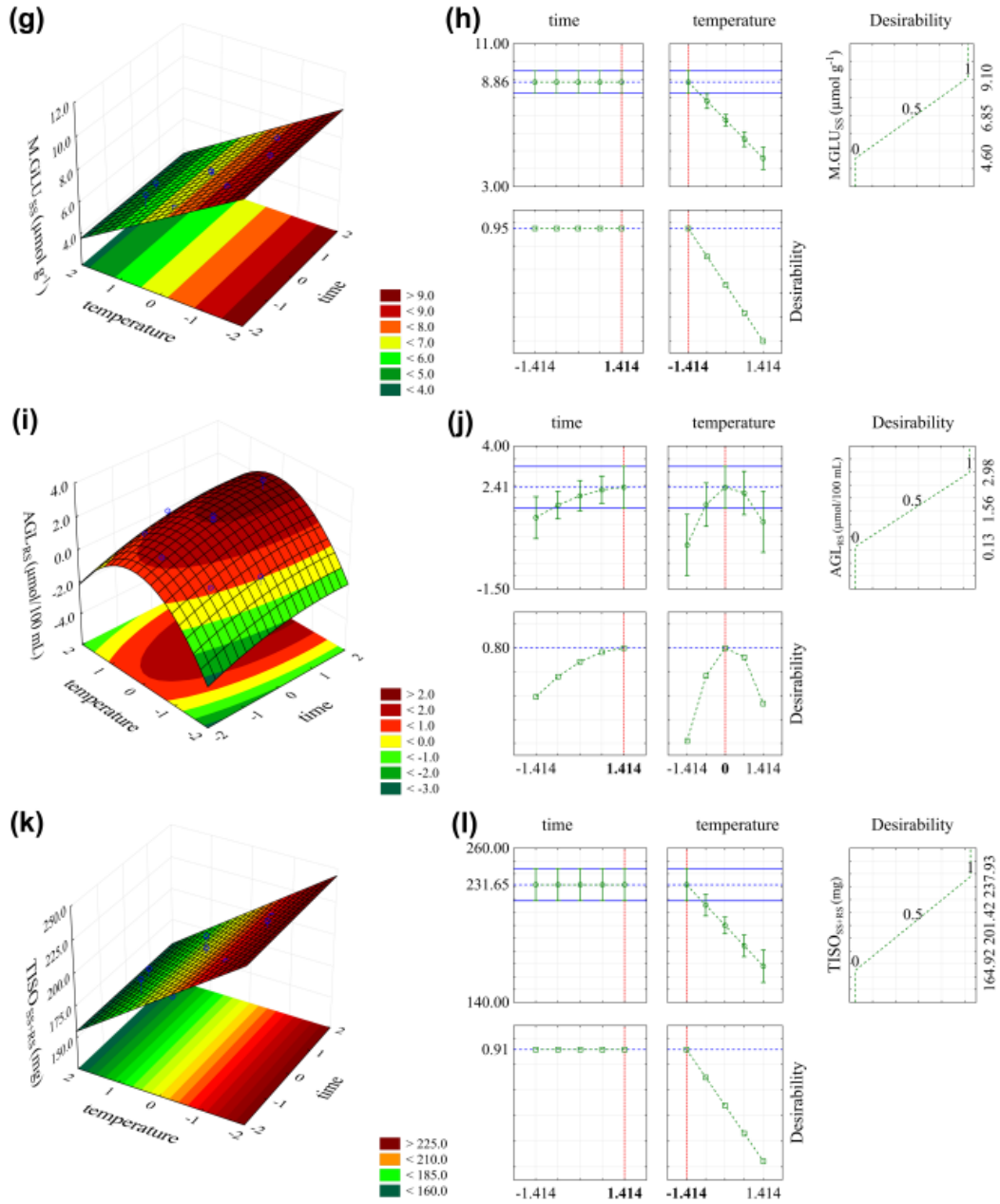
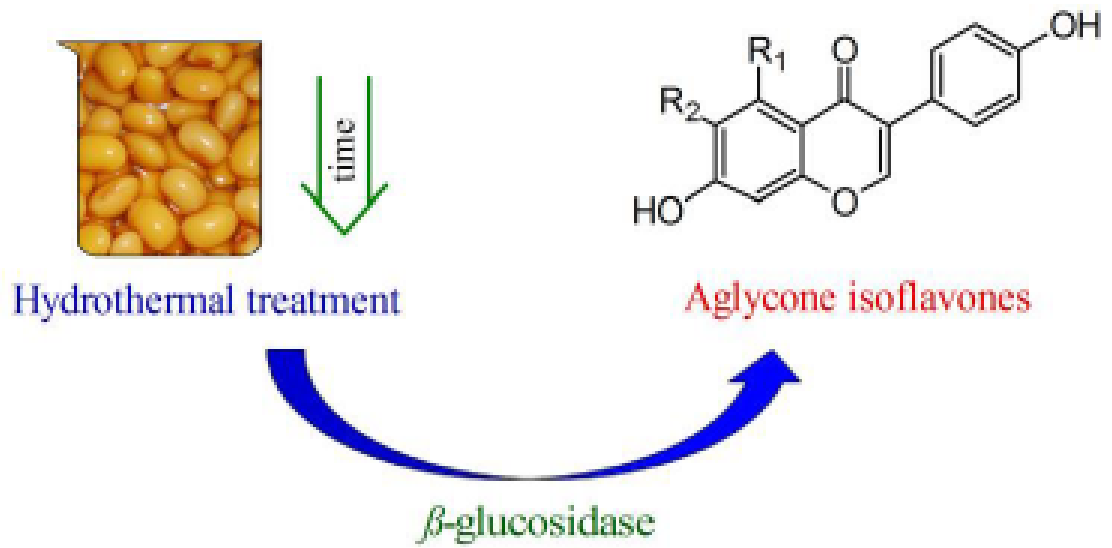


Table of contents (TOC) graphics



6 CONCLUSÃO

O tratamento hidrotérmico dos grãos de soja favoreceu a atividade da β -glicosidase para conversão de isoflavonas glicosiladas em agliconas, sendo que a hidratação dos grãos em pH ótimo para a enzima contribuiu para os resultados encontrados neste estudo. Assim, foi possível otimizar o conteúdo de agliconas nos grãos hidratados em um tempo reduzido de hidratação, alcançado em 6 h a 55 °C, mostrando uma interessante proposta para a indústria de alimentos. Nesta condição, foram estimados um teor mínimo de β -glicosídeos e uma baixa atividade de β -glicosidase nos grãos de soja tratados hidrotermicamente. A redução no conteúdo de isoflavonas nos sistemas com o aumento da temperatura de tratamento foi atribuída à instabilidade térmica dos malonilglicosídeos.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O tratamento hidrotérmico dos grãos de soja é um processo muito importante para estimular a β -glicosidase endógena e converter as isoflavonas glicosiladas, em particular os β -glicosídeos, em agliconas. Este estudo poderá contribuir para a elaboração de produtos de soja com maior conteúdo de agliconas a partir de grãos de soja tratados hidrotérmicamente. Em continuidade a este estudo tem-se a perspectiva de investigar os seguintes aspectos: a cinética de hidratação da soja e em paralelo avaliar a conversão de isoflavonas glicosiladas em agliconas, otimizar as condições de cozimento dos grãos de soja hidratados em relação ao conteúdo de agliconas presente no grão cozido e produzir o extrato de soja com maior teor destes compostos bioativos a partir da melhor condição de tratamento hidrotérmico e cozimento dos grãos de soja.