



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MARIAH BENINE RAMOS SILVA

**EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM E
HEMICELULASE AUMENTA ATIVIDADE DE β -
GLICOSIDASES, CONTEÚDO DE ISOFLAVONAS E
AMINAS BIOATIVAS DE EXTRATOS AQUOSOS DE SOJA
E AVALIAÇÃO DAS AMINAS EM PRODUTOS PRONTOS
PARA CONSUMO**

MARIAH BENINE RAMOS SILVA

**EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM E
HEMICELULASE AUMENTA ATIVIDADE DE β -
GLICOSIDASES, CONTEÚDO DE ISOFLAVONAS E AMINAS
BIOATIVAS DE EXTRATOS AQUOSOS DE SOJA E
AVALIAÇÃO DAS AMINAS EM PRODUTOS PRONTOS PARA
CONSUMO**

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

Orientadora: Prof.^a Dra. Elza Iouko Ida
Coorientadora: Prof.^a Dra. Sandra Helena Prudencio

Londrina
2019

MARIAH BENINE RAMOS SILVA

**EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM E HEMICELULASE
AUMENTA ATIVIDADE DE β -GLICOSIDASES, CONTEÚDO DE
ISOFLAVONAS E AMINAS BIOATIVAS DE EXTRATOS AQUOSOS
DE SOJA E AVALIAÇÃO DAS AMINAS EM PRODUTOS PRONTOS
PARA CONSUMO**

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

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dra. Elza Iouko Ida
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof.^a Dra. Neusa Fátima Seibel
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof.^a Dra. Rubia Casagrande
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof.^a Dra. Sandra Regina Georgetti
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof.^a Dra. Mara Lúcia Luiz Ribeiro
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 27 de agosto de 2019.

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

S586e Silva, Maria Benine Ramos.

Extração assistida por ultrassom e hemicelulase aumenta atividade de beta-glicosidases, conteúdo de isoflavonas e aminos bioativas de extratos aquosos de soja e avaliação das aminos em produtos prontos para consumo. / Maria Benine Ramos Silva. - Londrina, 2019.
141 f. : il.

Orientador: Elza louko Ida.

Coorientador: Sandra Helena Prudencio.

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

Inclui bibliografia.

1. 1. Soja - Extrato de Soja - Teses - Tese. 2. 2. Isoflavonas - Agliconas - Teses - Tese. 3. 3. Aminos Bioativas - Soja - Teses - Tese. 4. 4. Capacidade Antioxidante - Teses - Tese. I. Ida, Elza louko. II. Prudencio, Sandra Helena. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. IV. Título.

CDU 641.1

Dedico

À Deus, pela graça de me capacitar no desenvolvimento deste trabalho, por caminhar sempre comigo, nunca me deixando desistir, e por colocar pessoas excepcionais no meu caminho.

Aos meus pais, Ivo Ramos da Silva e Mariângela Benine Ramos Silva, minha referência de amor e dedicação e meu irmão Otávio Benine Ramos Silva pelo amor, carinho e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Lembrar-se de todas as pessoas que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho é uma tarefa difícil. Às pessoas que, com pequenas ações ou palavras, porém essenciais, me incentivaram a viver e a lutar por este trabalho, muito obrigada. Outras pessoas estiveram sempre ao meu lado, incentivando e acreditando no meu potencial para que eu conseguisse chegar até aqui, e para elas, os meus agradecimentos estão aqui:

À minha orientadora Prof.^a Dra. Elza Iouko Ida, pela oportunidade de ter sido sua aluna, pela dedicação e comprometimento, pela paciência, apoio e amizade e pelos conhecimentos transmitidos, decisivos e condutores neste trabalho e na minha formação profissional.

À Prof.^a Dra. Sandra Helena Prudencio, pela coorientação, colaboração e contribuições neste trabalho.

Ao Dr. Adriano Costa de Camargo e Prof.^a Dra. Louise Emy Kurozawa pela colaboração, contribuições e ponderações no desenvolvimento deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Fundação CAPES/MEC) pela concessão da bolsa de estudos de Doutorado e Doutorado Sanduíche por meio do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior - PDSE.

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

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos pelos conhecimentos, formação profissional e experiências compartilhadas, e a equipe de Técnicos Administrativos do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos pela atenção e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Prof.^a Dra. Maria del Carmem Vidal-Carou e Prof.^a Dra. Maria Teresa Veciana-Nogués pela supervisão, confiança e acolhida na Universitat de Barcelona (UB) durante o Doutorado Sanduíche no período de setembro de 2018 a fevereiro de 2019. Agradeço também ao Departamento de Nutrição, Ciência de Alimentos e Gastronomia da UB pela oportunidade de executar a parte experimental do Doutorado Sanduíche e aos integrantes do grupo de pesquisa, Prof.^a Dra. Maria Luz Latorre-Moratalla, Oriol Comas-Basté, Sònia Sánches-Pérez, Nelly Caroline Muñoz-Esparza e Salvador Hernandez-Macías pela ajuda na execução do trabalho.

Aos Pós-Doutores Daniele Rodrigues, Denise da Fontoura Prates e Rafael Humberto de Carvalho, Doutores Cíntia Ladeira Handa, Fernando Sanches de Lima e Heloisa Gabriel Falcão, e Mestres Bruna Caroline Gerônimo, Fábio Goscisnki e Marcela Fernanda Geton Guelfi, integrantes do grupo de pesquisa da Prof.^a Dra. Elza Iouko Ida, pela ajuda, trabalho em equipe, convivência e companheirismo.

Aos amigos que estiveram comigo durante esta caminhada, e em especial à Ariana Justus, Bruna Yumi Yoshida, Heloisa Gabriel Falcão, Jéssica Lima de Menezes, Rodolfo Campos Zanin e Camila Costa Campos pela amizade, carinho, ajuda, convivência e perseverança.

À estagiária de iniciação científica Aryella Carlyne Hoffmann pelo comprometimento e apoio no desenvolvimento das atividades de laboratório.

À Dra. Vera de Toledo Benassi e Rodrigo Santos Leite, em especial, e da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária/Embrapa Soja pela oportunidade em realizar uma parte analítica do trabalho.

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

Ninguém cruza nosso caminho por acaso e nós não entramos na vida de alguém sem nenhuma razão (Chico Xavier).

SILVA, Mariah Benine Ramos. **Extração assistida por ultrassom e hemicelulase aumenta atividade de β -glicosidases, conteúdo de isoflavonas e aminas bioativas de extratos aquosos de soja e avaliação das aminas em produtos prontos para consumo**. 2019. 141f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi investigar a extração assistida por hemicelulase (EAH) e ultrassom (EAU) sobre a atividade de β -glicosidases, conteúdo de isoflavonas e aminas bioativas, assim como, o potencial antioxidante de extratos de soja. Em adição, foi avaliado o perfil e conteúdo das aminas em produtos prontos para consumo disponíveis no mercado de Barcelona. O delineamento inteiramente casualizado foi utilizado para avaliar a EAH e EAU de β -glicosidases, isoflavonas e a capacidade antioxidante (ABTS e ORAC) de extratos de soja. O delineamento inteiramente casualizado foi utilizado para avaliar a EAH e EAU de aminas bioativas de extratos de soja e o delineamento composto central rotacional (DCCR) foi aplicado para investigar os efeitos da % hemicelulase, intensidade de ultrassom e o tempo de tratamento sobre a extração das aminas bioativas de extratos de soja. O perfil e conteúdo de aminas bioativas foram avaliados em cinco produtos prontos para consumo disponíveis no mercado de Barcelona, sendo eles, nigiri e gyoza de langostino, hosomaki de salmão, sashimi de salmão e de atum. Além disso, foi investigado o conteúdo de aminas em sashimi de atum armazenado a 5 °C e 20 °C por 1 e 2 dias. O conteúdo de isoflavonas e aminas bioativas foram determinados por cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC). A EAH e EAU influenciou na atividade de β -glicosidases, no perfil de isoflavonas e no potencial antioxidante de extratos de soja. A maior atividade de β -glicosidases e conteúdo de isoflavonas agliconas foram observadas nos extratos assistidos por ultrassom, seguido de hemicelulase e controle. Os extratos assistidos por ultrassom e hemicelulase não apresentaram diferenças no potencial antioxidante, contudo, apresentaram maior atividade sequestradora de radical do que o extrato controle. A soja BRS257 e os extratos assistidos por hemicelulase e ultrassom apresentaram o mesmo perfil, porém diferentes conteúdos de putrescina (PU), cadaverina (CA), agmatina (AGM), espermidina (EPD) e espermina (EPM), com predominância de EPD. O conteúdo de aminas bioativas do extrato assistido por ultrassom foi maior do que o assistido por hemicelulase e controle. A % hemicelulase, intensidade de ultrassom e tempo de tratamento apresentaram diferentes efeitos lineares, quadráticos e de interações sobre as funções respostas PU, CA, AGM e EPD, enquanto que nenhum efeito significativo foi apresentado para a função resposta EPM. A aplicação do DCCR mostrou-se adequada para obter modelos preditivos, cujas funções respostas máximas de PU, CA, AGM e EPD dos extratos de soja foram quando se utilizou hemicelulase a 2,34%, intensidade de ultrassom de 50 W cm⁻² e tempo de tratamento de 6,36 min. Diferentes perfis e conteúdo de tiramina (TI), PU, CA, histamina (HI), β -feniletilamina (PHE), EPD e EPM foram detectados e quantificados nos produtos. Não foram observadas alterações no conteúdo de TI, PU, HI, EPD e EPM em sashimis de atum adquiridos em supermercado e restaurantes especializados quando armazenados a 5 °C por 1 e 2 dias. Entretanto, o conteúdo de TI, PU, CA e HI aumentou quando armazenados a 20 °C. Assim sendo, para evitar a formação de aminas biogênicas destes produtos recomenda-se controlar adequadamente a temperatura de armazenamento.

Palavras-chave: *Glycine max*. Agliconas. Enzimas. Sonicação. Compostos bioativos. Potencial antioxidante.

SILVA, Mariah Benine Ramos. **Ultrasound- and hemicellulase-assisted extraction increase β -glucosidase activity, the content of isoflavones and bioactive amines of soymilk and evaluation of amines in ready-to-eat products.** 2019. 141f. Thesis (Doctoral Degree in Food Science) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

The objective of this work was to investigate hemicellulase- (HAE) and ultrasound-assisted extraction (UAE) on the β -glucosidases activity, isoflavone and bioactive amines content, as well as the antioxidant potential of soymilk. In addition, the profile and content of amines in ready-to-eat products available in the Barcelona market were evaluated. A completely randomized design was used to evaluate HAE and UAE of β -glucosidases, isoflavones and antioxidant capacity (ABTS and ORAC) of soymilk. A completely randomized design was used to evaluate HAE and UAE of bioactive amines of soymilk and central composite rotatable design (CCRD) was applied in order to investigate the effects of %hemicellulase, ultrasound intensity and treatment time on the extraction of bioactive amines of soymilk. The profile and content of bioactive amines were evaluated in five ready-to-eat products available in the Barcelona market, namely, nigiri and langostino gyoza, salmon hosomaki, salmon and tuna sashimi. Moreover, the amine content of tuna sashimi stored at 5 °C and 20 °C for 1 and 2 days was investigated. Isoflavones and bioactive amines contents were determined by ultra-performance liquid chromatography (UPLC). HAE and UAE influenced β -glucosidase activity, isoflavone profile, and antioxidant potential of soymilk. The highest activity of β -glucosidases and isoflavone aglycone content were observed in the soymilk assisted by ultrasound, followed by hemicellulase and control. No differences were found between the antioxidant potential of ultrasound and hemicellulase-assisted extraction, both of which showed higher effects than the control. BRS257 soybean and hemicellulase and ultrasound-assisted soymilk showed the same profile, but different contents of putrescine (PU), cadaverine (CA), agmatine (AGM), spermidine (SPD) and spermine (SPM), with the predominance of SPD. The bioactive amine content of this soymilk was greater than the control. The %hemicellulase, ultrasound intensity and treatment time to obtain soymilk showed different linear, quadratic and interaction effects on the PU, CA, AGM and SPD response functions, whereas no significant effect was showed for the SPM response function. Therefore, the CCRD was shown to be an adequate approach to obtain predictive models; moreover, maximum PU, CA, AGM, and SPD response functions in soymilk were obtained when 2.34% hemicellulase, 50 W cm⁻² ultrasound intensity, and 6.36 min of treatment time were used in the treatment. Different profile and contents of tyramine (TY), PU, CA, histamine (HI), β -phenylethylamine (PHE), SPD and SPM were detected and quantified in the ready-to-eat products. No changes were observed in TY, PU, HI, SPD and SPM content in tuna sashimis purchased in supermarket and specialized restaurants when stored at 5 °C for 1 and 2 days. However, TY, PU, CA and HI content increased when stored at 20 °C. Therefore, in order to avoid the formation of biogenic amines in these products it is recommended to control the storage temperature.

Keywords: *Glycine max.* Aglycones. Enzymes. Sonication. Bioactive compounds. Antioxidant potential.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Componentes da estrutura do grão de soja.....	18
Figura 2 - Classificação dos compostos fenólicos.....	21
Figura 3 - Estrutura geral de flavonoides.....	22
Figura 4 - Estrutura química das diferentes formas de isoflavonas, seus radicais e possíveis transformações por clivagem de ligações.....	24
Figura 5 - Estrutura química de algumas aminas bioativas.....	26
Figura 6 - Classificação de aminas bioativas.....	27
Figura 7 - Formação de aminas por meio da descarboxilação de aminoácidos.....	28
Figura 8 - Síntese de poliaminas.....	29
Figura 9 - Etapas do processamento de obtenção do extrato de soja segundo os métodos Japonês e Chinês.....	36
Figura 10 - Fenômeno de cavitação formado pela variação de pressão no interior de um líquido.....	44

ARTIGO CIENTÍFICO 1

Figure 1. Effect of hemicellulase-assisted extraction (HAE) and ultrasound-assisted extraction (UAE) on the activity of endogenous β -glucosidase. Means with different letters show difference among treatments ($p < 0.05$).....	87
Figure 2. The contribution of different forms of isoflavones in soymilk as affected by hemicellulase-assisted extraction (HAE) and ultrasound-assisted extraction (UAE).....	88
Figure 3. Concentration changes of different forms of isoflavones in soymilk as affected by hemicellulase-assisted extraction (A) and ultrasound-assisted extraction (B). #1, 2, 3, and 4 (blank bars) are total conjugated isoflavones, conjugated daidzein, conjugated glycitein, and conjugated genistein, respectively. The same numbers (black bars) are total aglycone isoflavones, daidzein, glycitein, and genistein, respectively.....	89
Figure 4. Antiradical activity of soymilk produced under hemicellulase-assisted extraction (HAE) and ultrasound-assisted extraction (UAE). Data represent the mean \pm standard deviation of each sample ($n = 3$). Means with different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) among treatments, considering each assay.....	90

ARTIGO CIENTÍFICO 2

Figure 1 Response surface plots as a function of % hemicellulase (X_1) and treatment time (X_3):

(a) PU, (b) CA, (c) AGM, (d) SPD.....117

Figure 2 Estimated desirability parameters for maximizing the response function values of PU, CA, AGM, and SPD.....118

Figure 3 Content of bioactive amines in soymilk obtained by conventional method (control), hemicellulase-assisted extraction (HAE), ultrasound-assisted extraction (UAE), and estimated by the models (CCRD). Data represent mean values \pm standard deviation ($n = 2$). Values are expressed as mg amine kg^{-1} sample, on a dry basis. Different letters indicate significant differences (p < 0.05) among treatments.....119

ARTIGO CIENTÍFICO 3

Figure 1. Biogenic amines and polyamines contents in control samples (time 0) of tuna sashimi from supermarket and restaurant.....137

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Componentes do grão de soja e sua composição química.....	18
Tabela 2 - Efeitos tóxicos das amins bioativas.....	31

ARTIGO CIENTÍFICO 1

Table 1. Isoflavone profile ($\mu\text{mol g}^{-1}$ dw) of soymilk obtained by conventional method (control), hemicellulase-assisted extraction (HAE), and ultrasound-assisted extraction (UAE).....	85
Table 2. Aglycone to conjugated isoflavone ratio as an index of antioxidant potential.....	86

ARTIGO CIENTÍFICO 2

Table 1 Central composite rotatable design with coded (x) and uncoded (X) independent variables used in soymilk treatment and corresponding response functions.....	114
Table 2 Bioactive amine profiles of soybean and soymilk obtained by conventional method (control), HAE and UAE.....	115
Table 3 Regression coefficients and analysis of variance of mathematical models.....	116

ARTIGO CIENTÍFICO 3

Table 1. Biogenic amines and polyamines contents in ready-to-eat Japanese meals from the Barcelona market.....	134
Table 2. Biogenic amines and polyamines contents in tuna sashimi stored at 5°C.....	135
Table 3. Biogenic amines and polyamines contents in tuna sashimi stored at 20°C.....	136

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVO GERAL.....	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1 ORIGEM, ASPECTOS ECONÔMICOS E PRODUÇÃO DE SOJA	16
3.2 ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA SOJA	17
3.2.1 Compostos Fenólicos e Isoflavonas	20
3.2.2 Aminas Bioativas	25
3.2.2.1 Aspectos toxicológicos e utilização como critério de qualidade	30
3.2.2.2 Ocorrência em alimentos	33
3.3 EXTRATO DE SOJA.....	34
3.4 APLICAÇÃO DE ENZIMAS PARA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS.....	39
3.5 APLICAÇÃO DE ULTRASSOM PARA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS.....	43
REFERÊNCIAS	48
4 MATERIAL E MÉTODOS	62
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
5.1 ARTIGO CIENTÍFICO 1.....	65
5.2 ARTIGO CIENTÍFICO 2.....	91
5.3 ARTIGO CIENTÍFICO 3.....	120
6 CONCLUSÕES	138
ANEXOS	139
ANEXO A - Autorização da editora International Society for Nutraceuticals and Functional Foods (ISNFF) para incluir na tese a versão impressa do artigo intitulado “Ultrasound- and hemicellulase-assisted extraction increase β -glucosidase activity, the content of isoflavone aglycones and antioxidant potential of soymilk”.....	140
ANEXO B - Comprovante de submissão do artigo intitulado “Effect of ultrasound- and hemicellulase-assisted extraction on the bioactive amine content of soymilk”.	141

1 INTRODUÇÃO

A soja [*Glycine max (L.) Merril*] é uma planta pertencente à família das leguminosas. Como um produto agrícola, há grande interesse mundial devido a versatilidade dos grãos e dos produtos derivados que são utilizados para alimentação humana e animal e para agroindústria. No cenário econômico mundial, observa-se que a cada ano, a soja tem alcançado recordes em sua produção e comercialização, sendo que esta foi a cultura agrícola brasileira que mais cresceu nas últimas três décadas. Na safra 2019/20 está previsto que o Brasil ultrapassará a produção dos Estados Unidos tornando-se o maior produtor mundial deste grão (CONAB, 2019; USDA, 2019).

Os indicadores de produção e comercialização da soja são promissores, entretanto, o seu uso está direcionado principalmente para a produção de óleo vegetal e farelo. Entretanto, devido aos benefícios desta leguminosa à saúde humana, tem sido incentivado o seu consumo, o desenvolvimento de novos produtos e o seu uso como ingrediente na elaboração de vários produtos (SEIBEL, 2018; CONAB, 2019).

Além do elevado teor de proteínas e lipídios, ao redor de 40% e 20%, respectivamente, a soja contém substâncias bioativas, tais como, peptídeos, fibras, oligossacarídeos, ácidos fenólicos, isoflavonas, saponinas, fitosteróis, ácido fítico, amins bioativas e outros compostos que são benéficos a saúde humana (MESSINA, 2016). Embora somente as proteínas da soja possuam alegação de benefícios a saúde humana (FDA, 1999; ANVISA, 2013), tem-se demonstrado por estudos clínicos e epidemiológicos que estes outros constituintes também possuem potenciais efeitos sobre a saúde de humanos (CHEN *et al.*, 2012; MESSINA, 2016; AMARAL *et al.*, 2017).

As substâncias bioativas ou compostos bioativos são nutrientes ou não nutrientes que possuem ação metabólica ou fisiológica específica em humanos (ANVISA, 2018). Os compostos bioativos geralmente são metabólitos secundários de plantas e, por isso, muitas vezes são denominados de fitoquímicos. Quando consumidos, os compostos bioativos desempenham um papel importante na saúde, crescimento e desenvolvimento humano, além de contribuir na redução de risco de certos tipos de doenças (LAGOS *et al.*, 2015).

As isoflavonas da soja ocorrem em quatro classes e doze formas de estruturas químicas distintas e são denominadas de agliconas (daidzeína, genisteína e gliciteína) e as suas respectivas formas conjugadas denominadas de β -glicosídeos (daidzina, genistina e glicitina); malonilglicosídeos (malonil-daidzina, malonil-genistina e malonil-glicitina) e acetilglicosídeos (acetil-daidzina, acetil-genistina e acetil-glicitina) (LIU, 2004; WANG, 2008). As isoflavonas

podem ser convertidas em suas diferentes formas e possuem efeitos significativos na biodisponibilidade, sendo que as agliconas são absorvidas mais facilmente pelo organismo em relação as formas glicosídeos (XU *et al.*, 2000) e tem sido descritas que são mais benéficas à saúde humana (MESSINA; MESSINA, 2000; MESSINA, 2000; MESSINA;WOOD, 2008).

As aminas bioativas são compostos nitrogenados não proteicos que fazem parte do metabolismo de animais, vegetais e microrganismos. Conforme sua origem podem ser classificadas em aminas biogênicas e poliaminas. As aminas biogênicas, incluem principalmente a tiramina, histamina, triptamina, β -feniletilamina e cadaverina e estão presentes nos alimentos devido a presença de bactérias que produzem enzimas que descarboxilam seus aminoácidos precursores. As aminas biogênicas são neuro- e vaso-ativas, sendo que a tiramina, triptamina e β -feniletilamina, por exemplo, são reconhecidas pela capacidade de aumentar a pressão sanguínea, enquanto que a histamina é vasodilatadora (GLÓRIA, 2006). Enquanto que as poliaminas constituídas por espermidina e espermina, são sintetizadas *in situ* a medida que são requeridas e fazem parte do processo fisiológico nos tecidos animais e vegetais, e sua origem não está associada com a atividade microbiana. Entretanto, a putrescina está classificada em ambos os grupos, tanto por sua ocorrência fisiológica, como por sua formação a partir da descarboxilação da ornitina (GLÓRIA, 2006). As poliaminas, além de atuarem no crescimento e metabolismo celular, apresentam efeitos antioxidantes inibindo a oxidação lipídica, são importantes na maturação e recuperação da mucosa intestinal, mediam a ação de hormônios e fatores de crescimento e estão envolvidas na síntese de DNA, RNA e proteínas (KALÁČ; KRAUSOVÁ, 2005; GLÓRIA, 2006).

As aminas bioativas estão presentes em diversos tipos de alimentos, tais como: frutas, vegetais, peixes, carnes, queijos, vinhos e cervejas (VIDAL-CAROU *et al.*, 2007; SPANO *et al.*, 2010). A presença de putrescina, cadaverina, agmatina, espermidina e espermina foram descritas em diferentes cultivares de soja (GLÓRIA *et al.*, 2005) e em produtos de soja não fermentados (tofu, extrato e brotos de soja), enquanto que em produtos fermentados (natto, tempeh, miso, tamari, molho de soja, pasta de soja e sufu) além destas aminas, também foram relatadas a presença de tiramina, histamina, triptamina e β -feniletilamina (TORO-FUNES *et al.*, 2015a).

Entretanto, baixos níveis de aminas biogênicas em alimentos não são considerados um risco sério à saúde de humanos, mas quando consumidas em quantidades excessivas, podem causar efeitos farmacológicos, fisiológicos ou tóxicos distintos (EFSA, 2011). A deterioração de alimentos por microrganismos contaminantes pode ser acompanhada pelo aumento na produção de descarboxilases, assim sendo, há um grande interesse na

investigação sobre o conteúdo de amins biogênicas em alimentos, devido a sua possível toxicidade. Desta forma, a presença destas amins tem sido utilizada como indicador das condições higiênicas, práticas de fabricação e frescor de alimentos (LINARES *et al.*, 2011).

O extrato de soja é definido como o produto obtido a partir da emulsão aquosa resultante da hidratação dos grãos, convenientemente limpos, seguido de processamento tecnológico adequado, adicionado ou não de ingredientes opcionais permitidos, podendo ser submetido à desidratação, total ou parcial (ANVISA, 1978; 2005). Tradicionalmente, o extrato é obtido após a maceração dos grãos, drenagem da água, trituração, filtração e tratamento térmico (LIU, 2004). Entretanto, as condições de processamento podem influenciar na extração dos constituintes da soja. A composição e rendimento do extrato de soja dependem de fatores, tais como: cultivar, tempo de maceração, proporção soja:água, trituração, filtração antes ou depois do tratamento térmico, tempo e temperatura do tratamento térmico, além do emprego de enzimas, fermentação e outros fatores (DONKOR; SHAH, 2008; JUNG; MURPHY; SALA, 2008).

O uso de enzimas em processos biotecnológicos é vantajoso devido as suas especificidades, não necessidade de uso de temperaturas elevadas para a reação e a não formação de subprodutos indesejáveis (KIRK; BORCHERT; FUGLSANG, 2002; DUEÑAS; HERNÁNDEZ; ESTRELLA, 2007). As carboidrases tem sido utilizadas como uma ferramenta para extração de compostos de matérias-primas vegetais devido a hidrólise dos polissacarídeos da parede celular (BHAT, 2000).

O ultrassom é uma tecnologia que tem sido aplicada para melhorar a produtividade de processos químicos, físicos e biotecnológicos e pode ser convenientemente combinada com outras técnicas de extração, tais como, o tratamento enzimático (SZABÓ; CSISZÁR, 2013). A combinação de enzimas e ultrassom resulta no aumento da eficácia da operação intensificando a extração dos compostos de interesse e na diminuição do tempo de tratamento (SHIRSATH; SONAWANE; GOGATE, 2012).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a extração assistida por hemicelulase e ultrassom sobre a atividade de β -glicosidases, conteúdo de isoflavonas e aminas bioativas e o potencial antioxidante de extratos de soja, bem como, avaliar o perfil e conteúdo das aminas em produtos prontos para consumo disponíveis no mercado de Barcelona.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Investigar a extração assistida por hemicelulase e ultrassom de β -glicosidases e isoflavonas de extratos de soja e avaliar a capacidade antioxidante dos extratos.

Determinar o perfil e conteúdo das aminas bioativas na soja e extratos assistidos por hemicelulase e ultrassom.

Aplicar o delineamento composto central rotacional para avaliar os efeitos da adição de hemicelulase, intensidade de ultrassom e tempo de tratamento sobre a extração das aminas bioativas de extratos de soja.

Avaliar o perfil e conteúdo das aminas bioativas de produtos prontos para consumo de supermercados e restaurantes especializados de Barcelona e em sashimis de atum armazenados a 5 e 20 °C por 1 e 2 dias.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ORIGEM, ASPECTOS ECONÔMICOS E PRODUÇÃO DE SOJA

As evidências históricas e geográficas indicaram que a soja teve a sua origem no continente asiático e o seu cultivo foi primeiramente registrado no noroeste da China no século XI a.C.. Entretanto, a soja foi citada entre os séculos XI e VII a.C. em um dos livros clássicos chineses (LIU, 1999). Os historiadores chineses, relataram que o imperador Sheng-Nun mencionou sobre a soja em um livro que foi escrito há quase cinco mil anos. Neste livro, a soja foi considerada como um dos cinco grãos sagrados, junto com o arroz, trigo, cevada e milho e essenciais para o desenvolvimento da civilização chinesa. A soja espalhou-se gradualmente para outros países asiáticos e somente após o século VIII d.C. chegou ao Japão (MESSINA; MESSINA; SETCHEL, 1994).

Na Europa, a soja foi introduzida ao redor de 1712 pelo botânico alemão Engelbert Kaempher e somente mais tarde o botânico sueco Lineu, atribuiu o nome científico de *Glycine max* (LIU, 1999). Nos EUA, a soja chegou no final do século XVIII, embora a introdução oficial como uma cultura comercial ocorreu após o início do século XX. Em 1919 e após o final da Primeira Guerra Mundial, a soja passou a ter um destaque efetivo e internacional. Assim, em 1921 os EUA implementaram a *American Soybean Association* para cuidar dos interesses de toda a cadeia produtiva da soja (MESSINA; MESSINA; SETCHEL, 1994).

No Brasil, os primeiros registros da soja ocorreram em 1882 no Estado da Bahia. Em 1891 o grão foi introduzido em São Paulo e Rio Grande do Sul (SANTOS, 1988). Em 1901 foi cultivada pela primeira vez na Estação Agropecuária de Campinas do Estado de São Paulo. Em 1908, a soja também foi introduzida pelos primeiros imigrantes japoneses e somente em 1914, há o primeiro registro de cultivo na cidade de Santa Rosa no Rio Grande do Sul. Em 1949 e pela primeira vez, o Brasil começa a se destacar como produtor de soja com participação nas estatísticas internacionais. Porém, a expansão da soja aconteceu somente nos anos 70 devido o interesse crescente da indústria de óleo e demanda pelo mercado internacional (A SOJA, 2007; SEIBEL, 2018).

A produção de soja no Brasil se destacou em relação aos outros países, devido ao escoamento da safra brasileira que ocorreu na entressafra americana e quando os preços atingiram as maiores cotações. Associando a estes fatos, o país passou a investir em tecnologias para adaptação da cultura às condições brasileiras, cujos processos tem sido liderados pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA - Soja). Estes investimentos

possibilitaram a “tropicalização” da soja, que permitiu o sucesso no cultivo em regiões de baixas latitudes, entre o trópico de Capricórnio e a linha do Equador. Essa conquista dos cientistas brasileiros revolucionou a história mundial da soja e seu impacto no mercado começou a ser notado a partir do final da década de 80 e, mais notoriamente, na década de 90 (EMBRAPA, 2019b).

Assim a soja passou a ser considerada como a principal cultura do setor agrícola brasileiro. Na safra de 2017/2018, o Brasil produziu 119.281,7 mil toneladas em uma área plantada de 35.149,2 mil hectares e representou 35% da safra mundial que foi estimada em 337 mil toneladas. Dentre os Estados brasileiros, o Mato Grosso é o maior produtor de soja, seguido do Paraná e juntos, representaram 51.476,6 mil toneladas ou equivalente a 44% da produção nacional (CONAB, 2019). Nesta safra, o maior produtor mundial foi os Estados Unidos com 36% da produção mundial totalizando em cerca de 123.66 mil toneladas do grão (USDA, 2019).

Entretanto, segundo os dados apresentados no levantamento mensal referente ao mês de maio de 2019 pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), serão produzidos mundialmente 355.66 mil toneladas de soja na safra 2019/20. A previsão do USDA indica que o Brasil assumirá a liderança no ranking mundial, com produção de 123 mil toneladas superando os Estados Unidos com 112.95 mil, a Argentina produzirá 53 mil e a China 17 mil toneladas (USDA, 2019).

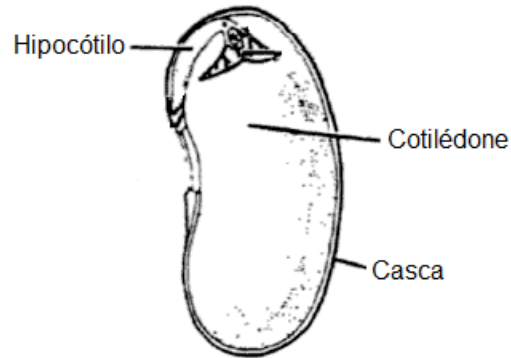
Embora há um aumento na produção nacional da soja, apenas 50 % da produção nacional (ou cerca de 59 mil toneladas) foram destinados ao consumo interno (EMBRAPA, 2019b). Sendo que o óleo é o principal produto de soja destinado ao consumo humano. Entretanto, esta leguminosa com grande potencial de produção pode também ser utilizada como fonte de proteínas e matéria-prima para elaboração de diferentes produtos tais como: farinha, concentrado proteico, isolado proteico, bem como, extrato de soja e outros produtos derivados do setor industrial (SEIBEL, 2018).

3.2 ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA SOJA

O grão de soja é constituído de 8% de cascas, 90% de cotilédones e 2% de hipocótilos (Figura 1). Considerando as estruturas dos componentes individuais do grão, o cotilédone é a parte que apresenta maior percentual de proteínas e lipídios, enquanto que a casca apresenta o menor percentual destes componentes, porém, apresenta elevado conteúdo de carboidratos. O cotilédone representa a maior parte de todo o grão, portanto, é de se esperar que

a sua composição se aproxime da composição do grão inteiro (LIU, 1997; MEDIC; ATKINSON; HURBURGH, 2014). A composição química dos componentes do grão de soja podem ser observados na Tabela 1.

Figura 1 - Componentes da estrutura do grão de soja.



Fonte: Adaptado de Liu (1997)

Tabela 1 - Componentes do grão de soja e sua composição química

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

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

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

A soja destaca-se pela sua composição química única e valor nutritivo. Quando comparada a alguns cereais e outras leguminosas, possui o maior conteúdo proteico, com 40% de proteínas em base seca. Dentre as leguminosas, o amendoim apresenta maior conteúdo lipídico, sendo a soja o segundo com 20% de lipídios em base seca. Ainda, a soja contém 30% de carboidratos, 13% de umidade e 5% de cinzas. Entretanto, a composição química da soja depende de vários fatores, como genótipo da planta, estágio de maturação, tipo de solo, localização geográfica de cultivo, dentre outros (LIU, 1997; RIAZ, 2006).

As proteínas da soja são armazenadas principalmente nos cotilédones e em estruturas denominadas de corpos proteicos. Assim, como a maior parte das proteínas de outras leguminosas, a soja possui baixo teor de aminoácidos sulfurados, sendo limitante em metionina e cistina. Entretanto, as proteínas da soja contém a lisina, cujo aminoácido é limitante na maioria dos cereais. Portanto, a combinação de leguminosas e cereais tem sido considerada ótima do

ponto de vista do valor nutritivo (LIU, 2004).

As principais proteínas da soja são as globulinas e as suas frações podem ser classificadas segundo seus coeficientes de sedimentação e denominadas de 2S, 7S, 11S e 15S. Os principais componentes das proteínas da soja são as frações 7S (β -conglucina) e 11S (glicina) e representam 40% e 30% do total do grão, respectivamente (TAY; XU; PERERA, 2005). Estas frações conferem propriedades funcionais e tecnológicas às proteínas da soja, sendo que a fração 7S possui maior solubilidade e melhor capacidade emulsificante do que a fração 11S. A fração 11S forma um gel mais firme com agregados proteicos maiores em relação à fração 7S, devido ao grande número de grupos sulfidril e apresenta uma tendência de ser mais eficiente para formar filmes na interface ar/água (HERMAN, 2005; TAY; XU; PERERA, 2005; MANION; CORREDIG, 2006).

As proteínas da soja possuem um balanço bastante satisfatório de aminoácidos essenciais (CHEN *et al.*, 2012). O Food and Drug Administration (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 (FDA, 1990; CHEN, *et al.*, 2012). Devido as limitações e precisão do método PDCAAS, um novo método foi implementado e denominado de *Digestible Indispensable Amino Acid Score* (DIAAS), com finalidade de melhor refletir a quantidade absorvida de cada aminoácido por meio da determinação da digestibilidade destes na porção final do intestino delgado (FAO, 2012; 2013). Destaca-se que os índices PDCAAS e DIAAS para qualidade proteica dos produtos de soja, apresentaram valores ótimos entre 0,90 e 1,00, sendo a referência a caseína (proteína do leite) (FAO, 2012;2013).

Em 1999 o FDA aprovou a alegação de que a ingestão de 25g de proteínas de soja por dia aliada à um baixo consumo de gordura saturada e colesterol pode reduzir o risco de doenças coronarianas (FDA, 1999). No Brasil, a ANVISA também autorizou descrições similares na rotulagem de alimentos contendo proteínas de soja, porém considera como um ingrediente com alegação de propriedade funcional (ANVISA, 2013). A partir desta alegação pelo FDA tem ocorrido um aumento considerável na produção, comercialização e consumo de soja e derivados (XIAO, 2008).

Os carboidratos representam a segunda maior fração de componentes da soja, porém o seu valor econômico tem sido menos importante do que o das proteínas e lipídios. O teor de carboidratos totais nos grãos de soja é de 34%, no qual 10% deste total correspondem aos carboidratos solúveis ou oligossacarídeos solúveis em água (5% de sacarose, 4% de

estaquiose e 1% de rafinose). A rafinose e a estaquiose são os principais responsáveis pela flatulência causada em humanos após a ingestão de soja e derivados (BORDINGNON; MANDARINO, 1994). Entretanto, estes açúcares são utilizados como nutrientes pelas bifidobactérias no intestino delgado e dessa forma são considerados como prebióticos, pois podem melhorar a função imune no organismo humano (GOLBITZ; JORDAN, 2006; MA *et al.*, 2016). Os carboidratos insolúveis ou fibras alimentares são constituídos por polissacarídeos complexos estruturais que fazem parte da parede celular, como celulose, hemicelulose e pectina (CHEN *et al.*, 2012).

Durante o desenvolvimento do grão, os lipídios são armazenados principalmente na forma de triacilgliceróis, e em menor quantidade há os fosfolipídios e material insaponificável como tocoferol, fitosterol e hidrocarbonetos (LIU, 1997). Do total de lipídios da soja, 86% é composto por ácidos graxos insaturados e destes, 60% são ácidos graxos essenciais, como o linoleico ($\omega 6$) e o linolênico ($\omega 3$). O elevado valor nutritivo do óleo de soja também tem sido atribuído a fonte de ácidos graxos insaturados como o ácido oleico, linoleico e linolênico. Entre os derivados de soja para alimentação humana, o óleo de soja refinado é o produto mais utilizado e representa 25% de todos os óleos e gorduras consumidos no mundo (EMBRAPA, 2019a). Foi observado por He e Chen (2013) que antes do crescente interesse de consumo da proteína de soja, a obtenção do óleo foi o principal objetivo comercial da soja.

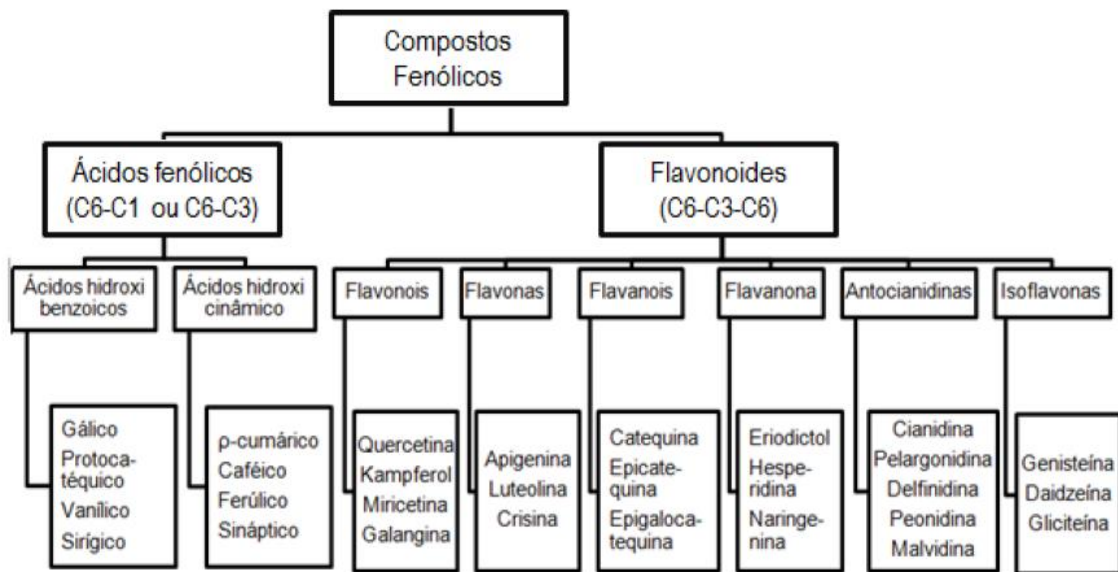
Os grãos de soja contêm 5% de cinzas em base seca. Dentre os principais minerais presentes na soja, pode-se citar o potássio, fósforo, magnésio, enxofre, cálcio, cloro e sódio. Além dos minerais, a soja também apresenta algumas vitaminas em sua composição, como as vitaminas A, E, B1, B2 e niacina (EMBRAPA, 2019b). Ainda, apresenta as vitaminas B6, C e K, que não são sintetizadas em quantidades suficientes pelo organismo humano e, portanto, devem ser fornecidas a partir da dieta (CHEN *et al.*, 2012). Também estão presentes na soja, outros constituintes que embora correspondam a uma pequena fração do total, apresentam importante papel funcional, tais como os fitoesteróis, inibidores de proteases, saponinas, isoflavonas e outros (LIU, 2004).

3.2.1 Compostos Fenólicos e Isoflavonas

Os compostos fenólicos são produtos provenientes do metabolismo secundário de plantas, sintetizados a partir das vias do chiquimato e do acetato, que formam um grande e complexo grupo de fitoquímicos. Podem apresentar moléculas simples, como por exemplo os ácidos fenólicos, ou moléculas altamente polimerizadas, como os taninos (Figura

2) (KARAKAYA, 2004). Dependendo da sua estrutura química, os compostos fenólicos são classificados em dois grupos denominados de ácidos fenólicos (C6-C1 ou C6-C3) e flavonoides (C6-C3-C6). A maioria dos compostos fenólicos ocorre como glicosídeos, ou seja, contém um açúcar (mono, di ou polissacarídeo) ligado ao grupo hidroxil da estrutura química, sendo a glicose o mais comum (ANGELO; JORGE, 2007; TSAO, 2010; OZDAL; CAPANOGLU; ALTAY, 2013).

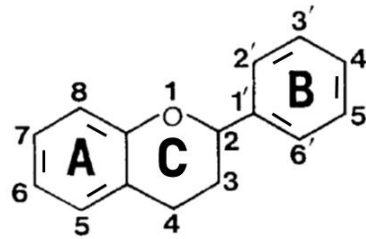
Figura 2 - Classificação dos compostos fenólicos.



Fonte: Adaptado de Karakaya (2004)

Dentre os ácidos fenólicos, destacam-se a estrutura contendo (C6-C1) que incluem os ácidos gálico, p-hidroxibenzoico, protocatéquico, vanílico e sirigico; enquanto que os ácidos hidroxicinâmicos são compostos com uma estrutura aromática e com uma cadeia lateral de três carbonos (C6-C3), sendo os mais comuns, os ácidos cafeico, ferúlico, p-cumárico e sináptico (KARAKAYA, 2004). Os flavonoides apresentam a estrutura química descrita como (C6-C3-C6) (Figura 3) e com base nas diferenças estruturais do anel aglicona C e nas substituições dos grupos hidroxila e metoxi, os flavonoides podem ser classificados como: flavonóis, flavonas, flavanóis, flavanona, antocianidinas e isoflavonas (PAN; LAI; HO, 2010; SHAHIDI; YEO, 2016). As isoflavonas são compostos heterocíclicos que apresentam estrutura (C3-C6-C6) (Figura 4) e se diferenciam das demais estruturas dos flavonoides por apresentarem o anel benzeno unido ao carbono 3 do heterociclo, em vez do carbono 2 (MORAES, 2009).

Figura 3 - Estrutura geral de flavonoides.



Fonte: Adaptado de Moraes (2009)

Devido a estrutura química dos compostos fenólicos conter as hidroxilas e os anéis aromáticos, estes compostos possuem capacidade antioxidante (NACZK; SHAHIDI, 2004; ANGELO; JORGE, 2007). Estes compostos atuam eliminando os radicais livres por transferência de elétrons ou doação de um átomo de hidrogênio de um grupo hidroxila de sua estrutura aromática, que possui capacidade de manter um elétron desemparelhado ou quelar os metais de transição, como Fe^{2+} e Cu^+ , interrompendo a reação de propagação de radicais livres na oxidação lipídica (PODSEDEK, 2007; MIN; EBELER, 2008). A capacidade antioxidante pode ser influenciada pela posição e grau de hidroxilação, polaridade, solubilidade e estabilidade do radical fenólico (MCCLEMENTS; DECKER, 2010).

A capacidade antioxidante dos compostos fenólicos ocorre por diferentes mecanismos, tais como: (i) eliminação de radicais livres; (ii) quelação de metais; (iii) inibição de alguns tipos de oxidases (como ciclo-oxigenase) e (iv) proteção de enzimas com propriedades antioxidantes (superóxido dismutase, catalase, etc.) (NIJVELD *et al.*, 2001; XYNOS *et al.*, 2012).

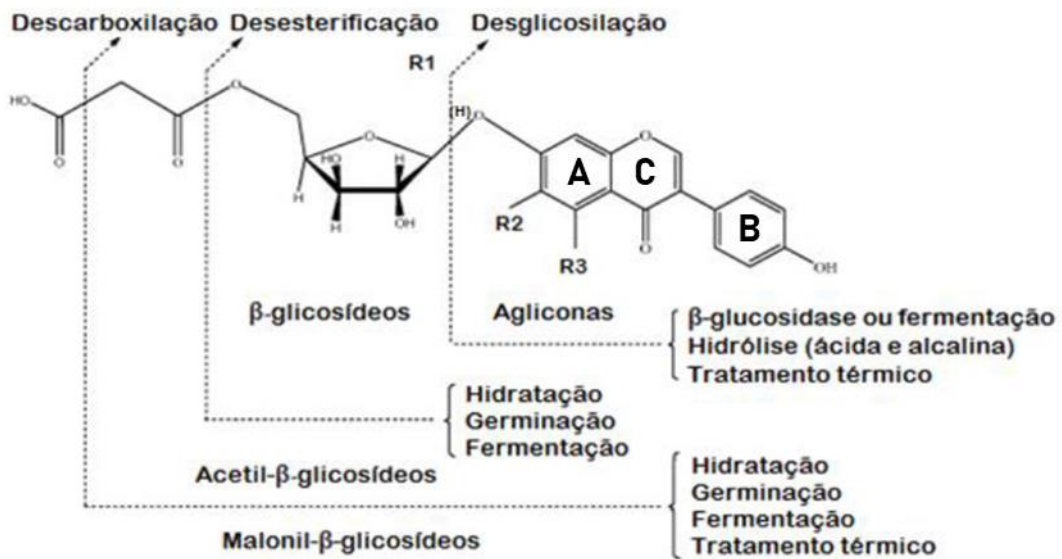
Os flavonoides são encontrados em várias famílias de plantas, porém, as isoflavonas estão presentes em apenas algumas famílias botânicas e são consideradas como o principal metabólito secundário da soja e correspondem a 0,1 a 0,4% de seu peso seco (LIU, 2004). Na soja, o conteúdo de isoflavonas, bem como suas formas químicas, variam e são influenciados por fatores genéticos (cultivar), ambientais (local de cultivo, ano de plantio, data colheita) e pelas condições dos grãos após a colheita (umidade relativa, temperatura e período de armazenamento) (BENASSI; PRUDENCIO, 2013; SZYMCZAK *et al.*, 2017).

A distribuição e forma química das isoflavonas também podem variar conforme os componentes do grão, sendo que a concentração maior de isoflavonas totais ocorre no hipocótilo (87%) seguido dos cotilédones (13%). Ainda que o hipocótilo represente a maior concentração de isoflavonas dentre os componentes do grão, proporcionalmente este componente participa com apenas 2% do total de isoflavonas e desta forma, são equivalentes

aos cotilédones e contribuem de modo similar no teor de isoflavonas na soja. A radícula e epicótilo apresentam ausência de isoflavonas no grão *in natura* (YOSHIARA *et al.*, 2018).

As isoflavonas da soja podem existir em quatro diferentes formas químicas: agliconas, β -glicosídeos, malonilglicosídeos e acetilglicosídeos. As agliconas não contém açúcar na sua estrutura e são constituídas por daidzeína, genisteína e gliciteína. As isoflavonas β -glicosídeos são constituídas por daidzina, genistina e glicitina e contém uma glicose ligada ao anel benzeno e podem ser conjugadas ou não com grupos malonil ou acetil (Figura 4). As isoflavonas na forma acetilglicosídeos, são denominadas de 6''-O-acetildaidzina, 6''-O-acetilgenistina, 6''-O-acetilglicitina e na forma malonilglicosídeos, são denominadas de 6''-O-malonildaidzina, 6''-O-malonilgenistina e 6''-O-malonilglicitina, totalizando assim, as 12 diferentes formas de isoflavonas (LIU, 2004). No entanto, estas isoflavonas podem ser transformadas em suas diferentes formas (Figura 4) por clivagem das ligações por meio de descaboxilação, desesterificação ou hidrólise, quando submetidos a diferentes tipos de processamento da soja e seus produtos (CHEN *et al.*, 2015).

Figura 4 - Estrutura química das diferentes formas de isoflavonas, seus radicais e possíveis transformações por clivagem de ligações.



Isoflavonas	Grupo	R ₁	R ₂	R ₃
Daidzeína	Agliconas	H	H	H
Genisteína		H	H	OH
Gliciteína		H	OCH ₃	H
Daidzina	β-glicosídeos	C ₆ O ₅ H ₁₁	H	H
Genistina		C ₆ O ₅ H ₁₁	H	OH
Glicitina		C ₆ O ₅ H ₁₁	OCH ₃	H
6''-O-acetildaidzina	Acetilglicosídeos	C ₆ O ₅ H ₁₁ +COCH ₃	H	H
6''-O-acetilgenistina		C ₆ O ₅ H ₁₁ +COCH ₃	H	OH
6''-O-acetilglicitina		C ₆ O ₅ H ₁₁ +COCH ₃	OCH ₃	H
6''-O-malonildaidzina	Malonilglicosídeos	C ₆ O ₅ H ₁₁ +COCH ₂ COOH	H	H
6''-O-malonilgenistina		C ₆ O ₅ H ₁₁ +COCH ₂ COOH	H	OH
6''-O-malonilglicitina		C ₆ O ₅ H ₁₁ +COCH ₂ COOH	OCH ₃	H

Fonte: Adaptado de Liu (2004) e Chen *et al.* (2015)

Dentre todas as isoflavonas, as malonilglicosídeos estão presentes em maior quantidade nos grãos de soja, seguidas pelas β-glicosídeos, agliconas e acetilglicosídeos (HSIEH; KAO; CHEN, 2005). Entretanto, quando a soja e seus derivados são submetidos a diferentes tipos de processamentos, as malonilglicosídeos são convertidas em acetilglicosídeos e estas, por sua vez, em β-glicosídeos (PARK *et al.*, 2001; ROSTAGNO; PALMA; BARROSO, 2005; XU; CHANG, 2008). Além disso, as β-glicosídeos podem ser convertidas em agliconas devido a ação das enzimas β-glicosidases, como ocorre quando a soja é submetida à fermentação (HANDA *et al.*, 2014; BAÚ; GARCIA; IDA, 2015; FERNANDES *et al.*, 2017), hidratação (LIMA; IDA, 2014), germinação (QUINHONE JÚNIOR; IDA, 2015) ou tratamento térmico (ANDRADE *et al.*, 2016).

As isoflavonas glicosídeos quando ingeridas por humanos, são menos absorvidas e a sua biodisponibilidade requer uma hidrólise inicial (SETCHELL *et al.*, 2001). Assim, é desejável que ocorra a conversão das isoflavonas glicosídeos em agliconas, pois resulta em maior quantidade de compostos que beneficiam a saúde humana (PARK *et al.*, 2001). A importância das isoflavonas agliconas nos alimentos tem sido enfatizada devido a sua elevada atividade biológica (AMARAL *et al.*, 2017). As isoflavonas agliconas possuem estrutura química similar ao hormônio feminino 17β -estradiol, podendo apresentar atividade estrogênica ou antiestrogênica, são classificadas como fitoestrógenos e são capazes de exercer efeitos protetores contra distúrbios hormonais e aliviar os sintomas da menopausa (LETHABY *et al.*, 2007; MEDIC; ATKINSON; HURBURGH, 2014; LEE *et al.*, 2015).

As isoflavonas em combinação com as proteínas de soja podem ocasionar redução do risco de doença cardiovascular, pela diminuição dos níveis de colesterol de baixa densidade e triglicerídeos, além de aumentar a estabilidade oxidativa do colesterol (GARDNER *et al.*, 2001; CHEN *et al.*, 2006). Além disso, destaca-se que as isoflavonas influenciam na redução da perda de massa óssea, atividade antioxidante, redução no aparecimento de aterosclerose, hipertensão, inflamação intestinal e tem efeito protetor contra o desenvolvimento de câncer de mama e de próstata (GANAI *et al.*, 2015; MESSINA; WOOD, 2008; DONG *et al.*, 2013; MESSINA, 2016; WADA *et al.*, 2013). As isoflavonas também podem influenciar no metabolismo de glicose e de lipídios e serem benéficas na prevenção da obesidade e diabetes (CHOI *et al.*, 2008).

3.2.2 Aminas Bioativas

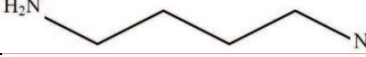

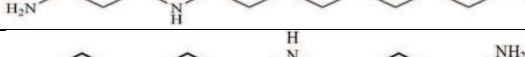


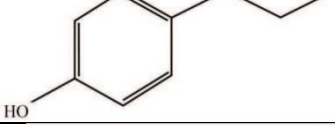
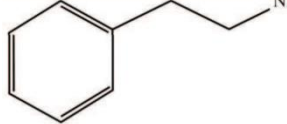
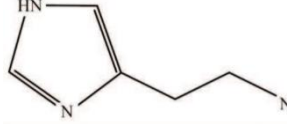
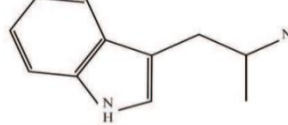
As aminas bioativas ou aminas biologicamente ativas são compostos orgânicos nitrogenados, em que um, dois, ou três átomos de hidrogênio da amônia são substituídos por grupos alquila ou arila. São bases orgânicas alifáticas, aromáticas ou heterocíclicas de baixo peso molecular que participam de processos metabólicos normais de animais, plantas e microrganismos (MAIJALA *et al.*, 1993; HALÁSZ *et al.*, 1994; BARDÓCZ, 1995).

A denominação da maioria das aminas ocorre em função de seu aminoácido precursor, como por exemplo, a histamina origina-se da histidina, a tiramina da tirosina, a triptamina do triptofano, e assim por diante. No entanto, as aminas cadaverina, putrescina, espermina e espermidina foram assim denominadas devido as suas fontes. Sendo que a cadaverina e putrescina foram encontradas em produtos em fase de decomposição ou

putrefação, enquanto que a espermina e espermidina foram isoladas pela primeira vez no fluido seminal (BARDÓCZ, 1995; LIMA; GLÓRIA, 1999; GLÓRIA, 2006).

As amins bioativas podem ser classificadas em função do número de grupamentos amina na molécula, da estrutura química, da via biossintética e das funções que exercem. Quanto ao número de grupamentos amina na molécula, as amins bioativas são divididas em monoaminas (tiramina e feniletilamina), diaminas (histamina, triptamina, serotonina, putrescina e cadaverina) e poliaminas (espermidina, espermina e agmatina). Com relação à estrutura química, as amins bioativas podem ser classificadas em alifáticas (putrescina, cadaverina, espermina, espermidina e agmatina); aromáticas (tiraminas e feniletilamina) ou heterocíclicas (histamina e triptamina) (Figura 5). Enquanto que em função do grupo químico, as amins bioativas podem ser classificadas como catecolaminas (dopamina, noradrenalina e adrenalina), indolaminas (serotonina) e imidazolaminas (histamina) (GLÓRIA, 2006).

Figura 5 - Estrutura química de algumas amins bioativas.

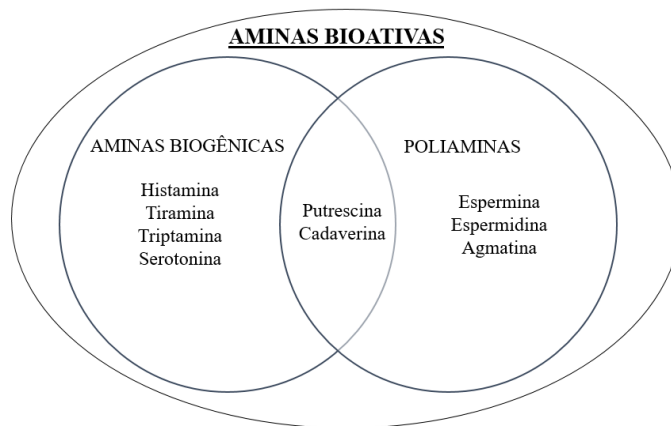
Classificação Química		
Alifáticas	Putrescina	
	Cadaverina	
	Espermina	
	Espermidina	
	Agmatina	
Aminas Aromáticas	Tiramina	
	Feniletilamina	
Heterocíclicas	Histamina	
	Triptamina	

Fonte: Adaptado de Glória (2006)

Ainda, quanto à via biossintética, as aminas podem ser classificadas como aminas naturais (espermina, espermidina, putrescina e histamina) ou aminas biogênicas. As aminas denominadas de aminas naturais são formadas durante a biossíntese “*in situ*”, ou seja, a partir de uma molécula mais simples, à medida que são requeridas (espermina e espermidina), ou podem estar armazenadas nos mastócitos e basófilos (histamina). Enquanto que as aminas biogênicas são formadas por meio do processo de descarboxilação de aminoácidos. A histamina pode ser classificada tanto como uma amina natural (armazenada em mastócitos ou basófilos) ou como uma amina biogênica (BARDÓCZ, 1995; LIMA; GLÓRIA, 1999; GLÓRIA, 2006).

Com relação as funções fisiológicas das aminas bioativas, estas são classificadas em poliaminas e aminas biogênicas. As poliaminas são moduladoras da síntese proteica por atuarem no crescimento e manutenção do metabolismo celular de animais, vegetais e microorganismos, enquanto que as aminas biogênicas são vasoativas e neuroativas, devido ao seu efeito nos sistemas vascular e neural (HALÁSZ *et al.*, 1994; BARDÓCZ, 1995). Para elucidar melhor esta subdivisão e segundo as informações de Halász *et al.* (1994), Bardócz (1995) e Glória (2006), a classificação de aminas bioativas pode ser apresentada conforme a Figura 6.

Figura 6 - Classificação de aminas bioativas.



Fonte: Adaptado de Halász *et al.* (1994), Bardócz (1995) e Glória (2006)

As aminas biogênicas podem ser formadas por meio da hidrólise de compostos nitrogenados, decomposição térmica ou descarboxilação de aminoácidos (Figura 7), sendo que a última é a principal via de formação. A formação de aminas biogênicas depende de vários fatores, tais como, disponibilidade de aminoácidos livres, presença de microrganismos que produzem enzimas descarboxilases e condições favoráveis para o crescimento destes microrganismos (GLÓRIA, 2006).

Figura 7 - Formação de aminas por meio da descarboxilação de aminoácidos.



Fonte: Glória (2006)

Inúmeras espécies bacterianas são capazes de descarboxilar um ou mais aminoácidos, dentre estas são citadas: *Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Photobacterium*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella* e *Streptococcus*. Sendo que as espécies de *Enterobacteriaceae* produzem histaminas, tiraminas, putrescinas e cadaverinas. Em peixes, as espécies *Morganella morgani*, *Klebsiella pneumonia* e *Hafnia alvei* são importantes e consideradas as formadoras de histaminas (SILLA-SANTOS, 1996; GLÓRIA, 2006; LAVON; LURIE; BENTUR, 2008).

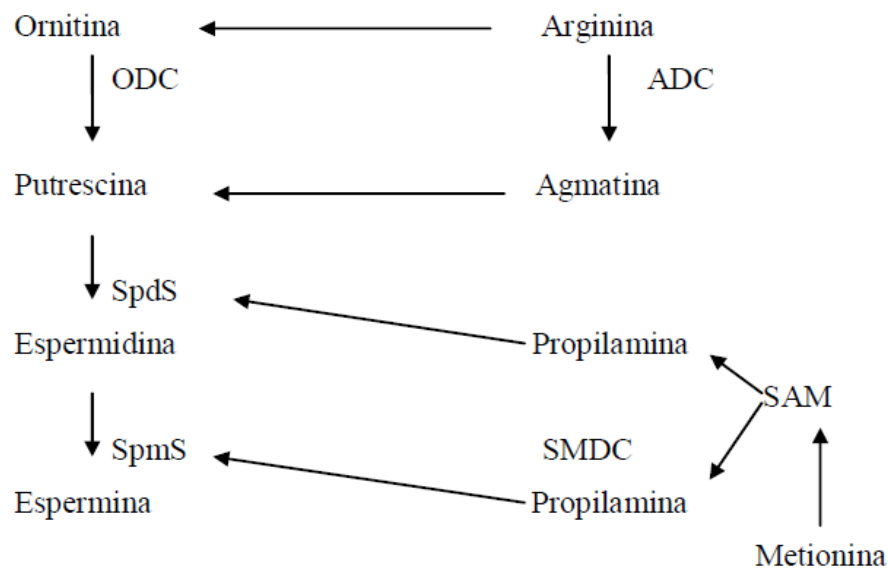
As aminas biogênicas em alimentos podem estar naturalmente presentes ou serem formadas por microrganismos adicionados (culturas iniciadoras) ou por contaminantes, devido às condições higiênico-sanitárias inadequadas. Em geral, a quantidade e o tipo de aminas nos alimentos dependem da natureza, origem, etapas de processamento e da presença de microrganismos (SILLA-SANTOS, 1996). Assim sendo, estes parâmetros têm sido utilizados como critérios de qualidade, pois a presença destas aminas reflete a má qualidade das matérias-primas utilizadas e/ou das condições higiênico-sanitárias na fabricação de certos produtos (GLÓRIA, 2006). Porém, a presença de aminas biogênicas em alimentos, não se correlaciona necessariamente com o crescimento de microrganismos deteriorantes, porque nem todos são considerados descarboxilases positivos (SILLA-SANTOS, 1996).

As poliaminas são bases orgânicas alifáticas e hidrossolúveis, que, em pH fisiológico, atuam como polications. No grupo das poliaminas há: espermidina, espermina e agmatina. Estas substâncias estão presentes em todas as células, principalmente em tecidos de alta renovação celular. Por serem polications, as poliaminas estão envolvidas em diversas funções metabólicas e fisiológicas em animais, vegetais e microorganismos (BARDÓCZ, 1995; ELIASSEN *et al.*, 2002; MOINARD; CYNOBER; BANDT, 2005).

A síntese das poliaminas é considerada como um processo mais complexo (Figura 8) (GLÓRIA, 2006). Endogenamente, as poliaminas podem ser sintetizadas a partir da ornitina por reação de descarboxilação, catalisada pela enzima ornitina descarboxilase (OD) que produz a putrescina (MEDINA *et al.*, 2003). A espermidina deriva da putrescina após a

adição de um grupo propilamina derivado da S-adenosilmetionina (SAM) descarboxilada pela ação da espermidina sintase. A espermidina é similarmente convertida para espermina pela enzima espermina sintase que adiciona um segundo grupo propilamina proveniente da SAM pela espermidina (MARTON; PEGG, 1995; LARQUÉ; SABATER-MOLINA; ZAMORA, 2007). Em vegetais, a síntese das poliaminas podem ocorrer tanto via agmatina quanto via ornitina. Para a formação da espermidina e espermina, um grupo aminopropil derivado da metionina via SAM é adicionado à putrescina para formar a espermidina e esta última, para formar a espermina (BARDÓCZ, 1995; LIMA; GLÓRIA, 1999). Nos tecidos, as poliaminas são submetidas às reações de interconversão e acetilação. Além disso, as células podem sintetizar suas próprias poliaminas a partir da ornitina, um aminoácido ativo envolvido no ciclo da ureia no fígado (ELIASSEN *et al.*, 2002; HILLARY; PEGG, 2003; LARQUÉ; SABATER-MOLINA; ZAMORA, 2007).

Figura 8 - Síntese de poliaminas.



Abreviações: ODC, ornitina descarboxilase; ADC, Arginina descarboxilase; SpdS, espermidina sintase; SpmS, espermina sintase; SMDC, S-adenosilmetionina descarboxilase; SAM, S-adenosilmetionina descarboxilada.

Fonte: Glória (2006)

Inicialmente, havia a hipótese de que as poliaminas eram produzidas somente *in situ* uma vez que todas as células são capazes de sintetizá-las, entretanto, foi observado que em alguns casos, a capacidade das células e órgãos de sintetizarem as poliaminas foi insuficiente para satisfazer os requerimentos totais do organismo. Desta forma, para os processos metabólicos, a síntese de poliaminas por meio da ingestão direta de poliaminas

presente nos alimentos e também através da microbiota bacteriana residente no trato gastrointestinal dos indivíduos, são de fundamental importância (BARDÓCZ, 1995; MEDINA *et al.*, 2003; KALAČ; KRAUSOVÁ, 2005).

3.2.2.1 Aspectos toxicológicos e utilização como critério de qualidade

As aminas bioativas são substâncias importantes para dieta humana, pois desempenham funções fisiológicas essenciais. Assim sendo, as aminas geralmente não apresentam risco à saúde humana. Entretanto, quando ingeridas em elevadas concentrações ou quando o sistema de catabolismo das aminas é inibido, podem causar efeitos tóxicos (HALÁSZ *et al.*, 1994; SILLA-SANTOS, 1996). Segundo Glória (2006) as aminas são rapidamente metabolizadas no organismo por conjugação, ou mediante reações de oxidação por enzimas aminoxidases, como as monoaminoxidases (MAO), as diaminoxidases (DAO) e as poliaminoxidases (PAO), sendo que a inibição do sistema de catabolismo pode ocorrer por questões genéticas ou pelo uso de medicamentos inibidores destas enzimas catabolizadoras.

Na avaliação de risco de aminas biogênicas realizada pela Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA), foi verificado que quantidades elevadas de aminas biogênicas em alimentos são indesejáveis do ponto de vista de segurança e podem ser responsáveis pelo desencadeamento de distúrbios de saúde, sendo que a histamina é a amina biogênica mais comumente associada a esses distúrbios (EFSA, 2011).

O desencadeamento de sintomas após consumo excessivo de histamina foi descrito pela primeira vez há mais de 60 anos. Inicialmente, foi atribuído como uma intoxicação por consumo de peixes escombrídeos, pois os sintomas surgiram principalmente após o consumo de peixes das famílias *Scombridae* e *Scomberesocidae* (atum, sardinha, cavala, arenque, anchova, etc.) que possuem naturalmente elevado teor de histidina. Entretanto, a Organização Mundial da Saúde (OMS) tem recomendado o uso do termo envenenamento por histamina ou intoxicação por histamina, uma vez que outros alimentos também podem estar envolvidos. Além disso, há alguns anos outro distúrbio foi descrito, denominado de intolerância à histamina, que também foi relacionado à histamina, decorrente da falha da enzima DAO em metabolizar a histamina no intestino (OMS, 2013; COMAS-BASTÉ, 2019).

A intoxicação por histamina tem ocorrido na forma de surto, sendo que a manifestação do efeito tóxico ocorre com sintomas cutâneos (urticária, edema e inflamação localizada); gastrointestinais (náusea, vômito, diarreia e dores abdominais); e sintomas hemodinâmicos (hipotensão, dor de cabeça, palpitação, formigamento e rubor) (SHALABY,

1996; LIMA; GLÓRIA, 1999; LAVON; LURIE; BENTUR, 2008). Entretanto, outras aminas, como por exemplo a tiramina, a triptamina e a β -feniletilamina também podem estar associadas a causa de intoxicação alimentar ou ainda, potencializar o efeito tóxico da histamina, como é o caso da putrescina e cadaverina (Tabela 2) (GLÓRIA, 2006).

Tabela 2 - Efeitos tóxicos das aminas bioativas

Efeitos Tóxicos	Aminas Envolvidas	Sintomas
Intoxicação Histamínica	Histamina (efeito tóxico potencializado pela putrescina, cadaverina, espermina, triptamina, tiramina, feniletilamina e álcool)	Gastrointestinal: náusea, vômito, diarreia, cólica abdominal Neurológico: dor de cabeça pulsante, palpitação, rubor facial e no pescoço, coceira, pulsação rápida e fraca, tontura, fraqueza e formigamento Hemodinâmico: hipotensão, dilatação capilar Cutâneo: erupção, urticária, edema, inflamação localizada Casos severos: bronco espasmo, sufocação, dificuldade de respiração
Intoxicação por Tiramina	Tiramina	Dor de cabeça, febre, aumento na pressão sanguínea, vômito, transpiração, dilatação da pálpebra e pupilas, salivação, lacrimação, respiração aumentada, palpitação e dispneia
Reação com queijo ou crise hipertensiva (associada a pacientes medicados com MAOI ¹)	Tiramina Feniletilamina	Crise hipertensiva, dor de cabeça severa, hemorragia cerebral, insuficiência cardíaca, edema pulmonar, alterações na visão, palpitação, náusea, vômito, contração muscular, excitação, confusão mental, pressão sanguínea alta, febre e transpiração
Enxaqueca	Tiramina Feniletilamina Triptamina Serotonina	Dor de cabeça pulsante e ataque de enxaqueca

¹ MAOI – inibidor da monoaminoxidase.

Fonte: Adaptado de Glória (2006)

A determinação dos limites de ingestão de aminas biogênicas é uma tarefa difícil, uma vez que seus efeitos tóxicos dependerão da presença de compostos moduladores e da eficiência dos mecanismos de detoxificação de cada indivíduo, porém, há alguns estudos que relataram sobre os níveis adversos à saúde para determinadas aminas (EC, 2005; 2013; FDA, 2011; LADERO *et al.*, 2010).

A intoxicação histamínica, especificamente em pescados, pode ocorrer quando o teor dessa amina atinge 500 mg kg⁻¹ (EVANGELISTA, 2010). De acordo com Silva *et al.* (2011), alguns países tem estabelecido limites toleráveis para histamina em peixes e produtos da pesca. A União Europeia por meio do Regulamento (EC) nº 2073/2005 sobre

critérios microbiológicos estabeleceu que em produtos da pesca de espécies com um conteúdo de histidina naturalmente alto (particularmente peixes das famílias *Scombridae*, *Clupeidae*, *Engraulidae*, *Coryphaenidae*, *Pomatomidae* e *Scomberesocidae*), usando um plano de amostragem de nove amostras, o teor médio de histamina não deve ultrapassar 100 mg kg^{-1} ; duas amostras podem ter um valor maior do que 100 mg kg^{-1} mas inferior a 200 mg kg^{-1} e nenhuma amostra deve ter um valor de 200 mg kg^{-1} , sendo que a análise deve ser realizada e quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência. Em produtos de pesca obtidos de espécies com elevado conteúdo de histidina e submetidos a tratamento de maturação enzimática em salmoura, o valor médio máximo permitido é de 200 mg kg^{-1} , o valor individual máximo é de 400 mg kg^{-1} e só pode haver duas amostras entre estes dois valores em um plano de amostragem de nove amostras (EC, 2005; 2013). O FDA, utilizando um plano de amostragem de 18 amostras, estabeleceu um nível máximo tolerável de 50 mg kg^{-1} de histamina para atum e mahi-mahi ou entre 50 e 500 mg kg^{-1} de histamina para outras espécies de peixes, com apenas uma amostra maior do que esses valores (FDA, 2011). No Canadá, na Suíça e no Brasil, o limite máximo permitido para peixe e nos produtos da pesca é de 100 mg kg^{-1} e na Austrália e Nova Zelândia o limite máximo permitido é de 200 mg kg^{-1} (BIJI *et al.*, 2016).

Quanto as demais aminas, uma dose de 10 mg de tiramina, por exemplo, tem sido associada com enxaqueca, no entanto níveis de 6 mg podem causar enxaqueca nos pacientes em tratamento com drogas inibidoras de MAO. Similarmente a tiramina e a feniletilamina podem causar dores de cabeça após ingestão de 3 mg, em indivíduos suscetíveis (COSTA; GLÓRIA, 2003).

Segundo o FDA (2011), as bactérias formadoras de histaminas são capazes de se desenvolverem e produzirem esta amina dentro de uma ampla faixa de temperatura. Contudo, o acúmulo deste composto é mais rápido sob altas temperaturas ($21,1 \text{ }^\circ\text{C}$ ou mais) se comparado com temperaturas médias de $7,2 \text{ }^\circ\text{C}$. O acúmulo de histamina é particularmente mais rápido em temperaturas ao redor dos $32,2 \text{ }^\circ\text{C}$, sendo mais comum quando proveniente de um armazenamento sob abuso de temperatura do que aquele armazenado por longo período de tempo. A deterioração à baixa temperatura está frequentemente relacionada à decomposição que pode ser detectável sensorialmente. Uma vez presente no peixe, a enzima histidina-descarboxilase continua a produzir a histamina, mesmo após a inativação das bactérias que a produziu, pois a enzima pode permanecer estável em condições de congelamento e pode ser reativada rapidamente após o descongelamento. Portanto, foi demonstrado que é importante a adoção de boas práticas de fabricação em indústrias de pescados para fornecer produtos seguros para a população.

As aminas são resistentes ao tratamento térmico aplicado durante o processamento de alimentos. Desta forma, as presenças de mono, di e poliaminas em alimentos *in natura* e processados têm sido utilizados como bons indicadores do frescor, da deterioração e do grau de qualidade destes alimentos, pois refletem a qualidade da matéria-prima e das condições higiênicas de processamento (MARTÍNEZ-VILLALUENGA *et al.*, 2008).

3.2.2.2 Ocorrência em alimentos

As aminas bioativas são inerentes aos organismos vivos e, portanto, todos os tipos de alimentos, originários de plantas ou animais, contêm putrescina, espermina e espermidina. Além desses compostos mais comuns, outras aminas também podem ocorrer naturalmente, sendo que a quantidade e o tipo de aminas presentes nos alimentos dependem de sua natureza e origem. Contudo, a quantidade e tipo de aminas bioativas podem ser alterados durante a produção, processamento, fermentação e armazenamento, além de serem afetadas pelas condições higiênico-sanitárias (GLÓRIA, 2006). Altos níveis de aminas biogênicas têm sido apontados em peixes e produtos de peixe, carnes e produtos cárneos, alimentos e bebidas fermentadas (lácteos, queijos, cerveja e vinho) (LORET; DELOYER; DANDRIFOSSE, 2005).

Os produtos de origem vegetal tem concentrações significativas de poliaminas, espermina e espermidina, como também das precursoras putrescina e agmatina, sendo que a espermidina é a predominante, seguida de putrescina e pouca espermina. A concentração de aminas nos tecidos vegetais é influenciada por fatores como grau de maturação, luz e temperatura, sendo que a maior concentração de aminas nos frutos ocorre nos primeiros estádios de desenvolvimento e declina até o completo amadurecimento (MORET *et al.*, 2005). Silva (2004) determinou em dez variedades de frutas o teor e o perfil de aminas bioativas, sendo que estas foram constituídas de putrescina, histamina, tiramina, serotonina, agmatina e predominância de espermidina e espermina.

Em tecidos animais, a poliamina espermina é a predominante e em vegetais, a espermidina é a predominante. As carnes vermelhas e a carne de frango contêm maior quantidade de espermina. Ainda, com relação aos produtos de origem animal, os ovos de galinha, possuem baixo teor de poliaminas. Em condições fisiológicas normais, os peixes contêm altos níveis de espermina e espermidina e baixos níveis de histamina e putrescina, entretanto conforme as condições de armazenamento (temperatura, oxigênio, pH) pode haver formação de cadaverina, tiramina, triptamina, feniletilamina e aumento de histamina (BARDÓCZ, 1995; GLÓRIA, 2006; KALAČ; KRAUSOVÁ, 2005).

Na soja e seus produtos foi descrita a presença de diferentes aminas bioativas, como putrescina, cadaverina, agmatina, tiramina, triptamina, histamina, espermina e espermidina (OKAMOTO *et al.*, 1997; KIM *et al.*, 2004; GLÓRIA *et al.*, 2005; KALAČ *et al.*, 2005; NISHIMURA *et al.*, 2006; NISHIBORI; FUJIHARA; AKATUKI, 2007; SAAID *et al.*, 2009). Sendo que Toro-Funes *et al.* (2015a) investigaram dez produtos de soja, sendo quatro não fermentados (tofu macio, tofu duro, extrato e brotos de soja) e seis fermentados (natto, tempeh, miso, tamari, molho de soja, pasta de soja, sufu). Foi observada nos produtos não fermentados, somente a presença de cadaverina, putrescina, espermidina, e espermina e nos produtos fermentados, além destas aminas, foi observada também a presença de tiramina, histamina, triptamina e feniletilamina.

3.3 EXTRATO DE SOJA

A utilização da soja como alimento para consumo humano varia conforme o país e atualmente, há disponibilidade de muitos tipos de produtos derivados de soja. Na Ásia, a soja tem sido utilizada na produção de alimentos tradicionais, enquanto que nos países ocidentais tem sido utilizada como ingrediente no processamento de alimentos. Alguns produtos de soja são produzidos em grande escala à partir do uso de técnicas modernas de processamento, ao passo que outros produtos são produzidos em menor escala e de maneira tradicional, conforme as técnicas orientais de processamento. Os alimentos de soja tradicionais, também são conhecidos como alimentos de soja orientais ou “Oriental Soyfoods”, têm sua origem na China e em outros países do Extremo Oriente e são produzidos há milhares de anos e ainda, são considerados como alimentos populares (LIU, 1997; LIU, 2004; LIU, 2008; RAGHUVANSHI; BISHT, 2010).

Em geral, os alimentos de soja tradicionais são classificados em duas categorias: não fermentados e fermentados. Os não fermentados incluem o extrato de soja, tofu, brotos de soja, yuba (película de extrato de soja), okara (resíduo de extrato de soja), soja verde, kinako (grãos de soja torrados ou farinha de soja torrada), enquanto que os fermentados incluem principalmente o shoyu (molho de soja), miso (pasta de soja fermentada), natto (grãos de soja fermentados), tempeh (cotilédones de soja fermentados), iogurte de soja (extrato de soja fermentado), sufu (tofu fermentado) e nuggets de soja (grãos inteiros fermentados) (LIU, 1997; LIU, 2004; LIU, 2008; RAGHUVANSHI; BISHT, 2010).

O extrato de soja é o produto resultante da extração aquosa de vários constituintes da soja, tais como lipídios, proteínas, carboidratos, minerais e outros componentes

e possui aparência e composição similar ao leite animal (LIU, 2008; JINAPONG; SUPHNTHARIKA; JAMNONG, 2008; RINGGENBERG; CORREDIG; ALEXANDER, 2012). Dependendo da proporção de soja:água utilizada no processamento, o extrato de soja pode apresentar em base úmida, 3,6% de proteínas, 2,0 a 3,2% de lipídios, 2,9 a 3,9% de carboidratos e 0,5% de cinzas (LIU, 2008).

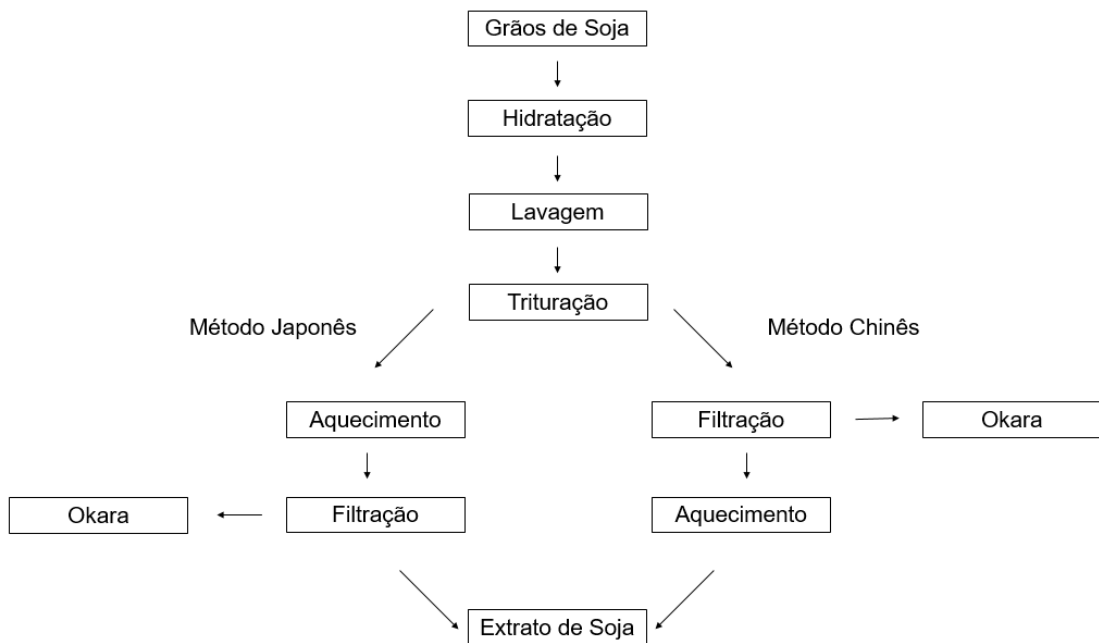
O padrão de identidade e qualidade para o extrato de soja foi estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) por meio da resolução CNNPA nº 14, de 28 de junho de 1978. Nesta resolução, o extrato de soja é definido como o produto obtido a partir da emulsão aquosa resultante da hidratação dos grãos de soja, convenientemente limpos, seguido de processamento tecnológico adequado, adicionado ou não de ingredientes opcionais permitidos, podendo ser submetido à desidratação, total ou parcial. O extrato de soja em pó quando na forma de emulsão aquosa, constitui uma fonte de proteínas e pode ser usado como alimento ou ingrediente para elaboração de alimentos (ANVISA, 1978). De maneira complementar, a resolução RDC nº 268, de 22 de setembro de 2005, estabelece que o extrato em pó deve conter no mínimo 40,0 % de proteínas em base seca e o extrato líquido, no mínimo 3,0 % (g/100 g) de proteínas (ANVISA, 2005).

O extrato de soja é uma bebida proteica muito apreciada em países asiáticos e seu consumo tem aumentado nos países ocidentais devido aos aspectos positivos para a saúde (CHEN *et al.*, 2014; TORO-FUNES *et al.*, 2014a,b; MA *et al.*, 2015). Além dos benefícios nutricionais atribuídos aos fitoquímicos presentes nos grãos de soja, incluindo elevadas quantidades de isoflavonas, o extrato de soja é um alimento adequado para pessoas com intolerância a lactose, alergia as proteínas do leite ou vegetarianos e estes fatores tem contribuído significativamente para o aumento de consumo deste produto (GOLBITZ; JORDAN, 2006; REILLY *et al.*, 2006; LIU, 2008; SINGH; VIJ; HATI, 2014).

O extrato de soja, conhecido em inglês como “soymilk”, é considerado tanto um produto final, pronto para consumo, como um produto intermediário para a fabricação de iogurte de soja (extrato de soja fermentado), tofu (constituído por coágulos ou proteínas precipitadas de soja) e sufu (tofu fermentado). A concentração de sólidos totais e em especial de proteínas solúveis no extrato de soja é importante quando se visa a elaboração de tofu com bom rendimento e qualidade sensorial (aparência, cor, aroma, sabor e textura) (LIU, 2008).

Segundo Liu (1997 e 2008) há dois métodos tradicionais de obtenção de extrato de soja: o método chinês (nama-shiboril) e o método japonês (semi-kanetsu-shiboril) e as principais etapas do processamento são apresentadas na Figura 9. Em ambos os métodos, os grãos são hidratados por aproximadamente 12 h e triturados em água a temperatura ambiente. No método chinês, a massa da soja triturada é filtrada e o extrato obtido é aquecido até ferver a $98\text{ }^{\circ}\text{C}$, enquanto que no método japonês, a massa de soja triturada é aquecida até ferver a $98\text{ }^{\circ}\text{C}$ e depois filtrada. Após a filtração, obtém-se o extrato de soja (filtrado) e o okara (resíduo) (LIU, 1997; LIU, 2008).

Figura 9 - Etapas do processamento de obtenção do extrato de soja segundo os métodos Japonês e Chinês.



Fonte: Adaptado de Liu (1997 e 2008)

Os extratos de soja obtidos pelos dois métodos diferem no conteúdo de sólidos totais, devido ao aquecimento da massa antes da filtração que modifica a solubilidade dos componentes da soja (TODA; CHIBA; ONO, 2007) e portanto, a maioria dos estudos utilizam o método chinês para obtenção do extrato de soja (TORO-FUNES *et al.*, 2014a; BAÚ; IDA, 2015; XIAODI *et al.*, 2015; FENG *et al.*, 2016). Dentre os métodos utilizados como referência para elaboração do extrato de soja, há o método desenvolvido e descrito pela Embrapa (2005b) e pelo National Soybean Research Laboratory (NSRL) de Illinois (2012). No método da Embrapa (2005b), os grãos de soja são macerados a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 12 h em solução a

0,5% de bicarbonato de sódio e em seguida são cozidos a 100 °C por 10 min em solução a 0,25% de bicarbonato de sódio enquanto que no método do NSRL (2012) os grãos de soja são macerados por duas vezes a 100 °C por 5 min em solução de 0,25% de bicarbonato de sódio.

Vários são os fatores que afetam a composição e o rendimento do extrato de soja, entre os principais estão a cultivar de soja, tempo e condições de maceração dos grãos, proporção soja:água, trituração, filtração antes ou depois do tratamento térmico, tempo e temperatura do tratamento térmico, além do emprego de outras etapas como utilização de enzimas, fermentação e outros (DONKOR; SHAH, 2008; JUNG; MURPHY; SALA, 2008). Considerando a importância destes fatores para obtenção de extratos de soja com características desejáveis, a seguir, serão descritas as principais etapas de obtenção do extrato de soja e como estas etapas influenciam na composição do produto.

As cultivares de soja com características apropriadas para produção de extratos podem ser selecionadas em função do teor de proteínas, rendimento e características sensoriais para melhorar o rendimento e as propriedades do produto. Ma *et al.* (2015) avaliaram a influência de 70 genótipos de soja e verificaram que as características químicas distintas dos genótipos afetaram as propriedades sensoriais do extrato de soja, e portanto, cultivares de soja com determinadas características devem ser selecionadas para produção de extratos de soja. Nesse sentido, a Embrapa Soja implementou um programa de melhoramento genético visando desenvolver cultivares com características especiais para alimentação, como é o caso da BRS 257 que é isenta das enzimas lipoxigenases e por isso, apresenta sabor menos acentuado (EMBRAPA, 2005a).

A etapa de branqueamento, ou seja, a imersão dos grãos de soja em água em ebulição para inativar enzimas e reduzir a carga microbiana pode ou não ser utilizada no processamento para obtenção do extrato de soja (GOWEN *et al.*, 2007). Quando utilizada, o branqueamento é geralmente realizado antes da etapa de maceração dos grãos. O branqueamento neste caso, visa principalmente a inativação das enzimas lipoxigenases que está associada à formação do *beany flavor*, cuja característica de sabor é proveniente da peroxidação de ácidos graxos poli-insaturados. Esta reação é catalisada pelas enzimas lipoxigenases e resulta na formação de vários compostos voláteis, incluindo as cetonas, aldeídos e álcoois, sendo o hexanal o principal responsável pelo sabor de “feijão cru” (SILVA *et al.*, 2010; LV *et al.*, 2011).

A maceração ou hidratação dos grãos de soja é uma etapa muito importante e utilizada para promover o amaciamento dos grãos e, conseqüentemente, facilitar seu cozimento e trituração. A proporção entre os grãos de soja e água de maceração e o tempo utilizado nesta etapa, varia de acordo com os diferentes autores, sendo geralmente de 1:3 a 1:5 (soja:água) e 3

a 16 h em água ou solução contendo bicarbonato de sódio (VISHWANATHAN; SINGH; SUBRAMANIAN, 2011; STANOJEVIC *et al.*, 2012). A maceração dos grãos tem sido utilizada para reduzir ou aumentar o teor de compostos de interesse. Lima e Ida (2014) verificaram que a maceração dos grãos de soja em temperaturas próximas a 55 °C por 6 h pode estimular a atividade de β -glicosidase endógena da soja, e dessa forma, favorecer a conversão de isoflavonas na forma de β -glicosídeos em agliconas.

A trituração dos grãos visa o rompimento das células vegetais para liberar os corpos proteicos e lipídicos na água, obtendo assim, um homogenato com elevado teor de proteínas e que pode ser facilmente separado do resíduo (RIAZ, 2006). A trituração pode ser realizada com diferentes equipamentos e condições de tempo, proporção grãos de soja:água e temperatura que podem variar entre 1 a 5 min, 1:6 a 1:10 e 25 a 100 °C, respectivamente (RIAZ, 2006; JUNG; MURPHY; SALA, 2008). Assim, como ocorre na maceração, a trituração dos grãos de soja em água pode favorecer a ação da β -glicosidase endógena da soja que hidrolisa as isoflavonas na forma de β -glicosídeos, reduzindo o seu teor e aumentando o teor das agliconas correspondentes (LIMA; IDA, 2014).

A separação do resíduo do extrato de soja tem como objetivo eliminar o material insolúvel do produto, podendo ocorrer antes ou após o tratamento térmico. Essa etapa pode ser realizada por meio de centrifugação ou filtração em materiais do tipo malha, com diferentes porosidades, que pode afetar a composição do produto em função da quantidade de sólidos totais do extrato (JUNG; MURPHY; SALA, 2008; STANOJEVIC *et al.*, 2012). O resíduo obtido após a filtração do extrato de soja, é denominado de okara, e apesar de se tratar de um produto de baixo valor comercial, muitos dos componentes nutritivos da soja ainda são mantidos. Em geral, o okara contém 55,5% de fibras, 30% de proteínas, 8,5% de lipídios, 3,8% de carboidratos e 3,0% de cinzas em base seca, podendo ainda conter aproximadamente um terço do total de isoflavonas, além de saponinas, fitatos e outros compostos (VILLANUEVA *et al.*, 2010; LU *et al.*, 2013).

O tratamento térmico empregado no processo de obtenção do extrato de soja visa aumentar a validade do produto por eliminar microrganismos, e pode inativar fatores antinutricionais presentes na soja, como os inibidores de proteases e lectinas (TORO-FUNES *et al.*, 2015b). O tratamento térmico convencional geralmente é realizado entre 90 e 100 °C e de 5 a 30 min, entretanto este binômio tempo-temperatura varia de acordo com diferentes autores, podendo ainda ser utilizado o método UHT (*Ultra-High Temperature*) como no caso da indústria de alimentos (KAO *et al.*, 2004; JUNG; MURPHY; SALA, 2008). Durante o tratamento térmico do extrato pode ocorrer a reação de *Maillard*, que acarreta perda da

qualidade nutricional por reduzir a disponibilidade de lisina, e ainda modificar alguns componentes, como as proteínas e isoflavonas. Segundo Jackson *et al.* (2002), as isoflavonas malonilglicosídeos são termicamente instáveis e seu teor diminui com a intensidade do tratamento térmico, aumentando o teor dos β -glicosídeos ou acetilglicosídeos correspondentes. Entretanto, foi demonstrado que as isoflavonas agliconas apresentaram estabilidade térmica a 100 °C por até 30 min (KAO *et al.*, 2004).

Diferentes métodos têm sido utilizados na elaboração do extrato de soja com o intuito de melhorar a qualidade do produto e aumentar o teor de compostos bioativos. Torofunes *et al.* (2014a) investigaram os efeitos do tratamento por homogeneização a ultra alta pressão (HUPH) sobre os compostos bioativos do extrato de soja, e concluíram que a HUPH foi capaz de aumentar significativamente o teor total de fitoesteróis (de 190.77 mg L⁻¹ para 224.53-266.80 mg L⁻¹) e isoflavonas (de 149.42 mg L⁻¹ para 159.83-191.62 mg L⁻¹), sendo que esse aumento foi proporcional ao aumento de pressão e temperatura no tratamento. Observaram também uma significativa redução no teor total de tocoferóis e inalteração do conteúdo das poliaminas, espermidina e espermina.

Baú e Ida (2015) otimizaram a conversão de isoflavonas β -glicosídeos em isoflavonas agliconas no processo de obtenção do extrato de soja. A hidratação dos grãos de soja por 14 h a 5 °C na proporção de 1:3 (soja:água, peso:volume), homogeneização na proporção de 1:8 (soja hidratada:água, peso:volume) e incubação do homogenato a 50 °C por 2,7 h promoveu uma máxima conversão de isoflavonas β -glicosídeos em isoflavonas agliconas no extrato de soja.

3.4 APLICAÇÃO DE ENZIMAS PARA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS

A parede celular dos vegetais é uma zona de fronteira entre cada célula e morfologicamente é dividida em três camadas, a lamela média, a parede celular primária e a parede celular secundária. A composição da parede celular, forma e tamanho dependem das funções das células dos tecidos dos vegetais. As principais funções das células são: conferir a rigidez, controlar o transporte intracelular, armazenar as reservas alimentares e proteger contra os ataques de insetos e agentes patogênicos (ZHONG; YE, 2007).

A primeira parede da célula a ser formada é a parede celular primária que se deposita sobre cada lado da lamela média utilizando as células adjacentes e recobre a membrana plasmática. A parede celular primária é constituída por três estruturas independentes, as microfibrilas de celulose, os polissacarídeos não-celulósicos (pectina e hemicelulose) e as

proteínas estruturais. A lamela média é composta por substâncias pécticas que mantêm as paredes primárias juntas com as células adjacentes, sendo então denominadas de substâncias intercelulares. Quando o crescimento celular é finalizado, acontece a formação da parede secundária, que é constituída por 40% de celulose (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007).

A celulose, principal componente de sustentação das estruturas vegetais, é um homopolímero de moléculas de glicose unidas por ligações glicosídicas β (1-4). As moléculas de celulose paralelas e adjacentes estão interligadas, por meio de pontes de hidrogênio formando as microfibrilas que são muito resistentes. Assim, as fibras de celulose são formadas por regiões cristalinas e amorfas. A porção hidrolisável por enzimas é denominada de região amorfa e a porção resistente é constituída pela sua porção cristalina. A celulose nativa difere em sua cristalinidade quanto à localização na parede celular, sendo que a camada secundária é constituída por celulose altamente cristalina enquanto que a camada primária é constituída principalmente por celulose amorfa (WALDRON; PARKER; SMITH, 2003; BEMILLER; HUBER, 2010).

A hemicelulose é definida como um grupo heterogêneo de polissacarídeos ramificados que se ligam firmemente via pontes de hidrogênio à superfície das microfibrilas de celulosas e entre si. Os polímeros das hemicelulosas são formados por vários resíduos de açúcares que estão ligados entre si por ligações glicosídicas β (1-4) formando uma estrutura principal constituída por um tipo específico de resíduos, a partir da qual surgem as ramificações laterais de cadeias curtas de outros açúcares. Assim, de acordo com o açúcar predominante na cadeia principal e na ramificação lateral, estes polímeros de hemicelulosas são classificados em xilanas, galactomananas, arabinoxilanas, galactosanas, ramnogalactosanas. Nos vegetais, as hemicelulosas estão presentes em todas as camadas da parede celular e concentram-se principalmente nas camadas primária e secundária, onde estão intimamente associadas à celulose e lignina. A xilana é o principal polissacarídeo componente das hemicelulosas (WALDRON; PARKER; SMITH, 2003; BRECHT *et al.*, 2010).

Ainda, a parede celular de vegetais contém proteínas estruturais, sendo a extensina a principal glicoproteína, a qual é constituída por hidroxiprolina e outros aminoácidos, como a lisina, serina e tirosina. Essas proteínas são capazes de se ligar covalentemente por meio de intra e intermoléculas com os demais constituintes da parede celular (WALDRON; PARKER; SMITH, 2003).

A degradação dos principais polímeros constituintes da parede celular dos vegetais, ocorre com a participação de enzimas. As enzimas são proteínas especializadas em catalisar as reações bioquímicas e atuam tornando possível uma nova reação com menor energia

de ativação. Isso significa que as enzimas simplesmente pela sua presença e sem o seu consumo durante o processo, conseguem acelerar os processos bioquímicos (KIRK; BORCHERT; FUGLSANG, 2002; PARKIN, 2010).

As celulasas são enzimas que promovem a degradação das celulosas, via ação hidrolítica que catalisam a quebra das ligações glicosídicas β (1-4) entre os resíduos de D-glicose da molécula de celulose ou de seus derivados solúveis. O complexo celulolítico das celulasas envolve principalmente quatro enzimas: endoglucanases, exoglucanases, celobiasas e exoglucosidases (ARANTES; SADDLER, 2010).

As mananases e xilanases são enzimas que degradam os terminais dos dois componentes principais da hemicelulose, enquanto que as β -xilosidases e β -manosidases, ainda degradam mais os xilo-oligossacarídeos. As α -arabinosidases e α -galactosidases liberam as moléculas de arabinose e galactose, enquanto que a acetil xilano esterase cliva os grupos acetil das unidades de açúcar de xilana (JUHÁSZ *et al.*, 2005).

Em processos biotecnológicos, o uso de enzimas é vantajoso, devido dentre outras razões, as enzimas são específicas, não necessitam de temperaturas elevadas para a reação e não formam subprodutos indesejáveis. Portanto, na indústria alimentícia, as enzimas são consideradas como suplementos nutricionais e têm sido utilizadas como coadjuvantes tecnológicos para aumentar o valor biológico de certos alimentos (KIRK; BORCHERT; FUGLSANG, 2002; DUEÑAS; HERNÁNDEZ; ESTRELLA, 2007).

Em geral, as enzimas comerciais são misturas e utilizam substratos complexos. Assim, o uso de enzimas puras é de grande interesse devido as suas propriedades catalíticas e especificidades sobre um determinado substrato. O resultado da ação da enzima depende das reações bioquímicas durante o tratamento, de modo que o substrato deve ser cuidadosamente identificado e caracterizado; e as reações devem ocorrer sob certas condições de pH, temperatura e tempo para cada tipo de enzima (DUEÑAS; HERNÁNDEZ; ESTRELLA, 2007).

A utilização de celulasas e hemicelulasas na biotecnologia começou no início de 1980, para melhorar a qualidade da alimentação animal e somente depois, já a partir de 1990 que foram aplicadas em alimentos, especialmente na produção de cerveja e vinho, bem como na indústria têxtil e de papel e celulose (BHAT, 2000). As carboidrases tem sido utilizadas como ferramenta para extração de proteínas de matérias-primas vegetais, embora os polissacarídeos da parede celular de vegetais podem limitar o acesso das enzimas à nutrientes. As carboidrases são capazes de desintegrar os tecidos da parede celular pela hidrólise das ligações entre os polissacarídeos, liberando xilose, hemicelulose, celulose e outros

componentes intercelulares, como as proteínas (LIU, 2004).

A efetividade de três complexos de carboidrases para a extração de proteínas de farelo de arroz desengordurado foi avaliada por Tang *et al.* (2003) e observaram que foi possível extrair 45,4%, 28,5%, e 12,1% de proteínas utilizando as enzimas amylases, viscozyme e celluclast, respectivamente, nas condições ótimas de pH e temperatura. A otimização da extração com 58,4% de proteínas foi obtida quando utilizaram 87637 unidades de amylase, 17:1 de proporção água:farelo de arroz, 50,9 °C e 4,5 h de extração.

Kasai *et al.* (2004) investigaram a digestão *in vitro* de okara utilizando diferentes enzimas, tais como proteases, celulasas, glucanase, hemicelulasas, pectinases. Concluíram que as celulasas foram capazes de aumentar a digestão da parede celular primária do okara, e quando empregou a agitação e autoclavagem, a digestão se tornou ainda mais eficaz. Apenas duas enzimas, a Pectinex SP Ultra de *Aspergillus aculeatus* e a pectolyase de *A. japonicus* conseguiram digerir o restante das paredes celulares secundárias do okara.

A aplicação de enzimas também tem sido utilizada para aumentar os níveis de compostos bioativos em alimentos. Dueñas, Hernández e Estrella (2007) investigaram o efeito das enzimas tannases, α -galactosidases, phytases e viscozymes sobre os compostos fenólicos da farinha de lentilha e demonstraram as modificações ocorridas. Foi observado que houve diminuição dos compostos hidroxicânicos e proantocianidinas, aumento da quercetina 3-O rutinosídeo e luteolina e formação de trans-resveratrol e ácido gálico nas farinhas tratadas com as enzimas. Ainda, observaram que a atividade antioxidante aumentou nas farinhas tratadas com viscozymes, α -galactosidases e tannases e diminuiu na farinha tratada com fitases.

O pré-tratamento enzimático com Viscozyme L em farelo de aveia para aumentar a extração de proteínas utilizando a metodologia de superfície de resposta foi investigado por Guan e Yao (2008). A condição ótima de extração de 55,7% de proteínas ocorreu quando se utilizou a concentração de Viscozyme L de 30 FBG / 10 g de farelo de aveia, pH 4,6, 2,8 h de incubação a 44 °C. O método do pré-tratamento enzimático do farelo de aveia foi comparado com o método alcalino (pH 9,5) e foi observado que o método enzimático extraiu 56,2% de proteínas e foi significativamente maior do que o método alcalino que extraiu somente 14,8% de proteínas.

A hidrólise enzimática dos carboidratos do farelo de canola para aumento do seu conteúdo de proteínas foi avaliada por Rodrigues, Carvalho e Rocha (2010). Três complexos de carboidrases comerciais, Viscozyme L, Pectinex Ultra SP-L e Celluclast 1.5L foram utilizados e foi observado que os melhores resultados para extração de proteínas foram obtidos utilizando Viscozyme L, sendo o conteúdo de proteínas do farelo de canola aumentou

de 41% a 68%, confirmando assim o forte potencial de aplicação desse complexo enzimático.

O uso de Celluclast 1.5L na extração de proteínas de folhas de oliveiras foi investigado por Vergara-Barberán *et al.* (2015). Descreveram que estas enzimas promoveram a quebra dos materiais da parede celular tornando os materiais intracelulares mais acessíveis e portanto, melhorou a extração de proteínas. Este método de extração assistida por enzimas foi rápido e utilizou menos solventes do que os métodos não enzimáticos.

O efeito da extração assistida por dois complexos enzimáticos, Pronase e Viscozyme, sobre os compostos fenólicos de subprodutos da indústria de vinho (cv. *Tempranillo*) foi avaliado por De Camargo *et al.* (2016). Observaram que ambos complexos aumentaram a extração de compostos fenólicos solúveis. Sendo que com a Viscozyme o ácidos gálico, bem como catequina, epicatequina, isoramnetina e dímero de prodelfinidina A foram melhor extraídos em comparação com Pronase. Além disso, os ácidos p-cumárico e cafeico, bem como o dímero de procianidina B foram extraídos com Viscozyme, porém não foram extraídos com Pronase.

3.5 APLICAÇÃO DE ULTRASSOM PARA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS

O ultrassom é definido como uma onda sonora com frequência que excede o limite de audição humana (~20 kHz). Quando a energia sonora passa para o meio, resulta em movimentos de ondas contínuas e com o movimento, cria-se a compressão e rarefação das partículas do meio gerando as ondas longitudinais. Dependendo da frequência utilizada e da amplitude da onda aplicada, alguns efeitos físicos, químicos e bioquímicos podem ser observados e assim, permite uma variedade de aplicações (KNORR *et al.*, 2004; CÁRCEL *et al.*, 2012).

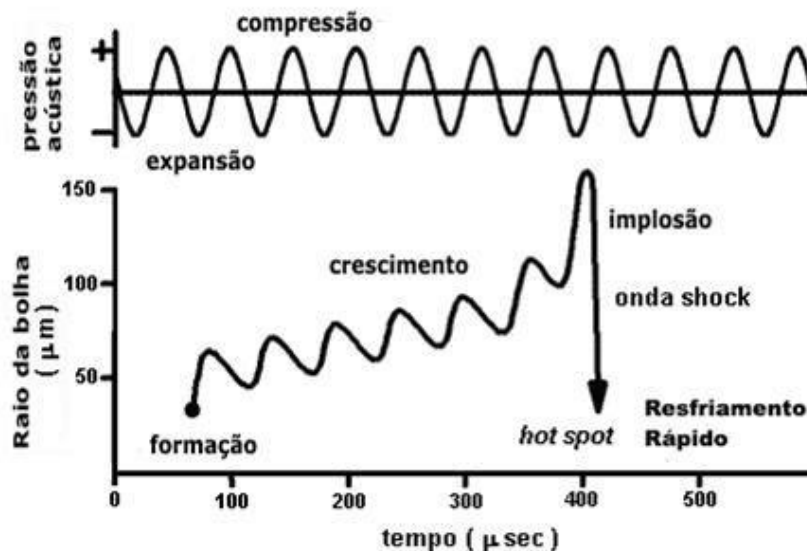
O uso de ultrassom na indústria alimentícia tem sido objeto de investigações no desenvolvimento de vários processos. As técnicas de ultrassom são relativamente de baixo custo, simples e requerem pouca energia e assim, tornou-se uma tecnologia utilizada para a sondagem e modificação de produtos alimentícios que visam a sustentabilidade ambiental (AWAD *et al.*, 2012).

As aplicações de ultrassom na indústria de alimentos podem ser divididas em duas categorias diferentes e dependem da utilização de baixa ou alta intensidade de ultrassom. A aplicação de ultrassom com baixa intensidade, utiliza níveis de potência de 100 kHz até 10 MHz e $<1 \text{ W cm}^{-2}$ que são tão pequenas, cujas ondas ultrasônicas não causam alterações física ou química nas propriedades do material pelo qual passa a onda, isto é, são não-destrutivas. A

aplicação mais comum de ultrassom de baixa intensidade é como uma técnica analítica para fornecer informações sobre as propriedades físico-químicas dos alimentos, tais como, composição, estrutura, estado físico e vazão. Em contraste, as aplicações com níveis de potência de alta intensidade ($<16-100$ kHz e $10-1000$ W cm⁻²) são tão grandes que causam rupturas físicas do material ao qual está sendo aplicado, ou promovem determinadas reações químicas. O ultrassom de alta intensidade tem sido utilizado para gerar emulsões, romper células e extrair compostos intracelulares e dispersar materiais agregados (MCCLEMENTS, 1995; AWAD *et al.*, 2012).

A variação de pressão (compressão e decompressão) provocada pela propagação das ondas ultrassônicas no meio em estudo, é responsável pelo fenômeno denominado de cavitação. A cavitação é definida como a criação e a implosão de microbolhas de gás no centro de um líquido (BARBOZA; SERRA, 1992). A cavitação pode ocorrer em três fases: (i) formação de núcleos de cavitação (formação de bolhas de ar perto de partículas que contenham superfícies irregulares), (ii) crescimento e (iii) violenta implosão das bolhas (BARBOZA; SERRA, 1992; LUQUE-GARCÍA; LUQUE DE CASTRO, 2003; JYOTI; PANDIT, 2004) cujo processo completo ocorre em torno de 400 μ s (Figura 10).

Figura 10 - Fenômeno de cavitação formado pela variação de pressão no interior de um líquido.



Fonte: Adaptado de Bang e Suslick (2010)

O ciclo de compressão gera uma pressão positiva no líquido e há colisão entre as moléculas, enquanto que no ciclo de decompressão, há geração de uma pressão negativa no líquido que promove o afastamento das moléculas. Esta implosão das bolhas, libera a energia

concentrada e estocada dentro da bolha em um tempo muito curto (com um aquecimento na taxa de 10^{10} K s^{-1}) e esta liberação de energia cavitacional é considerada localizada (SUSLICK, 1990; BANG; SUSLICK, 2010). O tamanho das bolhas formadas é muito pequeno em relação ao volume total do líquido e assim, o calor que elas produzem é rapidamente dissipado, sendo que o resfriamento após o colapso de uma bolha cavitacional foi estimado em cerca de 10 bilhões de $^{\circ}\text{C s}^{-1}$ (LUQUE-GARCÍA; LUQUE-DE-CASTRO, 2003).

As aplicações de ultrassom podem ser realizadas por três diferentes maneiras, sendo: por aplicação direta ao produto, por acoplamento com aparelho ou pela submersão em banho. Com os avanços em eletrônica tem sido construído probes de ultrassom e instrumentos com alta resolução e conveniência, que diversificaram as aplicações de ultrassom na área de ciência e tecnologia de alimentos. Assim, para melhorar a qualidade dos alimentos, há aparelhos modificadores (ultrassom de alta intensidade) ou sensores (ultrassom de baixa intensidade) (AWAD *et al.*, 2012).

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

A extração de produtos naturais assistida por ultrassom foi abordada por Shirsath, Sonawane e Gogate (2012) em que afirmaram que essa técnica pode ser convenientemente combinada com outras técnicas de extração, tais como, a extração com fluido supercrítico, a extração assistida por microondas, destilação sob vácuo e tratamento enzimático. Concluíram que a combinação de ultrassom com enzimas pode resultar no aumento total da eficácia da operação com intensificação da extração dos compostos de interesse e diminuir o tempo de tratamento requerido.

O ultrassom funciona principalmente por meio da geração de bolhas e cavitação na matriz biológica, e segundo Kadam *et al.* (2015), o uso de ultrassom tem sido aplicado na extração, identificação e liberação de proteínas e peptídeos bioativos obtidos a partir

de produtos naturais de fontes de plantas, animais e marinhos com aumento no rendimento e taxa de extração.

Os efeitos da aplicação de ultrassom de alta intensidade em diferentes matrizes alimentares, como leite e produtos lácteos, ovos, arroz, soja, ervilhas e carne sobre as propriedades funcionais de solubilidade, capacidade de retenção de água, gelificação, espuma e emulsificação de proteínas em alimentos foram revisadas por Higuera-Barraza *et al.* (2016) e descreveram que houve melhoria nestas propriedades.

O uso de ultrassom de alta frequência com diferentes amplitudes (0, 21, 42, 63 e 84 μm_{pp}) e tempos (15, 30, 60 e 120 s) foi aplicado por Karki *et al.* (2010) para aumentar a extração de proteínas e açúcares em flocos de soja. Concluíram que 46% de proteínas e 50% de açúcares foram extraídos em comparação ao controle, indicando que o uso de ultrassom tem potencial para melhorar a extração destes compostos em comparação com os sistemas convencionais e pode reduzir significativamente o custo do processamento de soja.

O efeito do tratamento com ultrassom sobre o teor de proteínas, propriedades reológicas, isoflavonas daidzina e genistina do extrato de soja foi investigado por Fahmi *et al.* (2011; 2012). O ultrassom foi aplicado no homogenato de soja obtido após a trituração dos grãos, em diferentes frequências (35 e 130 kHz), temperaturas (20 e 40 °C) e tempos (20, 40 e 60 min) de tratamento. Os resultados indicaram que o ultrassom aumentou significativamente o conteúdo de proteínas do extrato de soja devido a cavitação induzida que aumentou a permeabilidade dos tecidos vegetais. A viscosidade do extrato não foi alterada pelo tratamento com ultrassom, entretanto ocorreu um aumento no índice de escoamento. Ainda, observaram que ambas frequências favoreceram o aumento do conteúdo de isoflavonas totais no extrato de soja. No entanto, o tratamento a 35 kHz (baixa frequência, maior intensidade) resultou em um maior conteúdo de isoflavonas totais (daidzina, genistina, daidzeína e genisteína) no extrato de soja quando comparado com alta frequência (130 kHz, menor intensidade). Estes resultados foram atribuídos a diferença da frequência do ultrassom, que foi inversamente proporcional ao tamanho da bolha. Observaram que o aumento da frequência e formação das bolhas se tornaram mais difíceis e a zona de cavitação menos violentas. O emprego da frequência de 35 kHz e temperatura de 40 °C aumentou a proporção de isoflavonas agliconas:glicosídicas em 23 e 19%, respectivamente.

Os efeitos do tratamento com ultrassom de alta frequência em agregados de proteínas de soja com estruturas de 7S e 11S foram investigados por Hu *et al.* (2015). A aplicação de ultrassom na frequência de 20 kHz, potência de 400 W por 5, 20 e 40 min reduziu a turbidez e tamanho das partículas e aumentou a hidrofobicidade, solubilidade, atividade e

estabilidade de emulsão da fração 7S. Em relação a fração 11S também houve redução da turbidez e aumento na atividade emulsificante, entretanto o efeito foi mínimo em relação ao tamanho das partículas e estabilidade de emulsão.

Os efeitos da intensidade de ultrassom (6, 15 e 24 W cm⁻²), temperatura (35, 45 e 55 °C) e tempo (5, 15 e 25 min) no pré-tratamento da soja antes da maceração com reduzido volume de água (1:1,5; soja:água) com aplicação do delineamento Box-Behnken foi investigado por Falcão *et al.* (2018). Observaram que o ultrassom exerceu efeitos significativos sobre o conteúdo das isoflavonas com redução no teor das isoflavonas β -glicosídeos daidzina e genistina e aumento no teor das isoflavonas agliconas daidzeína e genisteína. Esta conversão de isoflavonas β -glicosídeos a agliconas foi associada aos efeitos da cavitação, no qual a ruptura das bolhas como consequência final da cavitação, gerou ondas de choque entre as partículas que podem ter facilitado a hidrólise da ligação éter dos β -glicosídeos das isoflavonas, produzindo assim, agliconas como produto final. A soja assim pré-tratada com ultrassom pode ser utilizada como um melhor insumo para a indústria alimentícia. As melhores condições estabelecidas para o pré-tratamento da soja com ultrassom na obtenção de grãos com maior teor de agliconas e manutenção da atividade da β -glicosidase foram estabelecidas a 55 °C, 5 min e 19,5 W cm⁻². Além disso, o pré-tratamento da soja com ultrassom resultou em reduzido tempo de maceração (2 h) atingindo maior teor de umidade, menor dureza e maior conteúdo de agliconas. Portanto, este pré-tratamento pode ser recomendado antes dos processos subsequentes da soja para obtenção de maior teor de isoflavonas agliconas sem reduzir a absorção de água e dureza dos grãos.

REFERÊNCIAS

- A SOJA: história, tendências e virtudes. **Revista Funcionais e Nutracêuticos**, p. 28-40, 2007. Disponível em: <http://www.insumos.com.br/funcionais_e_nutraceuticos/materias/76.pdf>. Acesso em: 15 maio 2019.
- AMARAL, C.; TOLOI, M. R. T.; VASCONCELOS, L. D.; FONSECA, M. J. V.; CORREIA-DASILVA, G.; TEIXEIRA, N. The role of soybean extracts and isoflavones in hormone-dependent breast cancer: Aromatase activity and biological effects. **Food and Function**, v.8, n.9, p.3064-3074, 2017.
- ANDRADE, J. C.; MANDARINO, J. M. G.; KUROZAWA, L. E.; IDA, E. I. The effect of thermal treatment of whole soybean flour on the conversion of isoflavones and inactivation of trypsin inhibitors. **Food Chemistry**, v.194, p.1095-1101, 2016.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.66, n.1. p.1-9, 2007.
- ANVISA. 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. **Diário Oficial da União**. Brasília, 2013. Disponível em:<http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>. Acesso em: 10 maio 2019.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº. 268, de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico para produtos proteicos de origem vegetal. **Diário Oficial da União**. Brasília, 23 de setembro de 2005. Disponível em:<<http://portal.anvisa.gov.br/legislacao#/visualizar/27595>>. Acesso em: 30 agosto 2019.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº14, de 28 de junho de 1978. Regulamento técnico sobre o padrão de identidade e qualidade para farinha desengordurada de soja, proteína texturizada de soja, proteína concentrada de soja, proteína isolada de soja e extrato de soja. **Diário Oficial da União**. Brasília, 28 de junho de 1978 Disponível em:<http://www.anvisa.gov.br/anvisalegis/resol/14_78.htm>. Acesso em: 10 maio 2019.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº243, de 26 de julho de 2018. Regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedade funcional e ou de saúde. **Diário Oficial da União**. Brasília, 27 de julho de 2018. Disponível em:< http://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/34379969/do1-2018-07-27-resolucao-da-diretoria-colegiada-rcd-n-243-de-26-de-julho-de-2018-34379917>. Acesso em: 30 agosto 2019.
- ARANTES, V.; SADDLER, J. N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for Biofuels**, v.3, n.4, p.1-11, 2010.

AWAD, T. S.; MOHARRAM, H. A.; SHALTOUT, O. E.; ASKER, D.; YOUSSEF, M. M. Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: a review. **Food Research International**, v.48, p. 410-427, 2012.

BANG, J. H.; SUSLICK, K. S. Applications of ultrasound to the synthesis of nanostructured materials. **Advanced Materials**, v.22, p.1039-1059, 2010.

BARBOZA, J. C. S.; SERRA, A. A. Ultra-som: Influência do ultra-som na química. **Química Nova**, v.15, n.4, 1992.

BARDÓCZ, S. Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. **Trends in Food Science and Technology**, v.6, p.341-346, 1995.

BAÚ, T. R.; GARCIA, S.; IDA, E. I. Changes in soymilk during fermentation with kefir culture: oligosaccharides hydrolysis and isoflavone aglycone production. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v.66, p.845-850, 2015.

BAÚ, T. R.; IDA, E. I. Soymilk processing with higher isoflavone aglycone content. **Food Chemistry**, v.183, p.161-168, 2015.

BEMILLER, J. N.; HUBER, K. C. Carboidratos. In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. p.117

BENASSI, V. T.; PRUDENCIO, S. H. Impactos do processamento de soja na retenção de minerais, isoflavonas e proteínas em tofus. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v.24, n.1, p.51-59, 2013.

BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v.18, p.355-383, 2000.

BIJI, K.B., RAVISHANKAR, C.N., VENKATESWARLU, R., MOHAN, C.O., SRINIVASA GOPAL, T.K. Biogenic amines in seafood: a review. **Journal of Food Science and Technology**, v.53, p.2210-2218, 2016.

BORDINGNON, J. R.; MANDARINO, J. M. G. **Soja: composição química, valor nutricional e sabor**. Londrina: EMBRAPA CNPSO, 1994. 32p

BRECHT, J. K.; RITENOUR, M. A.; HAARD, N. F.; CHISM, G. W. Fisiologia pós-colheita de tecidos vegetais comestíveis. In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. p.782

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

CHEN, J. C.; WANG, J.; WANG, Z. J.; LI, Y. J.; PANG, J.; LIN, H. T.; YIN, S. W. Effect of Monascus aged vinegar on isoflavone conversion in soy germ by soaking treatment. **Food Chemistry**, v.186, p.256-264, 2015.

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

CHEN, S. T.; YANG, H. Y.; HUANG, H. Y.; PENG, S. J.; CHEN, J. R. Effects of various soya protein hydrolysates on lipid profile, blood pressure and renal function in five-sixths nephrectomized rats. **British Journal of Nutrition**, v.96, p.435-441, 2006.

CHEN, Y.; XU, Z.; ZHANG, C.; KONG, X.; HUA, Y. Heat-induced inactivation mechanisms of Kunitz trypsin inhibitor and Bowman-Birk inhibitor in soymilk processing. **Food Chemistry**, v.154, p.108-116, 2014.

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

COMAS-BASTÉ, O.; LATORRE-MORATALLA, M. L.; SÁNCHEZ-PÉREZ, S.; VECIANA-NOGUÉS, M. T.; VIDAL-CAROU, M. C. Histamine and other biogenic amines in food: From *Scombroid* poisoning to histamine intolerance. In: PROESTOS, C. **Biogenic Amines**. IntechOpen, 2019.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**, v. 6 - Safra 2018/19, p.1-69. Brasília: Conab, 2019. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&t=2>>. Acesso em: 30 maio 2019.

COSTA, M. R.; GLÓRIA, M. B. A. Migraine and Diet. **Elsevier Science**, p. 3940-3947, 2003.

DE CAMARGO, A. C.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; BIASOTO, A. C. T.; SHAHIDI, F. Enzyme-assisted extraction of phenolics from winemaking by-products: antioxidant potential and inhibition of alpha-glucosidase and lipase activities. **Food Chemistry**, v.212, p.395-402, 2016.

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.

DONKOR, O. N.; SHAH, N. P. Production of β -glucosidase and hydrolysis of isoflavone phytoestrogens by *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*, and, *Lactobacillus casei* in soymilk. **Journal of Food Science**, v.73, n.1, p.M15-M20, 2008.

DUEÑAS, M.; HERNÁNDEZ, T.; ESTRELLA, I. Changes in the content of bioactive polyphenolic compounds of lentils by the action of exogenous enzymes. Effect on their antioxidant activity. **Food Chemistry**, v.101, p.90-97, 2007.

EC, European Commission. Regulation 1019/2013/ EU. Amending annex I to regulation EC No 2073/2005 as regards histamine in fishery products. **Official Journal of the European Union**. 2013;282:46-47

EC, European Commission. Regulation 2073/2005/ EC. Microbiological criteria for foodstuffs. **Official Journal of the European Union**. 2005;338:1-26

EFSA, European Food Safety Authority. Scientific opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. **EFSA Journal**, v.9, n.10, p.2393, 2011.

ELIASSEN, K. A.; REISTAD, R.; RISOEN, U.; RONNING, H. F. Dietary polyamines. **Food Chemistry**, v.78, p.273-280, 2002.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Soja. **Cultivares de Soja 2004/2005 Região Centro-Sul**. Londrina: Embrapa Soja: Fundação Meridional, 2005a. 52 p. (Embrapa Soja. Documentos, 249).

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Agroindústria de Alimentos. **Manual de produção de extrato de soja para agroindústria de pequeno porte**. FELBERG, I; ANTONIASSI, R.; DELIZA, R., Rio de Janeiro, 2005b.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Soja. **Soja em números**. 2019a. Disponível em: <https://www.embrapa.br/en/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>>. Acesso em: 10 maio 2019.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Soja. **Soja na alimentação**. 2019b. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/en/soja/alimentacao/composicaodasoja>>. Acesso em maio 2019.

EVANGELISTA, W. P. **Prevalência de histamina em peixes escombrídeos e intoxicação histamínica no Brasil de 2007 a 2009**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010. Disponível em: www.bibliotecadigital.ufmg.br/.../warley_p._evangelista_2010.pdf. Acesso em 30 março 2019.

FAHMI, R.; KHODAIYAN, F.; POURAHMAD, R.; EMAM-DJOMEH, Z. Effect of ultrasound assisted extraction upon the protein content and rheological properties of the resultant soymilk **Advance Journal of Food Science and Technology**, v.3, n.4, p.245-249, 2011.

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

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

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. **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 abril. 2019.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. 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 abril. 2019.

FDA, Food and Drug Administration. **Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance**, 4th ed. Washington: United States Department of Health and Human Services; 2011. p. 468

FDA, Food and Drug Administration. **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: 08 abril 2019.

FDA, Food and Drug Administration. **Food labeling. Reference daily intakes and daily reference values; mandatory status of nutrition labeling and nutrient content revision; serving sizes; proposed rules**. Fed. Reg. 55, p.29476-29573, 1990.

FENG, Z.; XINGYUN, P.; XIAODI, S.; SHUNTANG, G. Effects of high-temperature pressure cooking and traditional cooking on soymilk: Protein particles formation and sensory quality. **Food Chemistry**, v.209, p.50-56, 2016.

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

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

GARDNER, C. D.; NEWELL, K. A.; CHERIN, R.; HASKELL, W. L. The effect of soy protein with or without isoflavones relative to milk protein on plasma lipids in hypercholesterolemic postmenopausal women. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, n.4, p.728-735, 2001.

GLÓRIA, M. B. A. Bioactive Amines. In: HUI, H.; NOLLET, L.L. **Handbook of food Science, Technology and Engineering**. New York: Marcel Dekker, 2006.

GLÓRIA, M. B. A.; TAVARES-NETO, J.; LABANCA, R. A.; CARVALHO, M. S. Influence of cultivar and germination on bioactive amines in soybeans (*Glycine max L. Merril*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, n.19, p.7480-7485, 2005.

GOLBITZ, P.; JORDAN, J. Soyfoods: Market and Products. In: RIAZ, M. N. **Soy Applications in Food**. New York: CRC Press, 2006. p.2-21

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.73, n.3, p.965-971, 2007.

GUAN, X.; YAO, H. Optimization of Viscozyme L-assisted extraction of oat bran protein using response surface methodology. **Food Chemistry**, v.106, p.345-351, 2008.

HALÁSZ, A.; BARÁTH, A.; SIMON-SARKADI, L.; HOLZAPFEL, W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. **Trends in Food Science and Technology**, v.5, p.42-49, 1994.

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

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

HERMAN, E. Soybean allergenicity and suppression of the immunodominant allergen. **Crop Science**, v.45, p.462-467, 2005.

HIGUERA-BARRAZA, O. A.; DEL TORO-SANCHEZ, C. L.; RUIZ-CRUZ, S.; MÁRQUEZ-RÍOS, E. Effects of high-energy ultrasound on the functional properties of proteins. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.31, p.558-562, 2016.

HILLARY, A. R.; PEGG, A. E. Decarboxylases involved in polyamines biosynthesis and their inactivation by nitric oxide. **Biochemical Biophysics Acta**, v.1647, p.161-166, 2003.

HSIEH, H. C.; KAO, T. H.; CHEN, B. H. A fast HPLC method for analysis of isoflavones in soybean. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v.27, n.2, p.315-324, 2005.

HU, H.; CHEUNG, I.W.Y.; PAN, S.; LI-CHAN, E.C.Y. Effect of high intensity ultrasound on physicochemical and functional properties of aggregated soybean β -conglycinin and glycinin. **Food Hydrocolloids**, v.45, p.102-110, 2015.

JACKSON, C. J. C.; DINI, J. P.; LAVANDIER, C.; RUPASINGHE, H. P. V.; FAULKNER, H.; POYSA, V.; BUZZEL, D.; DEGRANDIS, S. Effect of processing on the content and composition of isoflavones during manufacturing of soy beverage and tofu. **Process Biochemistry**, v.37, p.1117-1123, 2002.

JINAPONG, N.; SUPHNTHARIKA, M.; JAMNONG, P. Production of instant soy milk powders by ultrafiltration, spray drying and fluidized bed agglomeration. **Journal of Food Engineering**, v.84, n.2, p.194-205, 2008.

JUHÁSZ, T.; SZENGYEL, Z.; RÉCZEY, K.; SIIKA-AHO, M.; VIKARI, L. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. **Process Biochemistry**, v.40, p.3519-3525, 2005.

- JUNG, S.; MURPHY, P. A.; SALA, I. Isoflavone profiles of soymilk as affected by high-pressure treatments of soymilk and soybeans. **Food Chemistry**, v.111, n.3, p.592-598, 2008.
- JYOTI, K. K.; PANDIT, A. B. Ozone and cavitation for water disinfection. **Biochemical Engineering Journal**, v.18, n.1, p.9-19, 2004.
- KADAM, S.U.; TIWARI, B.K.; ALVAREZ, C.; O'DONNELL, C.P. Ultrasound applications for the extraction, identification and delivery of food proteins and bioactive peptides. **Trends in Food Science & Technology**, v.46, p.60-67, 2015.
- KALÁČ, P.; Contents of polyamines in selected foods. **Food Chemistry**, v.90, p.561-564, 2005.
- KALÁČ, P.; KRAUSOVÁ, P. A. A review of dietary polyamines: formation, implications for growth and health and occurrence in foods. **Food Chemistry**, v.90, p.219-230, 2005.
- 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.
- KARAKAYA, S. Bioavailability of phenolic compounds. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.44, n.6, p.453-464, 2004.
- KARKI, B.; LAMSAL, B.P.; JUNG, S.; LEEUWEN, J.H.V.; POMETTO, A.L.; GREWELL, D.; KHANAL, S.K. Enhancing protein and sugar release from defatted soy flakes using ultrasound technology. **Journal of Food Engineering**, v.96, p.270-278, 2010.
- KASAI, N.; MURATA, A.; INUI, H.; SAKAMOTO, T.; KAHN, R.I. Enzymatic high digestion of soybean milk residue (okara). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.5709-5716, 2004.
- KIM, J.H., KIM, D.H., AHN, H.J., PARK, H.J., BYUN, M.W. Reduction of the biogenic amine contents in low salt-fermented soybean paste by gamma irradiation. **Food Control**, v.16, n.1, p.43-49, 2004.
- KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v.13, p.345-351, 2002.
- KNORR, D.; ZENKER, M.; HEINZ, V.; LEE, D.-U. Applications and potential of ultrasonics in food processing. **Trends in Food Science & Technology**, v.15, p.261-266, 2004.
- LADERO, V.; CALLES-ENRIQUEZ, M.; FERNANDEZ, M.; ALVAREZ, M. A. Toxicological effects of dietary biogenic amines. **Current Nutrition & Food Science**, v.6, p.145-156, 2010.
- LAGOS, J. B.; VARGAS, F. C.; DE OLIVEIRA, T. G.; DA APARECIDA MAKISHI, G. L.; DO AMARAL SOBRAL, P. J. Recent patents on the application of bioactive compounds in food: A short review. **Current Opinion in Food Science**, v.5, p.1-7, 2015.
- LARQUÉ, E.; SABATER-MOLINA, M.; ZAMORA, S. Biological significance of dietary polyamines. **Nutrition**, v.23, p.87-95, 2007.

LAVON, O.; LURIE, Y.; BENTUR, Y. *Scombroid* fish poisoning in Israel, 2005-2007. **Israel Medical Association Journal**, v.10, p.689-792, 2008.

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

LETHABY, A.; BROWN, J.; MARJORIBANKS, J.; KORNENBERG, F.; ROBERTS, H.; EDEN, J. Phytoestrogens for vasomotor menopausal symptoms. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n.4, 2007.

LIMA, A. S.; GLÓRIA, M. B. A. Aminas bioativas em alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.33, p.70-79, 1999.

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

LINARES, D. M., MARTÍN, M. C., LADERO, V., ALVAREZ, M. A., FERNÁNDEZ, M. Biogenic amines in dairy products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.51, p.691-703, 2011.

LIU, K. Food use of whole soybeans. In: LAWRENCE, A. J.; WHITE, P. J.; GALLOWAY, R. **Soybeans Chemistry, Production, Processing, and Utilization**. Urbana: AOCS Press, 2008.

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

LIU, K. **Soybeans: chemistry, technology and utilization**. Gaithersburg: Aspen Publishers, 1999.

LIU, K. **Soybeans: Chemistry, Technology, and Utilization**. New York: Chapman & Hall, 1997.

LORET, S.; DELOYER, P.; DANDRIFOSSE, G. Levels of biogenic amines as a measure of the quality of the beer fermentation process: Data from Belgian samples. **Food Chemistry**, v.89, p.519-525, 2005.

LU, F.; ZUI, Z.; LIU, Y., LI, B. The effect of okara on the qualities of noodle and steamed bread. **Advanced Journal of Food Science and Technology**, v.5, n.7, p.960-968, 2013.

LUQUE-GARCÍA, J. L.; LUQUE DE CASTRO, M. D. Ultrasound: a powerful tool for leaching. **Trends in Analytical Chemistry**, v.22, n.1, p.41-47, 2003.

LV, Y. C.; SONG, H. L.; LI, X.; GUO, S. T. Influence of blanching and grinding process with hot water on beany and non-beany flavour in soymilk. **Journal of Food Science**, v.76, p.S20-S25, 2011.

MA, L.; LI, B.; HAN, F.; YAN, S.; WANG, L.; SUN, J. Evaluation of the chemical quality traits of soybean seeds, as related to sensory attributes of soymilk. **Food Chemistry**, v.173, p.694-701, 2015.

MA, Y.; WU, X.; GIOVANNI, V.; MENG, X. Effects of soybean oligosaccharides on intestinal microbial communities and immune modulation in mice. **Saudi Journal of Biological Sciences**, p.114-121, 2016.

MAIJALA, R.; EEROLA, S.H.; AHO, M.A.; HIRN, J.A. The effect of GDL-induced pH decrease on the formation of biogenic amine in meat. **Journal of Food Protection**, v.56, p.125-129, 1993.

MANION, B.; CORREDIG, M. Interactions between whey protein isolate and soy protein fractions at oil-water interfaces: effects of heat and concentration of protein in the aqueous phase. **Journal of Food Science**, v.71, p.343-349, 2006.

MARTÍNEZ-VILLALUENGA, C.; FRÍAS, J.; GULEWICZ, P.; GULEWICZ, K.; VIDAL-VALVERDE, C. Food safety evaluation of broccoli and radish sprouts. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, 1635-1644, 2008.

MARTON, L. J.; PEGG, A. E. Polyamines as targets for therapeutic intervention. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.35, p.55-91, 1995.

MCCLEMENTS, D. J. Advances in the application of ultrasound in food analysis and processing. **Trends in Food Science and Technology**, v.6, p.293-299, 1995.

MCCLEMENTS; J. D.; DECKER, E. A. Lipídeos. In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, p.131-178, 2010.

MEDIC, J.; ATKINSON, C.; HURBURGH, C. R. Current knowledge in soybean composition. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.91, p.363-384, 2014.

MEDINA, M. A.; URDIALES, C. R.; RORÍGUEZ-CASO, C.; RAMIREZ, F. J.; SANCHÉZJIMÉNEZ, F. Biogenic amines and polyamines: similar biochemistry for different physiological missions and biochemical applications. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v.38, p.23-59, 2003.

MESSINA, M. Soy and Health Update: Evaluation of the clinical and epidemiologic literature. **Nutrients**, v.8, p.754, 2016.

MESSINA, M. Soyfoods and soybean phyto-estrogens (isoflavones) as possible alternatives to hormone replacement therapy (HRT). **European Journal of Cancer**, v.36, p.71-77, 2000.

MESSINA, M.; MESSINA, V. Soyfoods, soybean isoflavones and bone health: a brief overview. **Journal of Renal Nutrition**, v.10, p.63-68, 2000.

MESSINA, M.; MESSINA, V.; SETCHELL, K. **The simple soybean and your health**. Garden City Park: Avery, 1994.

MESSINA, M.; WOOD, C. Soy isoflavones, estrogen therapy, and breast cancer risk: analysis and commentary. **Nutrition Journal**, v.7, p.1-11, 2008.

MIN, K.; EBELER, S. E. Flavonoid effects on DNA oxidation at low concentrations relevant to physiological levels. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, n.1, p.96-104, 2008.

MOINARD, C.; CYNOBER, L.; BANDT, J. P. Polyamines: metabolism and implications in human diseases. **Clinical Nutrition**, v.24, p.184-197, 2005.

MORAES, C. S. Introdução as isoflavonas de soja. In: MORAES, C. S. **Isoflavonas de soja e suas atividades biológicas**. São Paulo: Livraria Varela, p. 31-38, 2009.

MORET, S.; SMELA, D.; POPULIN, T.; CONTE, L. S. A survey on free biogenic amine content of fresh and preserved vegetables. **Food Chemistry**, v.89, p.355-361, 2005.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in foods. **Journal of Chromatography A**, v.1054, n.1-2, p.95-111, 2004.

NIJVELDT, R. J.; VAN NOOD, E. L. S.; VAN HOORN, D. E.; BOELENS, P. G.; VAN NORREN, K.; VAN LEEUWEN, P. A. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.74, p.418-425, 2001.

NISHIBORI, N.; FUJIHARA, S.; AKATUKI, T. Amounts of polyamines in foods in Japan and intake by Japanese. **Food Chemistry**, v.100, p.491-497, 2007.

NISHIMURA, K.; SHIINA, R.; KASHIWAGI, K.; IGARASHI, K. Decrease on polyamines with aging and their ingestion from food and drink. **Journal of Biochemistry**, v.139, p.81-90, 2006.

NSRL. National Soybean Research Laboratory. **Soy at home series n°2: Make your own soymilk – International Soybean Program**. 2012. Illinois, USA. Disponível em: <<http://www.nsrl.illinois.edu/nutrition/multimedia/At%20Home%20soymilk.pdf>> Acesso em: maio 2019.

OKAMOTO, A.; SUGI, E.; KOIZUMI, Y.; YANAGIDA, F.; UDAKA, S. Polyamine content of ordinary foodstuffs and various fermented foods. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.61, p.1582-1584, 1997.

OMS, Organização Mundial da Saúde. World Health Organization & Food and Agriculture Organization of the United Nations (WHO/FAO). **Expert Meeting on the Public Health Risks of Histamine and Other Biogenic Amines from Fish and Fishery Products: Meeting Report**. World Health Organization; 2013.

OZDAL, T.; CAPANOGLU, E.; ALTAY, F. A review on protein-phenolic interactions and associated changes. **Food Research International**, v.51, n.2, p.954-970, 2013.

PAN, M.; LAI, C.; HO, C. Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids. **Food & Function**, v.1, p.15-31, 2010.

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

PARKIN, K. L. Enzimas. In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. p.265

PODSEDEK, A. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. **LWT - Food Science and Technology**, v.40, n.1, p.1-11, 2007.

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

RAGHUVANSHI, R. S.; BISHT, K. Uses of Soybean: Products and Preparation. In: Singh, G. (Ed). **The Soybean: Botany, Production and Uses**, CAB International, USA, pp: 345-374. 2010.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 7ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

REILLY, J. K.; LANOU, A. J., BARNARD, N. D.; SEIDL, K.; GREEN, A. A. Acceptability of soymilk as a calcium-rich beverage in elementary school children. **Journal of the American Dietetic Association**, v.106, n.4, p.590-593, 2006.

RIAZ, M. N. Processing of soybeans into ingredients. In: RIAZ, M. N. **Soy applications in food**. Boca Raton: Taylor & Francis, p. 39-62, 2006.

RINGGENBERG, E.; CORREDIG, M.; ALEXANDER, M. Physico-chemical characterization of soymilk particles as a function of their volume fraction: comparison with theoretical systems. **Food Biophysics**, v.7, p.244-257, 2012.

RODRIGUES, I. M.; CARVALHO, M. G. V. S.; ROCHA, J. M. S. Increasing the protein content of rapessed meal by enzymatic hydrolysis of carbohydrates. **BioResources**, v.9, n.2, p.2010-2025, 2010.

ROSTAGNO, M. A.; PALMA, M.; BARROSO, C. G. Short-term stability of soy isoflavones extracts: sample conservation aspects. **Food Chemistry**, v.93, n.3, p.557-564, 2005.

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

SAAID, M.; SAAD, B.; HASHIM, N. H.; MOHAMED ALI, A. S.; SALEH, M. I. Determination of biogenic amines in selected Malaysian food. **Food Chemistry**, v.113, p.1356-1362, 2009.

SANTOS, O. S. **A cultura da soja - 1**: Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná. Editora Globo, 1988.

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

SETCHELL, K. D. R.; BROWN, N. M.; DESAI, P.; ZIMMER-NECHEMIAS, L.; WOLFE, B. E.; BRASHEAR, W.T.; KIRSCHNER, A. S.; CASSIDY, A.; HEUBI, J. E. Bioavailability of nutrients and other bioactive components from dietary supplements bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements 1,2. **Journal of Nutrition**, p.1362-1375, 2001.

SHAHIDI, F.; YEO, J. Insoluble-bound phenolics in food. **Molecules**, v.21, p.1-22, 2016.

SHALABY, A. R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. **Food Research International**, v.29, p.675-690, 1996.

SHIRSATH, S. R.; SONAWANE, S. H.; GOGATE, P. R. Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations - A review of current status **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v.53, p.10-23, 2012.

SILLA-SANTOS, M. H. Biogenic amines: their importance in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v.29, p.213-231, 1996.

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.55, p.1197-1204, 2010.

SILVA, P. S. **Aminas bioativas e características físico-químicas em frutas**. 2004. 82p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2004.

SILVA, T. M.; SABAINI, P. S.; EVANGELISTA, W. P.; GLÓRIA, M. B. A. Occurrence of histamine in Brazilian fresh and canned tuna. **Food Control**, v.22, p.323-327, 2011.

SINGH, B. P.; VIJ, S.; HATI, S. Functional significance of bioactive peptides derived from soybean. **Peptides**, v.54, p.171-179, 2014.

SPANO, G.; RUSSO, P.; LONVAUD-FUNEL, A.; LUCAS, P.; ALEXANDRE, H.; GRANDVALET, C.; COTON, E.; COTON, M.; BARNAVON, L.; BACH, B.; RATTRAY, F.; BUNTE, A.; MAGNI, C.; LADERO, V.; ALVAREZ, M.; FERNÁNFEZ, M.; LOPEZ, P.; PALENCIA, P. F.; CORBI, A.; TRIP, H.; LOLKEMA, J. S.; Biogenic amines in fermented foods. **European Journal of Clinical Nutrition**, n.64, p.S95-S100, 2010.

STANOJEVIC, S. P.; BARAC, M. B.; PESIC, M. B.; VUCELI-RADOVIC, B. V. Composition of proteins in okara as a byproduct in hydrothermal processing of soy milk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.60, p.9221-9228, 2012.

SUSLICK, K. S. Sonochemistry. **Science**, v. 247, p. 1439-1445, 1990.

SZABÓ, O. E.; CSISZÁR, E. The effect of low-frequency ultrasound on the activity and efficiency of a commercial cellulase enzyme. **Carbohydrate Polymers**, v.98, n.2, p. 1483-1489, 2013.

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

TANG, S.; HETTIARACHCHY, N. S.; ESWARANANDAM, S.; CRANDALL, P. Protein extraction from heat-stabilized defatted rice bran: II. The role of amylase, celluclast, and viscozyme. **Journal of Food Science**, v.68, n.2, p.471-475, 2003.

TAY, S. L.; XU, G. Q.; PERERA, C. O. Aggregation profile of 11S, 7S and 2S coagulated with GDL. **Food Chemistry**, v.91, p.457-462, 2005.

TODA, K.; CHIBA, K.; ONO, T. Effect of components extracted from okara on the physicochemical properties of soymilk and tofu texture. **Journal of Food Science: Food Chemistry and Toxicology**, v.72, n.2, p.108-113, 2007.

TORO-FUNES, N., BOSCH-FUSTÉ, J., LATORRE-MORATALLA, M. L., VECIANA-NOGUÉS, M. T., VIDAL-CAROU, M.C. Biologically active amines in fermented and non-fermented commercial soybean products from the Spanish market. **Food Chemistry**, v.173 p.1119-1124, 2015a.

TORO-FUNES, N.; BOSCH-FUSTÉ, J.; LATORRE-MORATALLA, M. L.; VECIANA-NOGUÉS, M. T., VIDAL-CAROU, M. C. Isoflavone profile and protein quality during storage of sterilised soymilk treated by ultra high pressure homogenisation. **Food Chemistry**, v.167, p.78-83, 2015b.

TORO-FUNES, N.; BOSCH-FUSTÉ, J.; VECIANA-NOGUÉS, M. T.; VIDAL-CAROU, M. C. Effect of ultra-high pressure homogenization treatment on the bioactive compounds of soya milk. **Food Chemistry**, v.152, p.597-602, 2014a.

TORO-FUNES, N.; BOSCH-FUSTÉ, J.; VECIANA-NOGUÉS, M. T.; VIDAL-CAROU, M. C. Changes of isoflavones and protein quality in soymilk pasteurised by ultra-high-pressure homogenisation throughout storage. **Food Chemistry**, v.162, p.47-53, 2014b.

TSAO, R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. **Nutrients**, v.2. n.12, p.1231-1246, 2010.

USDA. United States Department of Agriculture. World Agricultural Supply and Demand Estimates. **Soybean Production**. 2019. Disponível em: <<https://www.nass.usda.gov/Newsroom/2019/02-08-2019.php>>. Acesso em 20 jan 2019.

VERGARA-BARBERÁN, M.; LERMA-GARCÍA, M. J.; HERRERO-MARTÍNEZ, J. M.; SIMÓ-ALFONSO, E. F. Use of an enzyme-assisted method to improve protein extraction from olive leaves. **Food Chemistry**, v.169, p.28-33, 2015.

VIDAL-CAROU, M.C., VECIANA-NOGUÉS, M.T., LATORRE-MORATALLA, M.L., BOVER-CID, S. Biogenic amines: Risks and control. **Handbook of fermented meat and poultry**. Blackwell Publishing. 2007.

- VILLANUEVA, M. J.; YOKOYAMA, W. H.; HONG, Y. J.; BARTTLEY, G. E.; RUPÉREZ, P. Effect of high-fat diets supplemented with okara soybean by-product on lipid profiles of plasma, liver and faeces in Syrian hamsters. **Food Chemistry**, v.124, p.72-79, 2010.
- VISHWANATHAN, K. H.; SINGH, V.; SUBRAMANIAN, R. Wet grinding characteristics of soybean for soymilk extraction. **Journal of Food Engineering**, v.106, p.28-34, 2011.
- WADA, K.; NAKAMURA, K.; TAMAI, Y.; TSUJI, M.; KAWACHI, T.; HORI, A.; TAKEYAMA, N.; TANABASHI, S.; MATSUSHITA, S.; TOKIMITSU, N.; NAGATA, C. Soy isoflavone intake and breast cancer risk in Japan: from the Takayama study. **International Journal of Cancer**, v.133, p.952-960, 2013.
- WALDRON, K. W.; PARKER, M. L.; SMITH, A. C. Plant cell walls and food quality. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.2, p.101-119, 2003.
- WANG, T. Minor Constituents and Phytochemicals of Soybeans. In: JOHNSON, P. J.; GALLOWAY, W. R. (Eds). **Soybeans: Chemistry, Production, Processing and Utilization**. Urbana: AOCS Press, 2008.
- XIAO, C. W. Health effects of soy protein and isoflavones in humans. **Journal of Nutrition**, v.138, p.1244S-1249S, 2008.
- XIAODI, S.; JINGYAN, L.; SHUMING, W.; LEI, Z.; LIJUAN, Q.; TIANFU, H.; QIANYU, W.; KOW-CHI, C. S.; SHUNTANG, G. Flavor characteristic analysis of soymilk prepared by different soybean cultivars and establishment of evaluation method of soybean cultivars suitable for soymilk processing. **Food Chemistry**, v.185, p.422-429, 2015.
- XU, B. J.; CHANG, S. K. C. Total phenolics, phenolic acids, isoflavones, and anthocyanins and antioxidant properties of yellow and black soy beans as affected by thermal processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p.7165-7175, 2008.
- XU, X.; WANG, H. J.; MURPHY, P. A.; HENDRICH, S. Neither background diet nor type of soy food affect short-term isoflavone bioavailability in women. **Journal of Nutrition**, v.130, p.798-801, 2000.
- XYNOS, N.; PAPAEFSTATHIOU, G.; PSYCHIS, M.; ARGYROPOULOU, A.; ALIGIANNIS, N.; SKALTSOUNIS, A. L. Development of a green extraction procedure with super/subcritical fluids to produce extracts enriched in oleuropein from olive leaves. **Journal of Supercritical Fluids**, v.67, p.89-93, 2012.
- YOSHIARA, L. Y.; MANDARINO, J. M. G.; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; MADEIRA, T. B.; DA SILVA, J. B.; DE CAMARGO, A. C.; SHAHIDI, F.; IDA, E. I. Germination changes the isoflavone profile and increases the antioxidant potential of soybean. **Journal of Food Bioactives**, p. 1-7, 2018.
- ZHONG, R.; YE, Z. Regulation of cell wall biosynthesis. **Current Opinion in Plant Biology**, v.10, n.6, p.564-572, 2007.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os itens 4 (MATERIAL E MÉTODOS) e 5 (RESULTADOS E DISCUSSÃO) foram redigidos no formato de três artigos científicos conforme seguem.

ARTIGO CIENTÍFICO 1

Este trabalho foi desenvolvido por meio do Programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos nos Laboratórios do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná. O artigo científico foi submetido e publicado no *Journal of Food Bioactives*, conforme segue.

SILVA, M. B. R.; FALCÃO, H. G.; KUROZAWA, L. E.; PRUDENCIO, S. H.; DE CAMARGO, A. C.; SHAHIDI, F.; IDA, E. I. Ultrasound- and hemicellulase-assisted extraction increase β -glucosidase activity, the content of isoflavone aglycones and antioxidant potential of soymilk. **Journal of Food Bioactives**, v.6, p.140-147, 2019.

DOI: <https://doi.org/10.31665/JFB.2019.6191>

ARTIGO CIENTÍFICO 2

Este trabalho foi desenvolvido parcialmente por meio do Programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos nos Laboratórios do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná. A outra parte foi desenvolvida por meio do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior/CAPES, conforme Portaria nº 69, de 2 de maio de 2013, Edital nº 47/2017 - PDSE 2017/2018 na Faculdade de Farmácia e Ciência de Alimentos da Universidade de Barcelona (UB), Santa Coloma de Gramenet, Espanha. Teve como supervisora a Prof.^a Dra. Maria Teresa Veciana-Nogués. O artigo científico foi submetido para *Food and Bioprocess Technology*.

SILVA, M. B. R.; KUROSAWA, L. E. PRUDENCIO, S. H.; LATORRE-MORATALLA, M. L.; VECIANA-NOGUÉS, M. T.; VIDAL-CAROU, M. C.; IDA, E. I. Effect of ultrasound- and hemicellulase-assisted extraction on the bioactive amine content of soymilk.

ARTIGO CIENTÍFICO 3

Este trabalho foi desenvolvido como uma parte do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior/CAPES, Portaria nº 69, de 2 de maio de 2013, Edital nº 47/2017 - PDSE 2017/2018 na Faculdade de Farmácia e Ciência de Alimentos da Universidade de Barcelona (UB), Santa Coloma de Gramenet, Espanha. Teve como supervisora a Prof.^a Dra. Maria Teresa Veciana-Nogués. O artigo científico, conforme segue, será submetido em um periódico científico da área.

SILVA, M. B. R.; SÁNCHEZ-PÉREZ, S. COMAS-BASTÉ, O.; IDA, E. I.; LATORRE-MORATALLA, M. L.; VECIANA-NOGUÉS, M. T.; VIDAL-CAROU, M. C. Biogenic amines and polyamines in ready-to-eat Japanese meals and evaluation of stored tuna sashimi.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este item **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO** foi contemplado com a redação dos três artigos científicos abaixo relacionados.

ARTIGO CIENTÍFICO 1

SILVA, M. B. R.; FALCÃO, H. G.; KUROZAWA, L. E.; PRUDENCIO, S. H.; DE CAMARGO, A. C.; SHAHIDI, F.; IDA, E. I. Ultrasound- and hemicellulase-assisted extraction increase β -glucosidase activity, the content of isoflavone aglycones and antioxidant potential of soymilk. **Journal of Food Bioactives**, v.6, p.140-147, 2019.

DOI: <https://doi.org/10.31665/JFB.2019.6191>

*O Journal of Food Bioactives (JFB, ISSN impresso: 2637-8752; ISSN on-line: 2637-8779), é uma publicação da Sociedade Internacional de Nutracêuticos e Alimentos Funcionais (ISNFF) e concedeu autorização para incluir na tese a versão impressa do artigo (Anexo A).

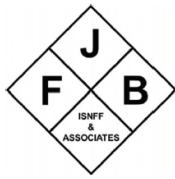
ARTIGO CIENTÍFICO 2

SILVA, M. B. R.; KUROSAWA, L. E. PRUDENCIO, S. H.; LATORRE-MORATALLA, M. L.; VECIANA-NOGUÉS, M. T.; VIDAL-CAROU, M. C.; IDA, E. I. Effect of ultrasound- and hemicellulase-assisted extraction on the bioactive amine content of soymilk. O artigo científico foi submetido para Food and Bioprocess Technology (Anexo B).

ARTIGO CIENTÍFICO 3

SILVA, M. B. R.; SÁNCHEZ-PÉREZ, S. COMAS-BASTÉ, O.; IDA, E. I.; LATORRE-MORATALLA, M. L.; VECIANA-NOGUÉS, M. T.; VIDAL-CAROU, M. C. Biogenic amines and polyamines in ready-to-eat Japanese meals and evaluation of stored tuna sashimi. O artigo científico será submetido em um periódico científico da área.

1 5.1 ARTIGO CIENTÍFICO 1



Journal of
Food Bioactives

International Society for
Nutraceuticals and Functional Foods



Original Research

J. Food Bioact. 2019;000:000–000

2

3 **Ultrasound- and hemicellulase-assisted extraction increase β -glucosidase activity, the**
4 **content of isoflavone aglycones and antioxidant potential of soymilk**

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

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

9 ^b Department of Food Engineering, Faculty of Food Engineering, University of Campinas,
10 Campinas, SP, Brazil

11 ^c Departamento de Ciencias Vegetales, Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Pontificia
12 Universidad Católica de Chile, Casilla 306-22, Santiago, Chile

13 ^d Department of Biochemistry, Memorial University of Newfoundland, St. John's, NL A1B
14 3X9, Canada

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

16 Abstract

17 Soymilk is consumed as such or used in the preparation of tofu, fermented soymilk, and soy
18 yogurt, among others. In this study, hemicellulase-assisted extraction (HAE) and ultrasound-
19 assisted extraction (UAE) were used during soymilk manufacturing. The activity of endogenous
20 β -glucosidases was increased 1.3 and 1.5-fold in soymilk produced upon HAE and UAE,
21 respectively. Likewise, the concentration of isoflavones in the aglycone form increased 1.7 and
22 2.4 times in samples subjected to HAE and UAE, respectively. UAE, but not HAE, rendered an
23 equimolar conversion from conjugated isoflavones to their respective aglycones. In addition,
24 HAE and UAE showed higher antiradical activity towards ABTS radical cation and peroxy
25 radical, compared to those of the control. The aglycone isoflavones/conjugated isoflavones
26 (aISO/cISO) ratio correlated with the antiradical activity, thus suggesting that the soybean
27 industry may use this new quality index to indicate the antioxidant potential of products. Food
28 formulations containing soymilk with high aISO/cISO ratio may translate to higher oxidative
29 stability of the final product. Likewise, the higher absorption of aglycone isoflavones compared
30 to that of their conjugated counterparts is well recognized. Therefore, high aISO/cISO ratio of
31 soymilk and/or its products may provide a better antioxidant protection under physiological
32 conditions.

33 **Keywords:** Soybean; Hemicellulase from *Aspergillus niger*; Sonication; Phenolic antioxidants;
34 Antioxidant potential.

35

36 1. Introduction

37 Soymilk has been recognized by its high protein content. It can be consumed as such or used in
38 the preparation of tofu, fermented soymilk, soy yogurts, among others. Production and
39 commercialization of soymilk has steadily increased in recent years as an option for vegetarians
40 and vegans, but also due to numerous evidences supporting its health benefits, attributed mainly
41 to its phytochemicals, especially phenolic compounds such as flavonoids (Toro-Funes et al.,
42 2014). The transformation of flavanones to isoflavone is a two step process which involves the
43 action of 2-hydroxyisoflavanone synthase and 2-hydroxyisoflavanone dehydratase (Veitch,
44 2007), although the action of isoflavone synthase has also been noted in describing the overall
45 reaction (de Camargo et al., 2018; Veitch, 2007).

46 As plant food secondary metabolites, flavonoids and other phenolic compounds are
47 related to the plant defense against pests and pathogens as well as biotic and abiotic stress. As
48 for the possible health benefits to humans, isoflavones have been widely investigated due to
49 their association with reduced risk of several chronic ailments such as cardiovascular and
50 Alzheimer diseases, some types of cancer, and type 2 diabetes, among others. Furthermore,
51 soybean isoflavones may also alleviate menopausal symptoms (de Camargo et al., 2019b;
52 Kalaiselvan et al., 2010).

53 The literature has described the existence of four groups of isoflavones, namely,
54 aglycones (genistein, daidzein, and glycitein), β -glucosides (genistin, daidzin, and glycitin),
55 acetylglucosides (acetylgenistin, acetyldaidzin, and acetylglycitin), and malonylglucosides
56 (malonylgenistin, malonyldaidzin, and malonylglycitin). Therefore, depending on the cultivar
57 and processing method employed, there may be twelve different isoflavones in soybean and its
58 processed products (Falcão et al., 2018).

59 Digestion and absorption of isoflavones are influenced by their chemical structures
60 (Shahidi and Peng, 2018) and, it has been accepted that, conjugated isoflavones are poorly

61 absorbed in the small intestine. In fact, according to a human study by Izumi et al. (2000),
62 conjugated isoflavones are absorbed more slowly and in lower amounts than their
63 corresponding aglycones, which has been explained by their hydrophilic nature and higher
64 molecular weight. Hence, to increase their bioaccessibility and render greater bioactivities,
65 conjugated isoflavones should be hydrolysed into their corresponding aglycones. There is a
66 wealth of evidence supporting the improvement of soy protein bioactivity upon enzymatic
67 hydrolysis (Farzamirad and Aluko, 2008). Likewise, the procurement of soybean products with
68 higher contents of aglycone isoflavones could be helpful to the user industries.

69 Endogenous β -glucosidases present in soybeans catalyze the hydrolysis of glycosidic
70 bonds from conjugated isoflavones thus generating their respective aglycones (Yoshiara et al.,
71 2018a). Furthermore, thermal treatment, fermentation, and ultra-high pressure homogenization
72 are examples of other methods that have been tested to improve the recovery of isoflavone
73 aglycones (Andrade et al., 2016; Baú et al., 2015; Fernandes et al., 2017; Handa et al., 2014; de
74 Lima and Ida, 2014; Toro-Funes et al., 2014).

75 Enzyme-assisted extraction to improve the recovery of phenolic compounds has been
76 used as an alternative to alkali treatment. Thus, cell wall degrading enzymes have shown greater
77 potential than those of non-specific proteases (de Camargo et al., 2016). The cell wall of
78 soybean is mainly composed of hemicellulose, followed by pectin and cellulose (Riaz, 2006).
79 Hemicellulases (e.g. α -glucuronidase, α -arabinofuranosidase, arabinase, endo-mannanase, β -
80 mannosidase, acetyl xylan esterase, and feruloyl xylan esterase), which depolymerize
81 hemicelluloses, are usually of microbial origin (Juturu and Wu, 2012). However, the cost
82 associated with enzyme purchase and treatment may sometimes be prohibitive. Therefore,
83 technologies such as ultrasound-assisted extraction could be advantageous with respect to
84 enzymatic treatment or enhancing the observed effects. Propagation waves, which results in
85 compression/expansion cycles, are formed in the solvent system upon ultrasound application.

86 During the ultrasound propagation in the solvent system, a decrease in the pressure with
87 consequent generation of bubbles, also known as cavitation, takes place. These microbubbles
88 expand until they collapse next to the surface of the cell wall of the plant material. High pressure
89 and temperature regions are among the factors interacting with the physical integrity of the cell
90 walls, which may facilitate the release of bioactive compounds linked to them (Arvayo-
91 Enríquez et al., 2013; Nadar and Rathod, 2017). Rao and Rathod (2015) reported that ultrasound
92 increases the permeability of the cell wall to the solvent. Therefore, in food systems, an
93 improved interaction of water with the biomolecules present in the test material may be
94 expected.

95 Enzyme and ultrasound treatment may increase the activity of endogenous β -
96 glucosidase, enhance the conversion of conjugated isoflavones into their aglycone forms as well
97 as affecting the antioxidant potential of soymilk. A recent study by Preece et al. (2017)
98 demonstrated that ultrasound treatment improves protein extraction yield during soymilk
99 production. However, to the best of our knowledge, the effect of ultrasound on the identities
100 and concentration of isoflavones as well as the outcome in terms of antioxidant properties have
101 not been addressed. Furthermore, we consider this to be the first report investigating the
102 isoflavone profile, activity of endogenous β -glucosidase and antiradical activity of soymilk as
103 affected by hemicellulase-assisted extraction. Therefore, the effects of both treatments were
104 evaluated for the aforementioned parameters. The results presented here are important for the
105 soymilk industry and may influence the application of soymilk in food formulations. Hence,
106 this contribution will provide means to anticipate potential benefits to the consumers due to the
107 strategies employed.

108

109 2. Materials and methods

110 2.1. Samples, chemicals and solvents

111 Lipoxygenase-free BRS257 soybean samples [*Glycine Max. (L.) Merr*], crop year 2016, were
112 kindly donated by SL Alimentos (Londrina, Paraná, Brazil). Acetylglycoside (acetyl daidzin,
113 acetylgenistin, and acetylglycitin) and malonylglycoside isoflavones (e.g., malonyl daidzin,
114 malonylgenistin, and malonylglycitin) were procured from Wako Pure (Osaka, Japan). β -
115 glucoside isoflavones (daidzin, genistin and glycitin) and all aglycone standards (daidzein,
116 genistein and glycitein) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Folin-
117 Ciocalteu, gallic acid, *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (*p*-NP), 6-hydroxy-2,5,7,8-
118 tetramethylchromane-2-carboxylic acid (trolox), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-
119 sulphonic acid) diammonium salt (ABTS), 2,2'-azobis(2-methylpropionamide)
120 dihydrochloride (AAPH), and hemicellulase from *Aspergillus niger* (0.3-3.0 unit mg⁻¹ solid)
121 were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The remaining chemicals and
122 solvents were of analytical or chromatographic grade and were used as received.

123 2.2. Soymilk preparation

124 Soybean samples were mixed with water at 1:3 (w/v) and macerated at 5 °C for 14 h. The water
125 was drained and the grains were homogenised for 2 min using a M07 Power Mixer (Mondial,
126 Barueri, SP, Brazil) (Baú and Ida, 2015). The homogenate was used to evaluate the effect of
127 hemicellulase- and ultrasound-assisted extraction. To the homogenate, 1.5% hemicellulase was
128 added while stirring for 3 min at 37 °C using a Dubnoff TE-053 water bath (Tecnal, Piracicaba,
129 Brasil). Ultrasound-assisted extraction was evaluated with a Q700 QSonica equipment
130 (Newtown, CT, USA) operated at 20 kHz and 50 W cm⁻². The treatment took 3 min and a 1/2"
131 (13 mm) diameter titanium probe was used. A sample devoid of enzyme or ultrasound treatment

132 was kept as a control. The homogenates were filtered using a 150 mesh cloth. The soymilk so
133 obtained was frozen in a MDF-U32V Sanyo ultra-low temperature freezer (Wood Dale, IL,
134 USA), lyophilized using an Alpha 1-2 LD Plus freeze dryer (Martin Christ, Germany) and
135 stored at -18 °C until further analysis.

136 *2.3. β -Glucosidase activity*

137 Endogenous β -glucosidases were extracted according to de Lima and Ida (2014). The extracts
138 were centrifuged (794 g) for 15 min at 4 °C using an Eppendorf 5804R equipment (Eppendorf,
139 Hamburg, Germany). The upper layer was collected and used for β -glucosidase activity
140 determination (Matsuura and Obata, 1993) as described by de Lima and Ida (2014). The activity
141 unit (AU) is defined as the quantity of β -glucosidase required to release 1 μ mol of *p*-
142 nitrophenyl- β -D-glucopyranoside per min. The β -glucosidase activity was expressed as AU·g⁻¹
143 on a dry weight basis.

144 *2.4 Isoflavone profile and antioxidant potential*

145 *2.4.1 Extraction procedure*

146 Ground soybean, control soymilk as well as the soymilk obtained under hemicelulase- and
147 ultrasound-assisted extraction were lyophilized and defatted with hexane (1:20, w/v) for 1 h
148 using a MA 140/CFT shaker (Marconi, São Paulo, Brazil). Defatted samples [1:20 (w/v)] were
149 extracted with ultrapure water-ethanol-acetone (1:1:1, v/v/v) according to Yoshiara et al.
150 (2018a). This mixture was agitated every 15 min using a vortex for 1 h after which it was
151 ultrasonicated for 15 min using a USC1450 Unique sonicator (Unique, Indaiatuba, Brasil). The
152 supernatants were collected after centrifugation at 794 g for 15 min at 4 °C using an Eppendorf
153 5804 R centrifuge (Hamburg, Germany). The isoflavone-rich extracts so obtained were used
154 for isoflavone profiling and antioxidant activity determinations.

155 2.4.2. *Identification and quantification of isoflavones by ultra performance liquid*
156 *chromatography (UPLC)*

157 The UPLC method described by Falcão et al. (2018) was used for identification and
158 quantification of isoflavones. As each isoflavone has a different molecular weight, the results
159 are expressed as μmol of isoflavone per gram of sample ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$) on a dry weight basis. This
160 would allow to make an accurate discussion on the molecular conversion of conjugated
161 isoflavones to their corresponding aglycones.

162 2.4.5. *Scavenging activity towards ABTS radical cation*

163 The scavenging activity towards ABTS radical cation (Re et al., 1999) was carried as described
164 by Handa et al. (2016). The ABTS radical cation was generated by reacting ABTS (7 mM) with
165 potassium persulphate (2.45 mM). Both chemicals were prepared in distilled water and kept in
166 the dark for 16 h at 25 °C. This stock solution was diluted with phosphate buffered saline (20
167 mM, pH 7.4) to an absorbance of 0.70 ± 0.02 , which was read at 730 nm using a Biochrom
168 Libra S22 spectrophotometer (Biochrom, Cambridge, England). The reaction was carried out
169 with 10 μL of sample and 4 mL of ABTS radical cation for 6 min after which the absorbance
170 was read at 730 nm using the same equipment. The ABTS radical scavenging activity was
171 expressed as trolox equivalents per gram of sample on a dry weight basis.

172 2.4.6. *Scavenging activity towards peroxy radical*

173 The scavenging capacity towards peroxy radical was determined following the procedure
174 described by Melo et al. (2015). Peroxy radical oxidizes fluorescein, therefore changes in the
175 fluorescence decay were recorded. The reaction was carried out in a microplate by mixing the
176 samples (30 μL), 508.25 nM fluorescein (60 μL) and 76 mM AAPH (110 μL). All solutions
177 prepared in 75 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4), which was also used as a blank. The

178 reaction was monitored every min for 2 h at 37 °C. The microplate reader (Molecular Devices,
179 LLC, Sunnyvale, CA, USA) was set at 485 and 528 nm for excitation and emission readings,
180 respectively. The results were expressed as $\mu\text{mol trolox equivalents per gram of sample on a}$
181 dry weight basis.

182 2.5. Statistical analysis

183 A completely randomized design with three replications ($n = 3$) was used. The results were
184 expressed as mean values \pm standard deviation. Data analysis was carried out using ANOVA,
185 Tukey's test ($p < 0.05$) and Statistica 10.0 (StatSoft, Tulsa, OK, USA).

186 3. Results and discussion

187 3.1. Effects of ultrasound and hemicellulase treatment on the activity of endogenous β - 188 *glucosidase*

189 The hydrolysis of conjugated isoflavones with a parallel increase in their respective aglycones
190 may be beneficial due to the higher bioaccessibility of the latter ones in the small intestine.
191 Therefore, consumption of soybean products showing hydrolysed isoflavones may render
192 improved health effects. Control soymilk (devoid of any treatment) showed β -glucosidase
193 activity of $0.17 \pm 0.01 \text{ AU}\cdot\text{g}^{-1}$ (Figure 1). As for the effects of different treatments, soymilk
194 obtained upon HAE or UAE showed 1.3- ($0.22 \pm 0.01 \text{ AU}\cdot\text{g}^{-1}$) and 1.5-fold ($0.26 \pm 0.02 \text{ AU}\cdot\text{g}^{-1}$)
195 ¹⁾ higher β -glucosidase activity than that of the control. Furthermore, all samples showed
196 statistically different enzyme activities ($p < 0.05$). According to the literature (McClements,
197 1995), due to the intense pressures, temperatures and shear forces, high-intensity ultrasound
198 and prolonged exposure may denature protein, thus causing inhibition of the enzyme catalytic
199 activity. However, increased activity following short exposures to ultrasound has also been
200 found. Furthermore, the same author also mentioned that ultrasound may be able to break down

201 molecular aggregates, thus facilitating enzyme approach for the reaction to occur. Lending
202 support to the statements made by McClements (1995), Ma et al. (2011) demonstrated that the
203 activity of Alcalase was increased upon ultrasound treatment (up to 400 W). However, such
204 increasing trend was noted only until 80W. When ultrasonic intensity exceeded 80 W, a
205 decreasing trend was then observed. The same authors also reported that the activity of Alcalase
206 increased when the treatment (80 W) lasted for 4 min, and longer exposure time decreased the
207 enzyme activity. After 10 min of exposure the activity was lower than that of the control.
208 Therefore, the effects of ultrasound treatment appear to be dependent on several parameters
209 but this matter has not yet been entirely clarified. Formation of certain number of α -helix
210 structure, loss of β -sheet and decrease of random coil content are examples of conformational
211 changes of the protein induced by ultrasound (Ma et al., 2011). Due to conformational changes,
212 ultrasound treatment under optimized conditions (e.g. frequency, intensity, time of exposure)
213 may be helpful to increase the activity of added enzymes and to improve the extraction and/or
214 conversion of molecules of interest (Falcão et al., 2018; Ma et al., 2011; Nadar and Rathod,
215 2017).

216 *3.2 Isoflavone profile as affected by ultrasound and hemicellulase treatment*

217 Free radical generation from water molecules is among the mechanisms involved during
218 ultrasound treatment (Delgado-Povedano and de Castro, 2015). Hence, oxidation of bioactive
219 compounds may be contemplated. Furthermore, different phenolic antioxidants may respond
220 differently to oxidative stress. Although the effect of soybean treatment with ultrasound prior
221 to hydration has already been studied (Falcão et al., 2018), the high content of water present in
222 the system during soymilk manufacturing may increase ultrasound-induced detrimental effects
223 on phenolic antioxidants. Furthermore, several pieces of evidence have reported the decrease
224 and/or degradation of antioxidant compounds such as vitamin C, flavonoids, and tocopherols

225 upon ultrasound treatment (Clodoveo et al., 2013; Gamboa-Santos et al., 2013; Jahouach-Rabai
226 et al., 2008; Moradi et al., 2018; Tiwari et al., 2010). Therefore, before industrial application,
227 an in-depth chemical investigation is recommended.

228 Hemicellulase and ultrasound treatment decreased the content of malonyl or β -glucoside
229 isoflavones. However, while the concentration decrease of β -glucoside isoflavones (40%) was
230 equal regardless of the treatment employed, but a higher decrease of malonyl isoflavones (18%)
231 was noted in soymilk obtained upon HAE compared to that of UAE (9.9%). The same trend
232 was observed for their respective aglycones. Furthermore, the lower decrease, and, potential
233 conversion of malonyl isoflavones compared to those of β -glucoside isoflavones may be related
234 to their structural characteristics. The malonyl group linked to the carbon six of the glucose
235 moiety may induce ionic or steric hindrance of the hemicellulase, thus impairing its action
236 (Ismael and Hayes, 2005).

237 In contrast, a positive effect was found in the aglycone group. The concentration of
238 isoflavones in the aglycone form increased to 1.7 and 2.4-fold in the samples subjected to HAE
239 and UAE, respectively, compared to that of the control. Considering the total isoflavone content
240 (Figure 2), the percentage of aglycones increased from 11 (control) to 26% (UAE). Therefore,
241 it is clear that ultrasound treatment is the best option to recover isoflavones in the aglycone
242 form. In addition, the efficiency of increasing the yield of aglycones upon ultrasound treatment
243 was in the order of glycitein > genistein > daidzein.

244 The effect of thermal treatment of soybean flour on the conversion of isoflavones has
245 already been reported (Andrade et al., 2016). However, conversion may not be the best term for
246 the present study, especially in the case of HAE. Figure 3 displays the concentration changes
247 found for each treatment. While the decrease in the concentration of conjugated isoflavones due
248 to UAE rendered an equimolar increase in the total concentration of aglycones, the same was

249 not observed for samples subjected to HAE. The exact reason for that is not clear and warrants
250 further investigation.

251 In summary, the results of this contribution indicate that soymilk obtained under HAE
252 and/or UAE show higher contents of isoflavones in the aglycone form. This may be explained
253 by the hydrolysis of the β -1,4 linkage present between the glycosyl and malonyl moieties thus
254 generating aglycones. However, due to the higher yield of isoflavone aglycones in the sample
255 obtained under UAE as well as due to their equimolar conversion, ultrasound may provide the
256 best option for the food industry.

257 *3.3. Antiradical activity as affected by ultrasound and hemicellulase treatment*

258 The mechanism of action of phenolic compounds has been explained by single electron transfer
259 (SET) or hydrogen atom transfer (HAT) (de Camargo et al., 2017; Leopoldini et al., 2004;
260 Yoshiara et al., 2018b). However, using a single method is insufficient to substantiate the
261 potential antioxidant activity of the test material as well as to support the changes observed
262 upon different food processing methods. Therefore, at least two different assays have been
263 employed for such purposes. The ABTS method relies on SET and it is has been widely
264 employed due to its application to hydrophilic and lipophilic compounds (de Camargo et al.,
265 2017; Leopoldini et al., 2004; Yoshiara et al., 2018b). Furthermore, its short reaction time,
266 usually 6 min, and low amount of sample (e.g. 20-30 μ L), even when the reaction is not carried
267 out in microplates, makes the ABTS one of the most important methods when limited amount
268 of sample and/or compound is available (Oldoni et al., 2016). In addition, at least one method
269 of biological relevance must be used. The oxygen radical absorbance capacity (ORAC) method
270 evaluates the scavenging activity of natural compounds, including (poly)phenols, towards
271 peroxy radicals. According to Granato et al. (2018), ORAC is based on HAT. It is well accepted
272 that similar to other reactive oxygen species (ROS), peroxy radicals are detrimental to lipid

273 and protein, which makes them potentially harmful to biological systems. Peroxyl radicals may
274 cause damage at cellular level as well as in components of biological fluids, and this has been
275 at least partially explained by their relatively long half-life compared to that of hydroxyl
276 radicals. Furthermore, a recent study by de Camargo et al. (2019a) demonstrated that the
277 scavenging activity of phenolic compounds towards peroxyl radical was quite similar to the
278 inhibition of NF- κ B in RAW 264.7 macrophages pre-treated with flavonoid-rich extracts.

279 In the present study, no difference was found between the samples obtained under HAE
280 and UAE towards ABTS radical cation and peroxyl radical (Figure 4). However, regardless of
281 the method employed, both methods showed higher antiradical activity compared to that of the
282 control. In general, such increase has been explained by the higher concentration of isoflavone
283 aglycones present in the test sample (Table 1). However, the isoflavone profile of soybean and
284 its processing products is well established. Therefore, considering this, we have proposed an
285 index to anticipate the potential antioxidant activity of soybean products (Table 2). According
286 to this index, a high positive correlation existed between the aglycone isoflavones/conjugated
287 isoflavones ratio (aISO/cISO) and both radicals. Therefore, our results lend support to the
288 importance of the structure-activity relationship.

289 Several studies have demonstrated that ROS can cause DNA strand breakage (Perera et
290 al., 2018; Pohl et al., 2018; Rahman et al., 2017), which has been used as a biomarker in the
291 screening of natural compounds that may reduce the risk of cancer development. Oxidative
292 stress is common to many non-communicable diseases (NCDs) such as cardiovascular ailments,
293 cancer, diabetes and obesity (Chiu et al., 2018; de Camargo et al., 2018). Furthermore, the
294 ability of phenolic compounds in reducing inflammation is explained primarily by their
295 antioxidant properties (Zhang and Tsao, 2016). Therefore, due to their improved antioxidant
296 potential, soymilk procured under HAE and UAE may render improved health benefits by
297 counteracting the aforementioned health issues. In addition, soymilk is used to produce many

298 food products such as tofu, fermented soymilk, and soy yogurts, to name a few. Thus, soybean
299 products produced with soymilk obtained under HAE and/or UAE may also render products
300 with improved antioxidant properties.

301 **4. Conclusion**

302 Both hemicellulase assisted- and ultrasound-assisted-extraction were demonstrated to influence
303 the activity of endogenous β -glucosidase, the isoflavone profile and the antioxidant potential of
304 soymilk. Endogenous β -glucosidase activity and the contents of isoflavone aglycones were in
305 the decreasing order of ultrasound-assisted extraction > hemicellulase-assisted extraction >
306 control. The present contribution supports the use of ultrasound-assisted extraction to achieve
307 an equimolar conversion from conjugated isoflavones into their respective aglycones. However,
308 further investigations are needed to clarify the reasons behind the efficacy of ultrasound as a
309 novel technology. No differences were found between the antiradical activity of ultrasound-
310 assisted extraction and hemicellulase-assisted extraction, both of which showed higher effects
311 than that of the control. The ratio of aglycone isoflavones to conjugated isoflavones may be
312 used as an index of antioxidant potential and/or quality for such commodities.

313 **Acknowledgments**

314 M. B. R. Silva (Ph.D fellowship), H. G. Falcão (Ph.D. fellowship), and A. C. de Camargo
315 (Postdoctoral fellowship) acknowledge CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal
316 de Nível Superior – Brazil). One of us (F. Shahidi) thanks the Natural Science and Engineering
317 Research Council (NSERC) of Canada for partial financial support. E. I. Ida is a CNPq research
318 fellow (process #305397/2015-0).

319 **Author Contributions**

320 M. B. R. Silva and H. G. Falcão were responsible for the soymilk preparation, chemical
321 analysis, and wrote the first version of the manuscript. L. E. Kurozawa, S. H. Prudencio, and E.
322 I. Ida provided experimental design, and supervised the soymilk preparation, and chemical
323 analysis. M. B. R. Silva, A. C. de Camargo, and E. I. Ida were responsible for statistical analysis
324 and interpreted the data. A. C. de Camargo and E. I. Ida wrote the final manuscript. A. C. de
325 Camargo, F. Shahidi, and E. I. Ida proposed the new quality index of antioxidant potential
326 and/or quality for soybean and its processed products. E. I. Ida and F. Shahidi supervised data
327 interpretation and edited the final manuscript.

328 **References**

- 329 Andrade, J.C., Mandarino, J.M.G., Kurozawa, L.E., and Ida, E.I. (2016). The effect of thermal
330 treatment of whole soybean flour on the conversion of isoflavones and inactivation of
331 trypsin inhibitors. *Food Chem.* 194: 1095-1101.
- 332 Arvayo-Enríquez, H., Mondaca-Fernández, I., Gortárez-Moroyoqui, P., López-Cervantes, J.,
333 and Rodríguez-Ramírez, R. (2013). Carotenoids extraction and quantification: a review.
334 *Anal. Methods*: 5: 2916-2924.
- 335 Baú, T.R., Garcia, S., and Ida, E.I. (2015). Changes in soymilk during fermentation with kefir
336 culture: oligosaccharides hydrolysis and isoflavone aglycone production. *Int. J. Food*
337 *Sci. Nutr.* 66: 845-850.
- 338 Baú, T.R., and Ida, E.I. (2015). Soymilk processing with higher isoflavone aglycone content.
339 *Food Chem.* 183: 161-168.
- 340 Chiu, H.-F., Shen, Y.-C., Venkatakrisnan, K., and Wang, C.-K. (2018). Popular functional
341 foods and nutraceuticals with lipid lowering activity and in relation to cardiovascular

- 342 disease, dyslipidemia, and related complications: an overview. *J. Food Bioact.* 2: 16-
343 27.
- 344 Clodoveo, M. L., Durante, V., and La Notte, D. (2013). Working towards the development of
345 innovative ultrasound equipment for the extraction of virgin olive oil. *Ultrason*
346 *Sonochem.* 20: 1261-1270.
- 347 de Camargo, A. C., Biasoto, A. C. T., Schwember, A. R., Granato, D., Rasesa, G. B., Franchin,
348 M., and Shahidi, F. (2019). Should we ban total phenolics and antioxidant screening
349 methods? The link between antioxidant potential and activation of NF- κ B using
350 phenolic compounds from grape by-products. *Food Chem.* 2019: 290, 229-238a.
- 351 de Camargo, C. A., Favero, T. B., Morzelle, C. M., Franchin, M., Alvarez-Parrilla, E., de la
352 Rosa, A. L., and Schwember, R. A. (2019). Is chickpea a potential substitute for
353 soybean? Phenolic bioactives and potential health benefits. *Int. J. Mol. Sci.* 20: 2644b.
- 354 de Camargo, A. C., Regitano-d'Arce, M. A. B., and Shahidi, F. (2017). Phenolic profile of
355 peanut by-products: antioxidant potential and inhibition of alpha-glucosidase and lipase
356 activities. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 94: 959-971.
- 357 de Camargo, A.C., Regitano-d'Arce, M.A.B., Biasoto, A.C.T., and Shahidi, F. (2016). Enzyme-
358 assisted extraction of phenolics from winemaking by-products: antioxidant potential and
359 inhibition of alpha-glucosidase and lipase activities. *Food Chem.* 212: 395-402.
- 360 de Camargo, A.C., Schwember, A.R., Parada, R., Garcia, S., Maróstica Junior, M.R., Franchin,
361 M., Regitano-d'Arce, M.A.B., and Shahidi, F. (2018). Opinion on the hurdles and
362 potential health benefits in value-added use of plant food processing by-products as
363 sources of phenolic compounds. *Int. J. Mol. Sci.* 19: 3498.
- 364 de Lima, F.S., and Ida, E.I. (2014). Optimisation of soybean hydrothermal treatment for the
365 conversion of β -glucoside isoflavones to aglycones. *LWT - Food Sci. Technol.* 56: 232-
366 239.

- 367 Delgado-Povedano, M.M., and de Castro, M.D.L. (2015). A review on enzyme and ultrasound:
368 A controversial but fruitful relationship. *Anal. Chim. Acta.* 889: 1-21.
- 369 Falcão, H.G., Handa, C.L., Silva, M.B.R., de Camargo, A.C., Shahidi, F., Kurozawa, L.E., and
370 Ida, E.I. (2018). Soybean ultrasound pre-treatment prior to soaking affects β -glucosidase
371 activity, isoflavone profile and soaking time. *Food Chem.* 269: 404-412.
- 372 Farzamirad, V., and Aluko, R. E. (2008). Angiotensin-converting enzyme inhibition and free-
373 radical scavenging properties of cationic peptides derived from soybean protein
374 hydrolysates. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 59, 428-437.
- 375 Fernandes, M.S., de Lima, F.S., Rodrigues, D., Handa, C., Guelfi, M., Garcia, S., and Ida, E. I.
376 (2017). Evaluation of the isoflavone and total phenolic contents of kefir-fermented
377 soymilk storage and after the in vitro digestive system simulation. *Food Chem.* 229:
378 373-380.
- 379 Gamboa-Santos, J., Cristina Soria, A., Pérez-Mateos, M., Carrasco, J. A., Montilla, A., and
380 Villamiel, M. (2013). Vitamin C content and sensorial properties of dehydrated carrots
381 blanched conventionally or by ultrasound. *Food Chem.* 136: 782-788.
- 382 Granato, D., Shahidi, F., Wrolstad, R., Kilmartin, P., Melton, L.D., Hidalgo, F.J., Miyashita,
383 K., Camp, J.V., Alasalvar, C., Ismail, A.B., Elmore, S., Birch, G.G., Charalampopoulos,
384 D., Astley, S.B., Pegg, R., Zhou, P., and Finglas, P. (2018). Antioxidant activity, total
385 phenolics and flavonoids contents: Should we ban in vitro screening methods? *Food*
386 *Chem.* 264: 471-475.
- 387 Handa, C.L., Couto, U.R., Vicensoti, A.H., Georgetti, S. R., and Ida, E. I. (2014). Optimisation
388 of soy flour fermentation parameters to produce β -glucosidase for bioconversion into
389 aglycones. *Food Chem.* 152: 56-65.
- 390 Handa, C.L., de Lima, F.S., Guelfi, M.F.G., Georgetti, S.R., and Ida, E.I. (2016). Multi-
391 response optimisation of the extraction solvent system for phenolics and antioxidant

- 392 activities from fermented soy flour using a simplex-centroid design. *Food Chem.* 197:
393 175-184:
- 394 Ismael, B., and Hayes, K. (2005). β -Glycosidase activity toward different glycosidic forms of
395 isoflavones. *J. Agric. Food Chem.* 53: 4918-4924.
- 396 Izumi, T., Piskula, M. K., Osawa, S., Obata, A., Tobe, K., Saito, M., and Kikuchi, M. (2000).
397 Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their
398 glucosides in humans. *J. Nutr.* 130: 1695-1699.
- 399 Jahouach-Rabai, W., Trabelsi, M., Van Hoed, V., Adams, A., Verhé, R., De Kimpe, N., and
400 Frikha, M.H. (2008). Influence of bleaching by ultrasound on fatty acids and minor
401 compounds of olive oil. Qualitative and quantitative analysis of volatile compounds (by
402 SPME coupled to GC/MS). *Ultrason Sonochem.* 15: 590-597.
- 403 Juturu, V., and Wu, J.C. (2012). Insight into microbial hemicellulases other than xylanases: a
404 review. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 88: 353-363.
- 405 Kalaiselvan, V., Kalaivani, M., Vijayakumar, A., Sureshkumar, K., and Venkateskumar, K.
406 (2010). Current knowledge and future direction of research on soy isoflavones as a
407 therapeutic agents. *Pharmacogn Rev.* 4: 111-117.
- 408 Leopoldini, M., Marino, T., Russo, N., and Toscano, M. (2004). Antioxidant properties of
409 phenolic compounds: H-atom versus electron transfer mechanism. *J. Phys. Chem. A*
410 108: 4916-4922.
- 411 Ma, H., Huang, L., Jia, J., He, R., Luo, L., and Zhu, W. (2011). Effect of energy-gathered
412 ultrasound on Alcalase. *Ultrason Sonochem.* 18: 419-424.
- 413 Matsuura, M., and Obata, A. (1993). β -Glucosidases from soybeans hydrolyze daidzin and
414 genistin. *J. Food Sci.* 58: 144-147.
- 415 McClements, D.J. (1995). Advances in the application of ultrasound in food analysis and
416 processing. *Trends Food Sci. Technol.* 6: 293-299.

- 417 Melo, P.S., Massarioli, A.P., Denny, C., dos Santos, L.F., Franchin, M., Pereira, G.E., Vieira,
418 T.M.F.S., Rosalen, P.L., and Alencar, S.M. (2015). Winery by-products: Extraction
419 optimization, phenolic composition and cytotoxic evaluation to act as a new source of
420 scavenging of reactive oxygen species. *Food Chem.* 181: 160-169.
- 421 Moradi, N., Rahimi, M., Moeini, A., and Parsamoghadam, M.A. (2018). Impact of ultrasound
422 on oil yield and content of functional food ingredients at the oil extraction from
423 sunflower. *Sep. Sci. Technol.* 53: 261-276:
- 424 Nadar, S.S., and Rathod, V.K. (2017). Sonochemical effect on activity and conformation of
425 commercial lipases. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 181: 1435-1453.
- 426 Oldoni, T.L.C., Melo, P.S., Massarioli, A.P., Moreno, I.A.M., Bezerra, R.M.N., Rosalen, P.L.,
427 da Silva, G.V.J., Nascimento, A.M., and Alencar, S.M. (2016). Bioassay-guided
428 isolation of proanthocyanidins with antioxidant activity from peanut (*Arachis hypogaea*)
429 skin by combination of chromatography techniques. *Food Chem.*, 192, 306-312.
- 430 Perera, N., Ambigaipalan, P., and Shahidi, F. (2018). Epigallocatechin gallate (EGCG) esters
431 with different chain lengths fatty acids and their antioxidant activity in food and
432 biological systems. *J. Food Bioact.* 1: 124-133.
- 433 Pohl, F., Goua, M., Bermano, G., Russell, W. R., Scobbie, L., Maciel, P., and Kong Thoo Lin,
434 P. (2018). Revalorisation of rapeseed pomace extracts: An in vitro study into its anti-
435 oxidant and DNA protective properties. *Food Chem.* 239: 323-332.
- 436 Preece, K.E., Hooshyar, N., Krijgsman, A., Fryer, P.J., and Zuidam, N.J. (2017). Intensified
437 soy protein extraction by ultrasound. *Chem. Eng. Process.* 113: 94-101.
- 438 Rahman, M.J., de Camargo, A.C., and Shahidi, F. (2017). Phenolic and polyphenolic profiles
439 of chia seeds and their in vitro biological activities. *J. Funct. Foods* 35: 622-634.

- 440 Rao, P.R., and Rathod, V.K. (2015). Mapping study of an ultrasonic bath for the extraction of
441 andrographolide from *Andrographis paniculata* using ultrasound. *Ind. Crops Prod.* 66:
442 312-318.
- 443 Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., and Rice-Evans, C. (1999).
444 Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay.
445 *Free Radic. Biol. Med.* 26: 1231-1237.
- 446 Riaz, M.N. (2006). Processing of soybeans into ingredients. In: Riaz, M.N. (Ed.). *Soy*
447 *applications in food*. CRC: Taylor & Francis, Boca Raton, FL, p.39-62.
- 448 Shahidi, F., and Peng, H. (2018). Bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds.
449 *J. Food Bioact.* 4: 11-68.
- 450 Tiwari, B.K., Patras, A., Brunton, N., Cullen, P.J., and O'Donnell, C.P. (2010). Effect of
451 ultrasound processing on anthocyanins and color of red grape juice. *Ultrason Sonochem.*
452 17: 598-604.
- 453 Toro-Funes, N., Bosch-Fusté, J., Veciana-Nogués, M.T., and Vidal-Carou, M.C. (2014). Effect
454 of ultra high pressure homogenization treatment on the bioactive compounds of soya
455 milk. *Food Chem.* 152: 597-602.
- 456 Veitch, N.C. (2007). Isoflavonoids of the Leguminosae. *Nat. Prod. Rep.* 24: 417-464.
- 457 Yoshiara, L.Y., Madeira, T.B., de Camargo, A.C., Shahidi, F., and Ida, E.I. (2018a). Multistep
458 optimization of β -glucosidase extraction from germinated soybeans (*Glycine max* L.
459 Merrill) and recovery of isoflavone aglycones. *Foods* 7: 110.
- 460 Yoshiara, L.Y., Mandarino, J.M.G., Carrão-Panizzi, M.C., Madeira, T.B., da Silva, J.B., de
461 Camargo, A.C., Shahidi, F., and Ida, E.I. (2018b). Germination changes the isoflavone
462 profile and increases the antioxidant potential of soybean. *J. Food Bioact.* 3: 144-150.
- 463 Zhang, H., and Tsao, R. (2016). Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-
464 inflammatory effects. *Curr. Opin. Food Sci.* 8: 33-42.
- 465

466 **Table 1.** Isoflavone profile ($\mu\text{mol g}^{-1}$ dw) of soymilk obtained by conventional method
 467 (control), hemicellulase-assisted extraction (HAE), and ultrasound-assisted extraction (UAE)

	control	HAE	UAE
<i>Malonylglucosides</i>	1.72 \pm 0.01 ^a	1.41 \pm 0.02 ^c	1.55 \pm 0.01 ^b
malonyldaidzin	0.57 \pm 0.00 ^a	0.45 \pm 0.01 ^c	0.51 \pm 0.01 ^b
malonylglycitin	0.25 \pm 0.00 ^a	0.21 \pm 0.00 ^c	0.23 \pm 0.00 ^b
malonylgenistin	0.91 \pm 0.00 ^a	0.76 \pm 0.01 ^c	0.82 \pm 0.00 ^b
<i>β-Glucosides</i>	0.47 \pm 0.01 ^a	0.28 \pm 0.01 ^b	0.28 \pm 0.00 ^b
daidzin	0.19 \pm 0.00 ^a	0.12 \pm 0.01 ^b	0.12 \pm 0.00 ^b
glycitin	0.12 \pm 0.00 ^a	0.07 \pm 0.00 ^b	0.07 \pm 0.00 ^b
genistin	0.16 \pm 0.00 ^a	0.09 \pm 0.00 ^b	0.09 \pm 0.00 ^b
<i>Aglycones</i>	0.26 \pm 0.01 ^c	0.44 \pm 0.00 ^b	0.63 \pm 0.04 ^a
daidzein	0.10 \pm 0.01 ^c	0.15 \pm 0.00 ^b	0.21 \pm 0.00 ^a
glycitein	0.05 \pm 0.00 ^c	0.11 \pm 0.00 ^b	0.14 \pm 0.00 ^a
genistein	0.11 \pm 0.02 ^b	0.17 \pm 0.00 ^b	0.28 \pm 0.04 ^a

468 Data represent mean values \pm standard deviation (n = 3). Values followed by the same letters
 469 within a column are not significantly different ($p > 0.05$). DW is dry weight. The contents (μmol
 470 g^{-1} dw) of isoflavones in the original soybean were 1.84 \pm 0.27 (malonylglucosides); 0.62 \pm
 471 0.03 (malonyldaidzin); 0.34 \pm 0.01 (malonylglycitin); 0.88 \pm 0.02 (malonylgenistin); 0.71 \pm
 472 0.02 (β -glucosides); 0.26 \pm 0.01 (daidzin); 0.22 \pm 0.01 (glycitin); 0.23 \pm 0.01 (genistin); 0.17 \pm
 473 0.00 (aglycones); 0.06 \pm 0.00 (daidzein); 0.06 \pm 0.00 (glycitein); 0.06 \pm 0.00 (genistein).

474

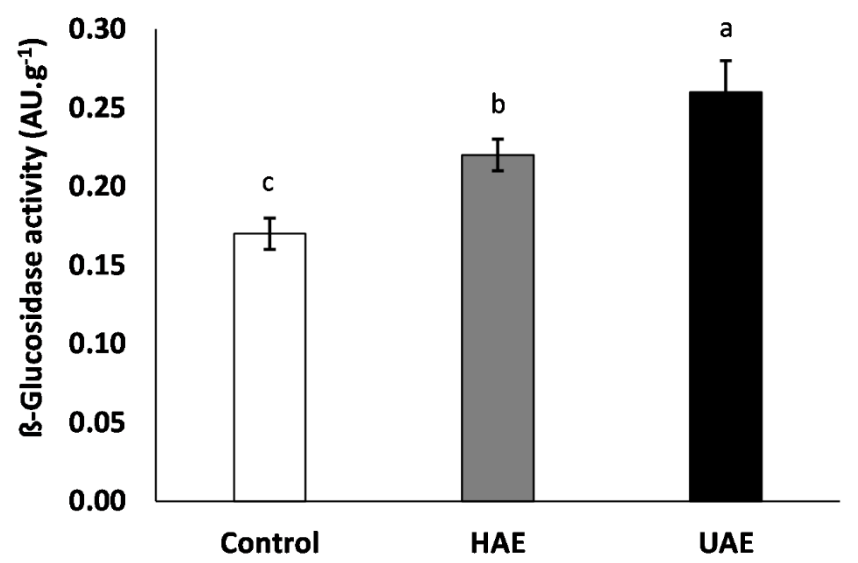
475 **Table 2.** Aglycone to conjugated isoflavone ratio as an index of antioxidant potential

Ratio				
	aISO/cISO	aDAI/cDAI	aGLY/cGLY	aGEN/cGEN
feedstock	0.068 ± 0.003 ^d	0.063 ± 0.002 ^d	0.105 ± 0.005 ^d	0.053 ± 0.001 ^d
control	0.120 ± 0.006 ^c	0.132 ± 0.009 ^c	0.146 ± 0.005 ^c	0.102 ± 0.015 ^c
HAE	0.258 ± 0.002 ^b	0.268 ± 0.003 ^b	0.404 ± 0.005 ^b	0.204 ± 0.000 ^b
UAE	0.345 ± 0.021 ^a	0.327 ± 0.005 ^a	0.475 ± 0.005 ^a	0.314 ± 0.046 ^a
Correlation				
ORAC	0.8846 [*]	0.9273 [*]	0.8899 [*]	0.8332 [*]
ABTS	0.8471 [*]	0.8860 [*]	0.8436 [*]	0.8053 [*]

476 Abbreviations are: aISO, aglycone isoflavones; cISO, conjugated isoflavones; aDAI, daidzein;
477 cDAI, conjugated daidzein; aGLY, glycitein; cGLY, conjugated glycitein; aGEN, genistein;
478 cGEN, conjugated genistein; Data represent mean values ± standard deviation (n = 3). Values
479 followed by the same letters within a column are not significantly different ($p > 0.05$).

480 ^{*}significant at $p < 0.05$.

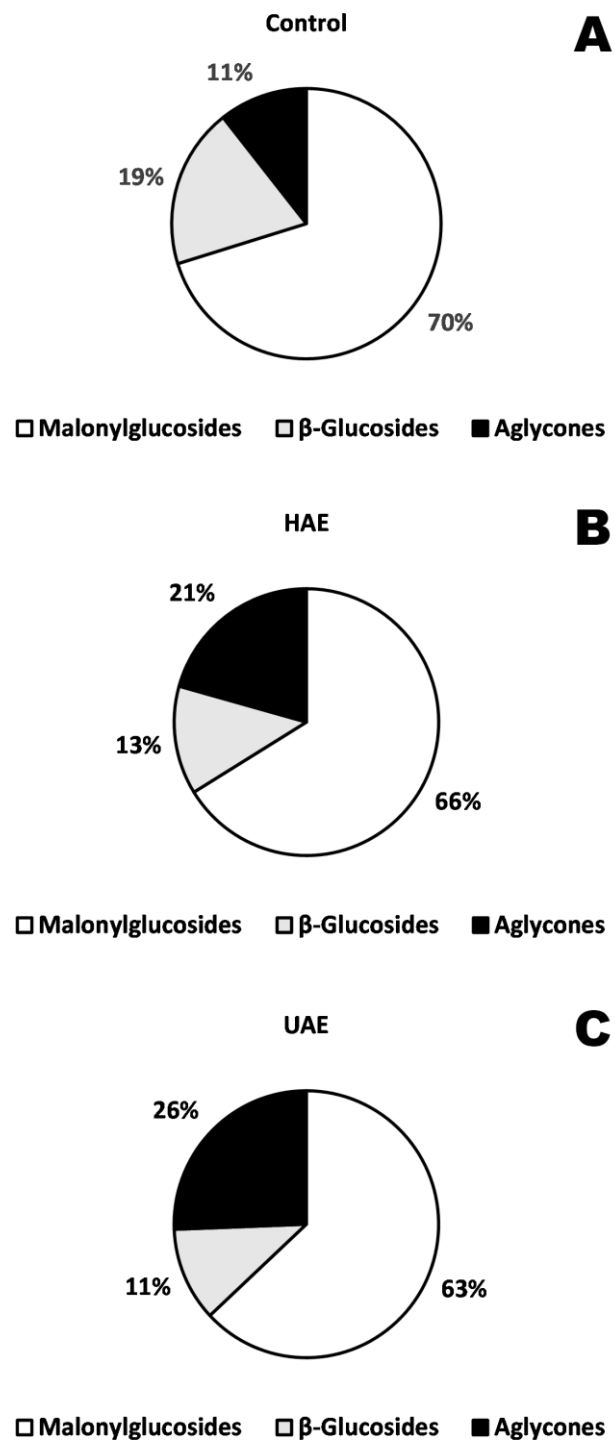
481



482

483 **Figure 1.** Effect of hemicellulase-assisted extraction (HAE) and ultrasound-assisted extraction
484 (UAE) on the activity of endogenous β -glucosidase. Means with different letters show
485 difference among treatments ($p < 0.05$).

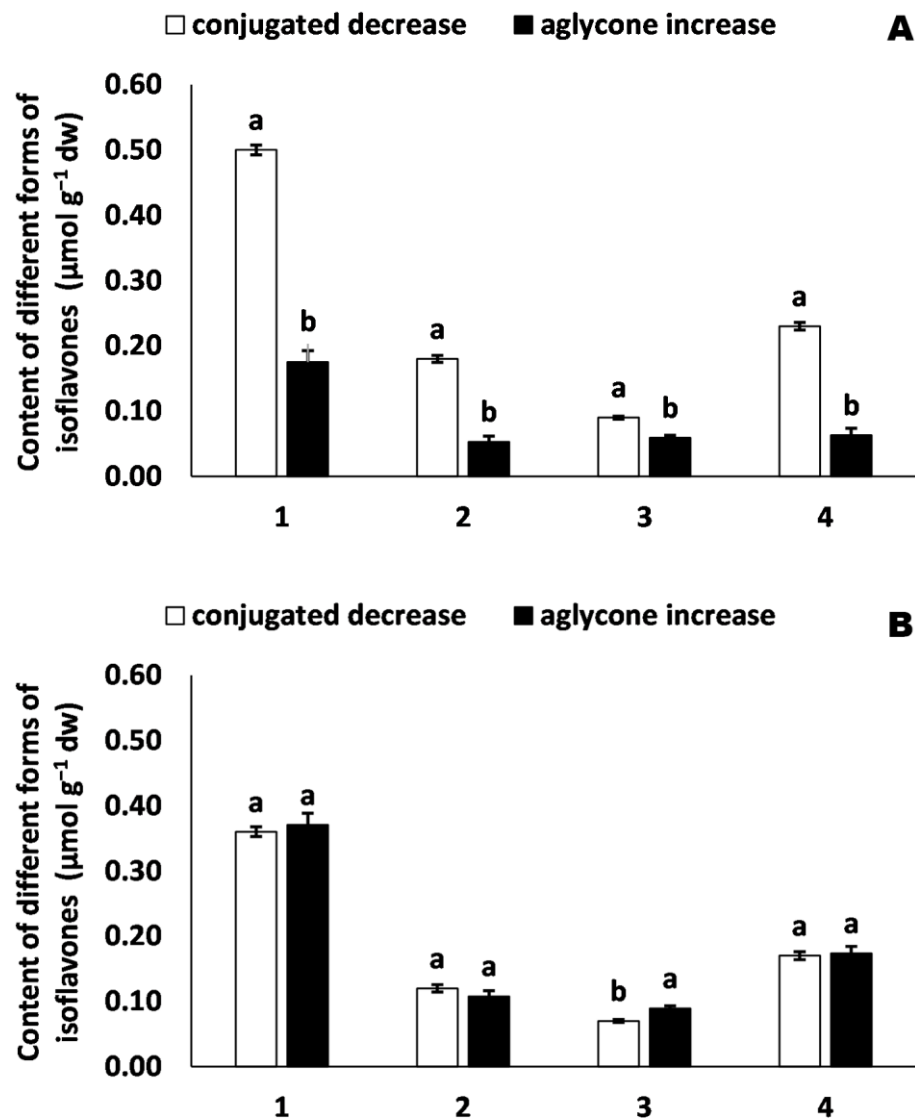
486



487

488 **Figure 2.** The contribution of different forms of isoflavones in soymilk as affected by
 489 hemicellulase-assisted extraction (HAE) and ultrasound-assisted extraction (UAE).

490



491

492 **Figure 3.** Concentration changes of different forms of isoflavones in soymilk as affected by

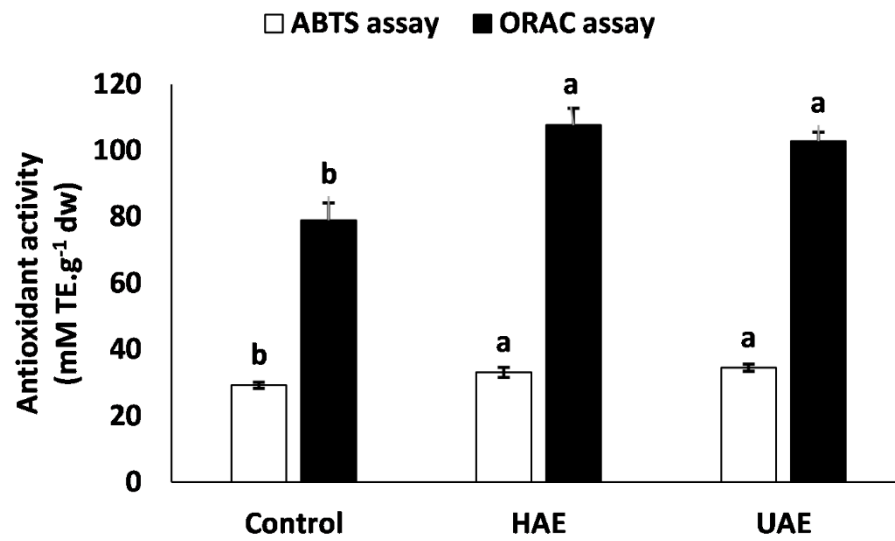
493 hemicellulase-assisted extraction (A) and ultrasound-assisted extraction (B). #1, 2, 3, and 4

494 (blank bars) are total conjugated isoflavones, conjugated daidzein, conjugated glycitein, and

495 conjugated genistein, respectively. The same numbers (black bars) are total aglycone

496 isoflavones, daidzein, glycitein, and genistein, respectively.

497



498

499 **Figure 4.** Antiradical activity of soymilk produced under hemicellulase-assisted extraction
500 (HAE) and ultrasound-assisted extraction (UAE). Data represent the mean \pm standard deviation
501 of each sample (n = 3). Means with different letters indicate significant differences ($p < 0.05$)
502 among treatments, considering each assay.

1 5.2 ARTIGO CIENTÍFICO 2

2 **Effect of ultrasound- and hemicellulase-assisted extraction on the bioactive amine**
3 **content of soymilk**

4 Mariah Benine Ramos Silva^{a*}; Louise Emy Kurosawa^b; Sandra Helena Prudencio^a;
5 Maria Luz Latorre-Moratalla^{c,d,e}; Maria Teresa Veciana-Nogués^{c,d,e}; Maria del Carmen
6 Vidal-Carou^{c,d,e}; Elza Iouko Ida^{a*}

7 ^aDepartment of Food Science and Technology, Londrina State University, Londrina,
8 Brazil

9 ^bDepartment of Food Engineering, Faculty of Food Engineering, University of Campinas,
10 Campinas, Brazil

11 ^cDepartment of Nutrition, Food Sciences and Gastronomy, Faculty of Pharmacy and Food
12 Sciences, University of Barcelona (UB), Santa Coloma de Gramenet, Spain

13 ^dResearch Institute of Nutrition and Food Safety of the University of Barcelona
14 (INSA-UB), Santa Coloma de Gramenet, Spain

15 ^eCatalonian Reference Network on Food Technology (XaRTA), Barcelona, Spain

16 *Corresponding authors:

17 Mariah Benine Ramos Silva and Elza Iouko Ida, Londrina State University, Department
18 of Food Science and Technology, 86051-990 Londrina, Parana State, Brazil.

19 E-mail addresses: mariah_benine@hotmail.com, elida@uel.br

20

21 **Abstract**

22 Bioactive amines are found in soybean and soy products. Hemicellulase addition and
23 ultrasound application to homogenates can influence the extraction of these compounds
24 from soymilk. This study aimed to determine the profile and content of bioactive amines
25 in soybean and soymilk subjected to hemicellulase- and ultrasound-assisted extraction
26 (HAE and UAE, respectively). Furthermore, the effects of hemicellulase, ultrasound
27 intensity, and treatment time on the extraction of bioactive amines were investigated
28 using a central composite rotatable design (CCRD). The bioactive amine content was
29 determined by ultra-performance liquid chromatography (UPLC). The same profile and
30 different contents of bioactive amines (putrescine (PU), cadaverine (CA), agmatine
31 (AGM), spermidine (SPD), and spermine (SPM), with predominance of spermidine) were
32 observed in soybean BRS257 and in soymilk subjected to HAE and UAE. The
33 investigated variables showed different linear, quadratic, and interaction effects on the
34 PU, CA, AGM, and SPD response functions, whereas no significant effects were
35 observed in the SPM case. Therefore, the CCRD was shown to be an adequate approach
36 to obtain predictive models; moreover, maximum PU, CA, AGM, and SPD response
37 functions in soymilk were obtained when 2.34% hemicellulase, 50 W cm⁻² ultrasound
38 intensity, and 6.36 min treatment time were used in the treatment.

39 **Keywords:** Polyamines; Biogenic amines; *Glycine max*; Enzymes; Sonication.

40 **1. Introduction**

41 Soybean (*Glycine max*) is a legume originating from China and one of the most widely
42 used ingredients in the food industry. Soymilk is widely consumed in East Asian countries
43 as a traditional protein beverage, because of its potential health benefits and also as an
44 alternative to cow's milk for lactose-intolerant individuals, those allergic to milk proteins,
45 or those avoiding milk for other reasons (Reilly et al. 2006). It can be consumed as such
46 or used in the preparation of tofu, fermented soymilk, and soy yogurt, among the others.
47 Soymilk has recently become popular in Western countries because of its high nutritional
48 value and health benefits, mainly attributed to its contents of proteins, peptides,
49 isoflavones, saponins, phytic acid, lecithins, protein inhibitors, phytosterols, polyamines,
50 and tocopherols.

51 Bioactive amines are organic bases of low molecular weight and aliphatic,
52 aromatic, or heterocyclic structure, with various biological functions in animals, plants,
53 and microorganisms. They can be classified into two groups according to their origin.
54 Biogenic amines, including histamine (HI), serotonin (SE), tyramine (TY), tryptamine
55 (TR), and β -phenylethylamine (PHE), are mainly formed after amino acid
56 decarboxylation or by amination and transamination of aldehydes and ketones. On the
57 other hand, the spermine (SPM) and spermidine (SPD) polyamines are physiologically
58 present in all animal and plant tissues. However, putrescine and cadaverine can also be
59 considered as naturally occurring amines in some foods, as they can be synthesized in
60 low amounts in plant and animal organisms (Toro-Funes et al. 2015). In raw vegetables,
61 amines are formed via the activity of some enzymes, whereas in processed foods they are
62 produced by the action of microorganisms, which, depending on the amine and its
63 concentration, can often be a signal of contamination (Gomez-Gomez et al. 2018).

64 Bioactive amines are found in various types of foods, such as fruits and
65 vegetables, fish and fish products, meat and meat products, cheese, wine, and beer (Vidal-
66 Carou et al. 2007 ; Spano et al. 2010). The presence of putrescine (PU), cadaverine (CA),
67 agmatine (AGM), spermidine, and spermine has been observed in different soybean
68 cultivars (Glória et al. 2005) and in non-fermented soybean products (tofu, soymilk, and
69 sprouts). In addition to these amines, tyramine, histamine, tryptamine, and
70 phenylethylamine were also reported in fermented soybean products, such as natto,
71 tempeh, miso, tamari, soy sauce, soybean paste, and sufu (Toro-Funes et al. 2015).

72 Although low levels of biogenic amines in food are not considered a serious risk
73 to human health, when consumed in excessive amounts they can cause distinct
74 pharmacological, physiological, and toxic effects (Glória 2006). Therefore, there is a
75 great interest in the investigation of the content of biogenic amines in food, due to their
76 possible toxicity. This parameter has been used as a quality indicator of the hygienic
77 conditions of raw materials and /or manufacturing practices, since their accumulation is
78 associated with the activity of contaminant bacteria (Latorre-Moratalla et al. 2008 ;
79 Linares et al. 2011). However, legal limits have only been established for HI in fish and
80 fish products by the Food and Drug Administration (FDA) and European Union (EU),
81 once histamine was reported as the main cause of outbreaks of food poisoning and
82 intolerance (Directive 2073/2005/EC ; Directive 1019/2013/EC ; FDA, 2011; Biji et al.
83 2016).

84 Polyamines play an important role in the growth, normal function, and cell
85 proliferation of animals and plants. Moreover, they are involved in the regulation of
86 inflammatory reactions (Moinard et al., 2005) and exert suppressive effects on pulmonary
87 and intestinal immunoallergic responses (Hoet and Nemery 2000). They are also known
88 as antioxidant compounds and have protective effects against cardiovascular diseases,

89 diabetes, and in the prevention of food allergies (Löser 2000 ; Wallace et al. 2003 ; Soda
90 2010 ; Toro-Funes et al. 2013). On the other hand, the promotion of cell growth can be a
91 negative factor in cancer development as well as tumor invasion and metastasis (Gerner
92 and Meyskens 2004).

93 Polyamine formation in food depends on factors such as availability of free amino
94 acids, high processing temperature, along with the presence and favorable growth
95 conditions of positive decarboxylase microorganisms. This is because free amino acids
96 can be naturally present in food or released after proteolytic action/thermal degradation
97 of proteins (Kalač 2014). In plants, polyamines are found in vacuoles and chloroplasts
98 and are mainly associated with cell walls in free or conjugated phenolic acid forms (Colli
99 2004). Because these barriers prevent the release of intracellular substances, the
100 development and application of methods to facilitate or improve the extraction of these
101 phytochemicals are highly needed. Thus, new technologies such as three-phase partition,
102 microwave, enzyme- and/or ultrasound-assisted extraction, supercritical fluid extraction,
103 and high-pressure extraction have been applied to improve the release and extraction of
104 these compounds (Sasidharan et al. 2011 ; Nadar el al. 2018).

105 However, to the best of our knowledge, the effects of hemicellulase and
106 ultrasound-assisted extraction (HAE and UAE, respectively) on the identities and
107 concentration of bioactive amines in soymilk have not been determined. Therefore, this
108 work aims to determine the profile and content of bioactive amines in soybean and
109 soymilk subjected to hemicellulase- and ultrasound-assisted extraction, and to investigate
110 the effects of hemicellulase, ultrasound intensity, and treatment time using a central
111 composite rotatable design (CCRD) for the extraction of bioactive amines from soymilk.
112 Soybean (*Glycine max*) is a legume originating from China and one of the most widely
113 used ingredients in the food industry. Soymilk is widely consumed in East Asian countries

114 as a traditional protein beverage, because of its potential health benefits and also as an
115 alternative to cow's milk for lactose-intolerant individuals, those allergic to milk proteins,
116 or those avoiding milk for other reasons (Reilly et al. 2006). It can be consumed as such
117 or used in the preparation of tofu, fermented soymilk, and soy yogurt, among the others.
118 Soymilk has recently become popular in Western countries because of its high nutritional
119 value and health benefits, mainly attributed to its contents of proteins, peptides,
120 isoflavones, saponins, phytic acid, lecithins, protein inhibitors, phytosterols, polyamines,
121 and tocopherols.

122 Bioactive amines are organic bases of low molecular weight and aliphatic,
123 aromatic, or heterocyclic structure, with various biological functions in animals, plants,
124 and microorganisms. They can be classified into two groups according to their origin.
125 Biogenic amines, including histamine (HI), serotonin (SE), tyramine (TY), tryptamine
126 (TR), and β -phenylethylamine (PHE), are mainly formed after amino acid
127 decarboxylation or by amination and transamination of aldehydes and ketones. On the
128 other hand, the spermine (SPM) and spermidine (SPD) polyamines are physiologically
129 present in all animal and plant tissues. However, putrescine and cadaverine can also be
130 considered as naturally occurring amines in some foods, as they can be synthesized in
131 low amounts in plant and animal organisms (Toro-Funes et al. 2015). In raw vegetables,
132 amines are formed via the activity of some enzymes, whereas in processed foods they are
133 produced by the action of microorganisms, which, depending on the amine and its
134 concentration, can often be a signal of contamination (Gomez-Gomez et al. 2018).

135 Bioactive amines are found in various types of foods, such as fruits and
136 vegetables, fish and fish products, meat and meat products, cheese, wine, and beer (Vidal-
137 Carou et al. 2007 ; Spano et al. 2010). The presence of putrescine (PU), cadaverine (CA),
138 agmatine (AGM), spermidine, and spermine has been observed in different soybean

139 cultivars (Glória et al. 2005) and in non-fermented soybean products (tofu, soymilk, and
140 sprouts). In addition to these amines, tyramine, histamine, tryptamine, and
141 phenylethylamine were also reported in fermented soybean products, such as natto,
142 tempeh, miso, tamari, soy sauce, soybean paste, and sufu (Toro-Funes et al. 2015).

143 Although low levels of biogenic amines in food are not considered a serious risk
144 to human health, when consumed in excessive amounts they can cause distinct
145 pharmacological, physiological, and toxic effects (Glória 2006). Therefore, there is a
146 great interest in the investigation of the content of biogenic amines in food, due to their
147 possible toxicity. This parameter has been used as a quality indicator of the hygienic
148 conditions of raw materials and /or manufacturing practices, since their accumulation is
149 associated with the activity of contaminant bacteria (Latorre-Moratalla et al. 2008 ;
150 Linares et al. 2011). However, legal limits have only been established for HI in fish and
151 fish products by the Food and Drug Administration (FDA) and European Union (EU),
152 once histamine was reported as the main cause of outbreaks of food poisoning and
153 intolerance (Directive 2073/2005/EC ; Directive 1019/2013/EC ; FDA, 2011; Biji et al.
154 2016).

155 Polyamines play an important role in the growth, normal function, and cell
156 proliferation of animals and plants. Moreover, they are involved in the regulation of
157 inflammatory reactions (Moinard et al., 2005) and exert suppressive effects on pulmonary
158 and intestinal immunoallergic responses (Hoet and Nemery 2000). They are also known
159 as antioxidant compounds and have protective effects against cardiovascular diseases,
160 diabetes, and in the prevention of food allergies (Löser 2000 ; Wallace et al. 2003 ; Soda
161 2010 ; Toro-Funes et al. 2013). On the other hand, the promotion of cell growth can be a
162 negative factor in cancer development as well as tumor invasion and metastasis (Gerner
163 and Meyskens 2004).

164 Polyamine formation in food depends on factors such as availability of free amino
165 acids, high processing temperature, along with the presence and favorable growth
166 conditions of positive decarboxylase microorganisms. This is because free amino acids
167 can be naturally present in food or released after proteolytic action/thermal degradation
168 of proteins (Kalač 2014). In plants, polyamines are found in vacuoles and chloroplasts
169 and are mainly associated with cell walls in free or conjugated phenolic acid forms (Colli
170 2004). Because these barriers prevent the release of intracellular substances, the
171 development and application of methods to facilitate or improve the extraction of these
172 phytochemicals are highly needed. Thus, new technologies such as three-phase partition,
173 microwave, enzyme- and/or ultrasound-assisted extraction, supercritical fluid extraction,
174 and high-pressure extraction have been applied to improve the release and extraction of
175 these compounds (Sasidharan et al. 2011 ; Nadar el al. 2018).

176 However, to the best of our knowledge, the effects of hemicellulase and
177 ultrasound-assisted extraction (HAE and UAE, respectively) on the identities and
178 concentration of bioactive amines in soymilk have not been determined. Therefore, this
179 work aims to determine the profile and content of bioactive amines in soybean and
180 soymilk subjected to hemicellulase- and ultrasound-assisted extraction, and to investigate
181 the effects of hemicellulase, ultrasound intensity, and treatment time using a central
182 composite rotatable design (CCRD) for the extraction of bioactive amines from soymilk.

183 **2. Materials and methods**

184 *2.1. Samples, chemicals, and solvents*

185 Lipxygenase-free BRS257 soybean samples [*Glycine Max.* (L.) Merr, crop year 2016]
186 were kindly donated by SL Alimentos (Londrina, Paraná, Brazil). Hemicellulase from
187 *Aspergillus niger* (0.3–3.0 units mg⁻¹ solid), biogenic amines and polyamine standards

188 [HI dihydrochloride, TY free base, PHE hydrochloride, SE creatinine sulphate, TR
189 hydrochloride, octopamine (OC) free base, dopamine (DO) free base, CA
190 dihydrochloride, PU hydrochloride, AGM sulphate, SPM tetrahydrochloride, and SPD
191 trihydrochloride], as well as *o*-phthalaldehyde (OPA) were purchased from Sigma-
192 Aldrich (St. Louis, MO, USA). High-performance liquid chromatography (HPLC)-grade
193 acetonitrile and methanol were obtained from SDS (Peppin, France). The other reagent-
194 grade chemicals used in this work were: sodium acetate anhydrous, Brij 35, 2-
195 mercaptoethanol, and acetic acid (Merck, Darmstadt, Germany); sodium octanesulfonate
196 (Romil Chemicals, Cambridge, UK); boric acid, potassium hydroxide, hydrochloric acid
197 (35%), and perchloric acid (70%) (Panreac, Montplet & Esteban, Barcelona, Spain). The
198 remaining chemicals and solvents were of analytical or chromatographic grade and used
199 as received.

200 2.2. *Soymilk preparation*

201 Soybean samples were mixed with water in 1:3 (w/v) ratio and macerated at 5 °C for 14
202 h according to the procedure reported by Baú and Ida (2015). After draining water, the
203 grains were homogenized for 2 min using a M07 power mixer (Mondial, Barueri, SP,
204 Brazil) with water in 1:8 (w/v) ratio at 25 °C, as described by Silva et al. (2019). Two
205 experiments (denoted as experiment I and II) were performed on the obtained
206 homogenates. After the experiments, the homogenates were filtered using a 150-mesh
207 cloth. The soymilk obtained in this way was frozen in a Sanyo MDF-U32V ultra-low
208 temperature freezer (Wood Dale, IL, USA), lyophilized using an Alpha 1-2 LD Plus
209 freeze dryer (Martin Christ, Germany), and stored at -18 °C until further analysis.

210 *2.3. Experiment I: hemicellulase- and ultrasound-assisted extraction of bioactive amines*
211 *from soymilk*

212 The first experiment was performed to investigate the hemicellulase- and ultrasound-
213 assisted extraction of bioactive amine from soymilk. As described by Silva et al. (2019)
214 a completely randomized design with three replicates ($n = 3$) was used. Then, 1.5% of
215 hemicellulase was added to the homogenate, while stirring for 3 min at 37 °C using a
216 Dubnoff TE-053 water bath (Tecnal, Piracicaba, Brasil). The ultrasound-assisted
217 extraction was investigated with a Q700 QSonica equipment (Newtown, CT, USA)
218 operated at 20 kHz and 50 W cm⁻². The treatment was carried out for 3 min, using a 1/2"
219 (13 mm)-diameter titanium probe. A sample not subjected to enzyme or ultrasound
220 treatments was kept as control. The contents of bioactive amines were expressed as mean
221 values \pm standard deviation. Data analysis was carried out by analysis of variance
222 (ANOVA) and Tukey's test ($p < 0.05$), using the Statistica 10.0 software (StatSoft, Tulsa,
223 OK, USA).

224 *2.4. Experiment II: effects of hemicellulase, ultrasound intensity, and treatment time on*
225 *bioactive amine extraction from soymilk*

226 The second experiment was carried out using the CCRD approach to investigate the
227 effects of hemicellulase, ultrasound intensity, and time on the extraction of bioactive
228 amines from soymilk. The independent variables ($X_1 = \%$ hemicellulase, $X_2 =$ ultrasound
229 intensity, and $X_3 =$ treatment time), as well as their ranges, are shown in Table 1. A total
230 of 20 experiments (8 factorial points, 6 axial points, and 6 replicates of the central point)
231 were conducted in a random manner. The response functions (mg kg⁻¹ of sample) of PU,
232 CA, AGM, SPD, and SPM were then evaluated.

233 The response functions were subjected to regression analysis and ANOVA to
 234 evaluate linear and quadratic effects, as well as their interaction. The estimated models
 235 were evaluated by analyzing the coefficient of determination (R^2) and its adjusted value
 236 (R^2_{adj}), as well as the lack-of-fit significance ($p_{lack-of-fit}$). Some non-significant terms were
 237 removed from the models, followed by a new statistical evaluation for validation
 238 purposes. The obtained model was used to estimate the response functions (highest
 239 adjusted coefficient) (Granato, de Araújo Calado, & Jarvis, 2014). The experimental
 240 CCRD results were fitted using the response surface regression procedure, with the
 241 following second-order polynomial equation: $Y = \beta_0 + \beta_j + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_{ii}^2 +$
 242 $\sum_{i \neq j=1}^k \beta_{ij} X_i X_j + e$ where Y represents the predicted response function, x_i , and x_j are the
 243 coded independent variables (i and j vary from 1 to k), β_0 is the model intercept, β_j is the
 244 block coefficient, and β_i , β_{ii} , and β_{ij} are the regression coefficients for the linear, quadratic,
 245 and interactive effects of the model, respectively, ε is the error and k is the number of
 246 factors (in case of this study, $k = 3$). The adjusted models were used to evaluate all
 247 response functions ($p < 0.05$). Desirability parameters and three-dimensional response
 248 surfaces were used to describe the effects of the independent variables on the response
 249 functions and thus determine the region of maximum response for each evaluated
 250 function. Response surface graphs and multi-response desirability parameters, used to
 251 verify the maximum response for each function (PU, CA, AGM, SPD, and SPM), were
 252 generated using the Statistica 10.0 software (StatSoft, Tulsa, OK, USA). According to
 253 Yolmeh and Jafari (2017), the overall desirability function, $d_i(Y_i)$, assigns values between
 254 0 and 1 to the possible values of Y_i (response function): $d_i(Y_i) = 0$ represents a completely
 255 undesirable value of Y_i , while $d_i(Y_i) = 1$ represents a fully desirable or ideal response
 256 value. The individual desirability values were combined using their geometric mean,
 257 which yielded the overall desirability.

258 2.5. Identification and quantification of bioactive amines

259 The identification and quantification of bioactive amines in ground soybean, as well as in
260 HAE-treated, UAE-treated, and control soymilk samples from experiment I and in
261 soymilk from experiment II were performed as described by Latorre-Moratalla et al.
262 (2009). In this procedure, a 0.3–0.7 g aliquot of homogenized sample was extracted twice
263 with 2–5 mL of 0.6 M perchloric acid in a magnetic stirring plate for 20 min. Thereafter,
264 the two phases were separated by centrifugation at 5600 g and 4 °C for 20 min. The
265 collected supernatants were combined and passed through a 0.22 µm filter before
266 chromatographic analysis. The analysis of biogenic amines and polyamines, namely
267 octopamine, dopamine, tyramine, putrescine, cadaverine, histamine, agmatine, serotonin,
268 phenylethylamine, spermidine, tryptamine, and spermine, was performed using an
269 Acquity UPLC BEH C-18 reverse-phase column (Waters Corp., Milford, MA, USA),
270 followed by post-column derivatization with o-phthalaldehyde and spectrofluorimetric
271 detection. The detection and determination limits were different for each amine. The
272 results were expressed as mg amine kg⁻¹ sample, on a dry basis.

273 3. Results and discussion

274 3.1. Profile and bioactive amine content in soybean, HAE- and UAE-treated soymilk 275 samples (experiment I)

276 Among the twelve bioactive amines analyzed in soybean, control soymilk (untreated), as
277 well as HAE- and UAE-treated soymilk, only five (putrescine, cadaverine, agmatine,
278 spermidine, and spermine) were detected (Table 2). The other seven bioactive amines
279 (octopamine, dopamine, tyramine, serotonin, histamine, β-phenylethylamine, and
280 tryptamine) were not detected in these samples. Similar results for putrescine, agmatine,

281 spermidine, and spermine in soybeans were reported by Okamoto et al. (1997) and Kim
282 et al. (2004). The presence of cadaverine in different soybean cultivars was first reported
283 by Glória et al. (2005). Cadaverine is a diamine that can be formed by decarboxylation of
284 lysine and has restricted occurrence, being found mainly in species of the Leguminosae
285 family, as in the case of soybean. Similar results for the putrescine, spermidine, and
286 spermine in soybean were obtained by Kalač et al. (2005) and Nishibori et al. (2007). The
287 presence of spermidine and spermine in soybean as well as in soymilk was expected, as
288 these polyamines are ubiquitous in foods of plant origin, together with their diamine
289 precursor, putrescine. Polyamines play a critical role in various biological processes,
290 including cell proliferation and differentiation, and also have antioxidant properties
291 (Muñoz-Esparza et al. 2019). Spermidine was the predominant (59.20%) among the five
292 bioactive amines detected in the soybean sample (Table 2), followed by spermine
293 (25.72%), and then by agmatine, putrescine, and cadaverine in lower concentrations
294 (5.95, 5.87, and 3.27%, respectively). The relative fractions of these bioactive amines in
295 soybean agree with those reported by Glória et al. (2005) in seven cultivars harvested
296 over two consecutive years. In the same way, the control soymilk and HAE- and UAE-
297 treated soymilk samples (Table 2) showed higher spermidine and spermine levels.
298 According to Muñoz-Esparza et al. (2019) the food categories with the highest contents
299 of spermidine and spermine are cereals, legumes, and soy derivatives.

300 The UAE-treated soymilk sample showed higher contents of putrescine,
301 cadaverine, agmatine, spermidine, and spermine than the corresponding control and
302 HAE-treated samples. The contents of putrescine in the soymilk control and UAE-treated
303 samples did not show significant differences, and were 1.33 times higher than the PU
304 content in the HAE-treated sample. The cadaverine and spermidine contents in soymilk
305 subjected to UAE were 1.48 and 1.35 times higher than those of the soymilk control and

306 HAE-treated samples, respectively. The content of agmatine in the UAE-treated sample
307 was 1.49 times higher than that of the HAE-treated sample and 1.65 times higher than
308 that of the soymilk control. The spermine content in the UAE-treated sample was 1.27
309 and 1.42 times higher than that of the soymilk control and HAE-treated samples,
310 respectively. The content of tyramine, tryptamine, histamine, and spermidine in soymilk
311 was quantified by Saaid et al. (2009), but putrescine was not detected in their study.
312 Moreover, Toro-Funes et al. (2015) observed the presence of only cadaverine, putrescine,
313 spermidine, and spermine in soymilk. According to Minois et al. (2011), the spermidine
314 and spermine polyamines play an important role in oxidative stress and prevention of
315 aging. In the soymilk control (Table 2), the bioactive amine content was observed to
316 decrease after soybean processing, possibly due to the fact that these compounds are
317 bound to the cell wall and thus were not solubilized and remained in the residue (okara).
318 However, the hemicellulase and ultrasound treatments affected the content of bioactive
319 amines, with increased extraction of putrescine, cadaverine, agmatine, spermidine, and
320 spermine. Thus, considering that the HAE and UAE treatments influenced the extraction
321 of bioactive amines, the second experiment was performed using the CCRD approach to
322 evaluate the effects of hemicellulase, ultrasound intensity, and time on the bioactive
323 amine contents in soymilk.

324 *3.2. Effects of hemicellulase, ultrasound intensity, and treatment time on bioactive amine* 325 *content in soymilk (experiment II)*

326 The regression coefficients and ANOVA results of the PU, CA, AGM, SPD, and SPM
327 response functions are shown in Table 3. Different significant linear, quadratic, and
328 interaction effects were observed for PU, CA, AGM, and SPD, whereas no significant
329 effects were observed for the SPM response function (Table 3). As mentioned above,

330 some non-significant terms were kept in the response functions to refine the model (higher
 331 R^2_{adj}). The maximum bioactive amine contents (Table 1) were found in assay 6 ($x_1 = 1$,
 332 $x_2 = -1$, $x_3 = 1$), with 16.21 mg kg⁻¹ of putrescine, 7.71 mg kg⁻¹ of cadaverine, 15.19 mg
 333 kg⁻¹ of agmatine, and 128.51 mg kg⁻¹ of spermidine. Spermine had similar maximum
 334 values in assays 4, 13, 15, 17, and 18.

335 The PU response function displayed a significant and positive effect only for the
 336 interaction between %hemicellulase and treatment time (x_1x_3). Due to the contribution to
 337 the model adjustment, both the linear effects of ultrasound intensity (x_2) and treatment
 338 time (x_3) and the quadratic effects of ultrasound intensity (x_2^2) and treatment time (x_3^2)
 339 were positive, while the quadratic effects of %hemicellulase (x_1^2) and the interaction
 340 between %hemicellulase and ultrasound intensity (x_1x_2) were negative and included in
 341 the model. The model equation $PU = 12.98 + 0.16x_1 - 0.40x_1^2 + 0.42x_2 + 0.34x_2^2 + 0.34x_3$
 342 $+ 0.46x_3^2 - 1.02x_1x_2 + 1.34x_1x_3$ exhibited an R^2 value of 0.57, and the lack of fit was not
 343 significant ($p > 0.05$). The response surface (Figure 1a) and desirability parameters
 344 (Figure 2) showed an optimal region with maximum PU response (18.61 mg kg⁻¹) when
 345 X_1 , X_2 , and X_3 were in the 1.5–2.34%, 13–87 W cm⁻², and 5–6.36 min ranges,
 346 respectively, corresponding to $0 < x_1 < 1.68$, $-1.68 < x_2 < 1.68$, and $1 < x_3 < 1.68$.

347 The CA response function showed significant and positive effects for the linear
 348 coefficient of the treatment time (x_3), the quadratic coefficient of the ultrasound intensity
 349 (x_2^2), and the interaction between %hemicellulase and treatment time (x_1x_3), whereas a
 350 negative effect was observed for the interaction between %hemicellulase and ultrasound
 351 intensity (x_1x_2). However, the positive effects from the quadratic coefficients of
 352 %hemicellulase (x_1^2) and treatment time (x_3^2) were included in the model, due to their
 353 contribution to the model fit. The model equation $CA = 5.14 - 0.01x_1 + 0.13x_1^2 + 0.26x_2^2 +$
 354 $0.31x_3 + 0.11x_3^2 - 0.44x_1x_2 + 0.66x_1x_3$ (Eq. 3) displayed an R^2 value of 0.65, and the lack

355 of fit was not significant ($p > 0.05$). The response surface (Figure 1b) and desirability
 356 parameters (Figure 2) indicated an optimal region with maximum CA response (7.90 mg
 357 kg^{-1}) for X_1 , X_2 , and X_3 values in the 2–2.34%, 30–87 W cm^{-2} , and 5–6.36 min ranges,
 358 respectively, or $1 < x_1 < 1.68$, $-1.68 < x_2 < 1.68$, and $1 < x_3 < 1.68$.

359 In the case of the AGM response function, the positive effect of the quadratic
 360 coefficient of the treatment time (x_3^2) and the negative effect of the interaction between
 361 %hemicellulase and ultrasound intensity (x_1x_2) were both significant. On the other hand,
 362 the positive effects of the linear coefficient of the treatment time variable (x_3), the
 363 quadratic coefficient of the ultrasound intensity (x_2^2), and the %hemicellulase-treatment
 364 time (x_1x_3) and ultrasound intensity-treatment time (x_2x_3) interactions were not
 365 significant; however, they were kept in the model because of their contributions to the R^2
 366 and R_{adj} values. Thus, the model equation $\text{AGM} = 12.65 + 0.58x_1 + 0.16x_2^2 + 0.57x_3 +$
 367 $0.60x_3^2 - 0.95x_1x_2 + 0.64x_1x_3 + 0.27x_2x_3$ (Eq. 4) showed a good fit to the experimental
 368 data ($R^2 = 0.80$), and the lack of fit was not significant ($p > 0.05$). The response surface
 369 (Figure 1c) and desirability parameters (Figure 2) presented an optimal region with
 370 maximum AGM response (17.69 mg kg^{-1}) when X_1 was between 1 and 2.34%, X_2 varied
 371 between 13 and 87 W cm^{-2} , and X_3 ranged between 5 and 6.36 min, corresponding to -1
 372 $< x_1 < 1.68$; $-1.68 < x_2 < 1.68$ and $1 < x_3 < 1.68$.

373 The SPD response function exhibited a significant and negative effect only for the
 374 interaction between %hemicellulase and ultrasound intensity (x_1x_2). However, although
 375 not significant, the positive effects of the linear and quadratic coefficients of ultrasound
 376 intensity (x_2 and x_2^2) and treatment time (x_3 and x_3^2) and the interaction between
 377 %hemicellulase and treatment time (x_1x_3) were included in the model, due to their
 378 contribution to the model adjustment. The model equation $\text{SPD} = 103.33 + 2.56x_1 + 2.13x_2$
 379 $+ 2.17x_2^2 + 0.82x_3 + 3.02x_3^2 - 9.78x_1x_2 + 8.15x_1x_3$ (Eq. 5) provided a good fit to the

380 experimental data ($R^2 = 0.70$) and the lack of fit was not significant ($p > 0.05$). The
381 response surface (Figure 1d) and desirability parameters (Figure 2) showed an optimal
382 region with maximum SPD response ($138.79 \text{ mg kg}^{-1}$) for X_1 , X_2 , and X_3 ranges of 1–
383 2.34%, 13–87 W cm^{-2} , and 3–6.36 min, respectively, corresponding to $-1 < x_1 < 1.68$, -
384 $1.68 < x_2 < 1.68$, and $0 < x_3 < 1.68$.

385 The adjusted models were used to obtain desirability functions. Thus, the
386 generated ranges of X_1 , X_2 , and X_3 enabled the determination of the optimal conditions
387 maximizing the response functions estimated for PU, CA, AGM, and SPD. The optimal
388 conditions for simultaneously achieving the maximum values of all response functions
389 were $x_1 = 1.68$, $x_2 = 0$, and $x_3 = 1.68$, corresponding to 2.34% hemicellulase, 50 W cm^{-2} ,
390 and 6.36 min (Figure 2). Thus, based on the estimated models, it was possible to predict
391 the conditions for the maximum extraction of bioactive amines from soymilk. Moreover,
392 Figure 3 reveals that the highest response functions (PU, CA, AGM, and SPD) estimated
393 by the models showed increased contents of these compounds with respect to the soymilk
394 control as well as the HAE- and UAE-treated soymilk samples (Table 2). Thus, the CCRD
395 approach, combining the hemicellulase (x_1), ultrasound intensity (x_2), and treatment time
396 (x_3) parameters describing the treatments applied to the homogenates, was shown to be
397 advantageous to estimate the optimal conditions for the maximum extraction of bioactive
398 amines from soymilk.

399 4. Conclusions

400 BRS257 soybean along with hemicellulase- and ultrasound-treated soymilk samples
401 exhibited the same profile and different contents of bioactive amines (putrescine,
402 cadaverine, agmatine, spermidine, and spermine), with a predominant fraction of
403 spermidine. The content of bioactive amines in the samples decreased in the order

404 ultrasound-assisted extraction > hemicellulase-assisted extraction > control. The
405 %hemicellulase, ultrasound intensity, and treatment time variables, describing the
406 treatments applied to the homogenates for bioactive amine extraction, showed different
407 linear, quadratic, and interaction effects on the PU, CA, AGM, and SPD response
408 functions from soymilk, while no significant effects were observed on the SPM function.
409 The CCRD approach was thus adequate, and the models could be used for predictive
410 purposes. In this way, the best conditions to achieve higher contents of PU, CA, AGM,
411 and SPD in soymilk were estimated as: hemicellulase concentration = 2.34%, ultrasound
412 intensity = 50 W cm⁻², and treatment time = 6.36 min.

413 **Acknowledgments**

414 M. B. R. Silva (PhD Fellowship process #88881.189029/2018-01) acknowledge CAPES
415 (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brazil) and Department
416 of Nutrition, Food Sciences and Gastronomy, Faculty of Pharmacy and Food Sciences,
417 University of Barcelona (UB), Santa Coloma de Gramenet, Spain. E. I. Ida is a CNPq
418 (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) research fellow
419 (process #305397/2015-0).

420 **Funding information**

421 The study received financial supports from the Conselho Nacional de Desenvolvimento
422 Científico e Tecnológico, Grant/Award Number: 305397/2015-0 and Coordenação de
423 Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Grant/Award Number:
424 88881.189029/2018-01.

425 **Conflict of interest**

426 The authors declare that they have no conflict of interest.

427 **References**

428 Baú, T.R., and Ida, E.I. (2015) Soymilk processing with higher isoflavone aglycone
429 content. *Food Chemistry*, 183: 161-168.

430 Biji, K.B., Ravishankar, C.N., Venkateswarlu, R., Mohan, C.O., and Srinivasa Gopal,
431 T.K. (2016) Biogenic amines in seafood: a review. *Journal of Food Science and*
432 *Technology*, 53: 2210-2218.

433 Colli, S. Outros reguladores: brassinosteróides, poliaminas, ácidos jasmônico e salicílico.
434 In: Kerbauy, G.B. *Fisiologia Vegetal*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2004.
435 333-340p

436 EC, European Commission. Regulation 2073/2005/ EC. (2005) *Microbiological criteria*
437 *for foodstuffs*. Official Journal of the European Union, 338: 1-26.

438 EC, European Commission. Regulation 1019/2013/ EU. (2013) *Amending annex I to*
439 *regulation EC No 2073/2005 as regards histamine in fishery products*. Official
440 Journal of the European Union, 282: 46-47.

441 FDA, Food and Drug Administration. (2011) *Fish and Fishery Products Hazards and*
442 *Controls Guidance*, 4th ed. Washington: United States Department of Health and
443 Human Services. p. 468

444 Gerner, E.W., and Meyskens, F.L. (2004) Polyamines and cancer: Old molecules, new
445 understanding. *Nature Reviews Cancer*, 4 (10) 781-792.

446 Glória, M.B.A., Tavares-Neto, J., Labanca, R.A., and Carvalho, M.S. (2005) Influence of
447 cultivar and germination on bioactive amines in soybeans (*Glycine max L. Merrill*).
448 *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(19) 7480-7485.

- 449 Glória, M.B.A. Bioactive Amines. In: Hui, H., Nollet, L.L. *Handbook of food Science,*
450 *Technology and Engineering.* New York: Marcel Dekker, 2006.
- 451 Granato, D., Calado, V.M.A., and Jarvis, B. (2014) Observations on the use of statistical
452 methods in food science and technology. *Food Research International*, 55: 137-
453 149.
- 454 Hoet, P. H.; and Nemery. B. (2000) Polyamines in the lung: polyamine uptake and
455 polyamine liked pathological or toxicological conditions. *American Journal of*
456 *Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 278: 417-433.
- 457 Jooyandeh, H. (2011) Soy products as healthy and functional foods. *Middle-East Journal*
458 *of Scientific Research*, 7 (1) 71-80.
- 459 Kalač, P., Krížek, M., Pelikánová, T., Langová, M., and Veškrna, O. (2005) Contents
460 of polyamines in selected foods. *Food Chemistry*, 90: 561-564.
- 461 Kalač, P. (2014) Health effects and occurrence of dietary polyamines: A review for the
462 period 2005-mid 2013. *Food Chemistry*, 161: 27-39.
- 463 Kim, J.H., Kim, D.H., Ahn, H.J., Park, H.J., and Byun, M.W. (2004) Reduction of the
464 biogenic amine contents in low salt-fermented soybean paste by gamma
465 irradiation. *Food Control*, 16 (1) 43-49.
- 466 Latorre-Moratalla, M.L., Bosch-Fusté, J., Lavizzari, T., Bover-Cid, S., Veciana-Nogués,
467 M.T., and Vidal-Carou, M.C. (2009) Validation of an ultrahigh pressure liquid
468 chromatographic method for the determination of biologically active amines in
469 food. *Journal of Chromatography A*, 1216: 7715-7720.
- 470 Linares, D. M., Martín, M. C., Ladero, V., Alvarez, M. A., and Fernández, M. (2011)
471 Biogenic amines in dairy products. *Critical Reviews in Food Science and*
472 *Nutrition*, 51: 691-703.

- 473 Löser, C. (2000) Polyamines in human and animal milk. *British Journal Nutrition*, 84:
474 S55-S58.
- 475 Minois, N., Carmona-Gutierrez, D., and Madeo, F. (2011) Polyamines in aging and
476 disease. *Aging*, 3: 716-732.
- 477 Moinard, C., Cynober, L., and Bandt, J.P. (2005) Polyamines: metabolism and
478 implications in human diseases. *Clinical Nutrition*, 24: 184-197.
- 479 Nadar, S.S., Rao, P., and Rathod, V.K. (2018) Enzyme assisted extraction of
480 biomolecules as an approach to novel extraction technology: A review. *Food*
481 *Research International*, 108: 309-330.
- 482 Nishibori, N., Fujihara, S., and Akatuki, T. (2007) Amounts of polyamines in foods in
483 Japan and intake by Japanese. *Food Chemistry*, 100: 491-497.
- 484 Nishimura, K., Shiina, R., Kashiwagi, K., and Igarashi, K. (2006) Decrease in polyamines
485 with aging and their ingestion from food and drink. *Journal of Biochemistry*, 139:
486 81-90.
- 487 Okamoto, A., Sugi, E., Koizumi, Y., Yanadiga, F., and Udaka, S. (1997) Polyamine
488 content of ordinary foodstuffs and various fermented foods. *Bioscience,*
489 *Biotechnology, and Biochemistry*, 61: 1582-1584.
- 490 Reilly, J.K., Lanou, A.J., Barnard, N.D., Seidl, K., and Green, A.A. (2006) Acceptability
491 of soymilk as a calcium-rich beverage in elementary school children. *Journal of*
492 *the American Dietetic Association*, 106 (4) 590-593.
- 493 Saaid, M., Saad, B., Hashim, N. H., Mohamed Ali, A. S., and Saleh, M. I. (2009)
494 Determination of biogenic amines in selected Malaysian food. *Food Chemistry*,
495 113: 1356-1362.
- 496 Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K.M., and Yoga Latha, L. (2011)
497 Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants'

- 498 extracts. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative*
499 *Medicines*, 8 (1) 1-10.
- 500 Silva, M.B.R., Falcão, H.G., Kurozawa, L.E., Prudencio, S.H., Camargo, A.C. de,
501 Shahidi, F., and Ida, E.I. (2019) Ultrasound- and hemicellulase-assisted extraction
502 increase β -glucosidase activity, the content of isoflavone aglycones and
503 antioxidant potential of soymilk. *Journal of Food Bioactives*, 6: 140-147.
- 504 Soda, K. (2010) Polyamine intake, dietary pattern, and cardiovascular disease. *Medical*
505 *Hypotheses*, 75: 299-301.
- 506 Spano, G., Russo, P., Lonvaud-Funel, A., Lucas, P., Alexandre, H., and Grandvalet, C.,
507 (2010) Biogenic amines in fermented foods. *European Journal of Clinical*
508 *Nutrition*, 64: S95-S100.
- 509 Toro-Funes, N., Bosch-Fusté, J., Veciana-Nogués, M.T., and Vidal-Carou, M.C. (2014)
510 Effect of ultra high pressure homogenization treatment on the bioactive
511 compounds of soya milk. *Food Chemistry*, 152: 597-602.
- 512 Toro-Funes, N., Bosch-Fusté, J., Latorre-Moratalla, M.L., Veciana-Nogués, M.T., and
513 Vidal-Carou, M.C. (2015) Biologically active amines in fermented and non-
514 fermented commercial soybean products from the Spanish market. *Food*
515 *Chemistry*, 173: 1119-1124.
- 516 Toro-Funes, N., Bosch-Fusté, J., Veciana-Nogués, M.T., Izquierdo-Pulido, M., and
517 Vidal-Carou, M.C. (2013) In vitro antioxidant activity of dietary polyamines.
518 *Food Research International*, 51: 141-147.
- 519 Vidal-Carou, M.C., Veciana-Nogués, M.T., Latorre-Moratalla, M.L., and Bover-Cid, S.
520 (2007) Biogenic amines: Risks and control. *Handbook of fermented meat and*
521 *poultry*. Blackwell Publishing.

- 522 Wallace, H.M., Fraser, A.V., and Hughes, A. (2003). A perspective of polyamine
523 metabolism. *Biochemical Journal*, 376: 1-14.
- 524 Yolmeh, M., and Jafari, S.M. (2017) Applications of response surface methodology in
525 the food industry processes. *Food and Bioprocess Technology*, 10: 413-433.

1 **Table 1** Central composite rotatable design with coded (x) and uncoded (X) independent variables used in soymilk treatment and corresponding
 2 response functions

Assay	Independent variables			Response functions				
	$x_1(X_1)$	$x_2(X_2)$	$x_3(X_3)$	PU	CA	AGM	SPD	SPM
1	-1 (1)	-1 (30)	-1 (1)	14.54	6.11	12.27	110.83	39.26
2	-1 (1)	-1 (30)	1 (5)	11.09	5.11	11.92	86.93	28.82
3	-1 (1)	1 (70)	-1 (1)	15.67	6.12	13.29	120.51	43.52
4	-1 (1)	1 (70)	1 (5)	15.68	6.23	14.05	117.76	46.49
5	1 (2)	-1 (30)	-1 (1)	11.03	4.91	12.95	100.58	38.97
6	1 (2)	-1 (30)	1 (5)	16.21	7.71	15.19	128.51	45.27
7	1 (2)	1 (70)	-1 (1)	11.32	4.29	10.18	90.39	38.07
8	1 (2)	1 (70)	1 (5)	13.45	5.91	13.49	100.99	39.56
9	0 (1.5)	0 (50)	0 (3)	13.01	5.15	12.74	104.04	40.62
10	0 (1.5)	0 (50)	0 (3)	12.52	4.63	11.23	104.89	39.54
11	0 (1.5)	0 (50)	0 (3)	9.77	4.38	11.43	84.53	31.36
12	-1.68 (0.66)	0 (50)	0 (3)	11.03	4.91	12.95	100.58	38.97
13	1.68 (2.34)	0 (50)	0 (3)	11.87	5.61	12.70	104.33	45.65
14	0 (1.5)	-1.68 (13)	0 (3)	12.79	5.15	12.58	102.67	36.69
15	0 (1.5)	1.68 (87)	0 (3)	14.28	6.12	14.49	118.26	46.63
16	0 (1.5)	0 (50)	-1.68 (0.36)	13.65	5.02	14.25	113.09	43.79
17	0 (1.5)	0 (50)	1.68 (6.36)	14.11	5.44	15.33	112.67	46.94
18	0 (1.5)	0 (50)	0 (3)	15.01	5.91	14.00	113.90	48.57
19	0 (1.5)	0 (50)	0 (3)	13.99	5.43	12.80	106.15	39.98

3 Note: x_1 , x_2 , and x_3 are coded independent variables for X_1 (%hemicellulase), X_2 (ultrasound intensity, $W\ cm^{-2}$), and X_3 (treatment time, min), respectively. Data represent mean
 4 values ($n = 2$). PU: putrescine; CA: cadaverine; AGM: agmatine; SPD: spermidine and SPM: spermine. Bioactive amine contents are expressed as mg amine kg^{-1} sample, on a
 5 dry basis.

6 **Table 2** Bioactive amine profiles of soybean and soymilk obtained by conventional method
 7 (control), HAE and UAE

	Putrescine	Cadaverine	Agmatine	Spermidine	Spermine
BRS 257	13.74 ± 0.34	7.65 ± 0.01	13.94 ± 1.04	138.63 ± 2.31	60.22 ± 1.25
Control	11.52 ± 0.43 ^a	3.32 ± 0.11 ^b	7.50 ± 0.37 ^c	68.85 ± 0.64 ^b	29.73 ± 0.57 ^b
HAE	8.51 ± 0.80 ^b	2.91 ± 0.42 ^b	8.29 ± 0.38 ^b	67.65 ± 0.72 ^b	26.66 ± 0.85 ^c
UAE	11.05 ± 0.72 ^a	4.60 ± 0.07 ^a	12.34 ± 0.20 ^a	92.41 ± 2.30 ^a	37.89 ± 1.52 ^a

8 Data represent mean values ± standard deviation (n = 2). Values are expressed as mg amine kg⁻¹ sample, on a dry
 9 basis. Different superscript letters indicate significant differences (p < 0.05) among treatments, control, HAE, and
 10 UAE.

11

12 **Table 3** Regression coefficients and analysis of variance of mathematical models

Parameter	Regression coefficients (β) ^a				
	PU	CA	AGM	SPD	SPM
Intercept β_0	12.98	5.14	12.65	103.33	40.58
Block β_j	0.16	-0.01	0.58 ^b	2.56	2.15
Linear β_1	—	0.31 ^b	0.57	—	1.10
β_2	0.42	—	—	2.13	2.35
β_3	0.34	—	—	0.82	0.41
Quadratic β_1^2	-0.40	0.13	—	—	0.08
β_2^2	0.34	0.26 ^b	0.16	2.17	-0.14
β_3^2	0.46	0.11	0.60 ^b	3.02	1.16
Interaction β_{12}	-1.02	-0.44 ^b	-0.95 ^b	-9.78 ^b	-3.57
β_{13}	1.34 ^b	0.66 ^b	0.64	8.15	1.91
β_{23}	—	—	0.27	—	1.08
R^{2c}	0.57	0.65	0.80	0.70	0.68
Lack of fit (p) ^c	0.34	0.10	0.64	0.68	0.69

13 ^aEstimated coefficients for: PU: putrescine; CA: cadaverine; AGM: agmatine; SPD: spermidine and SPM:14 spermine. Bioactive amine contents are expressed as mg amine kg⁻¹ sample, on a dry basis.15 ^bSignificant parameters ($p < 0.05$).16 ^cDetermination coefficients (R^2) and lack of fit (p) of the adjusted models. β_1 , β_2 , and β_3 (subscript numbers) stand
17 for hemicellulase (%), ultrasound intensity (W cm⁻²), and treatment time (min), respectively.

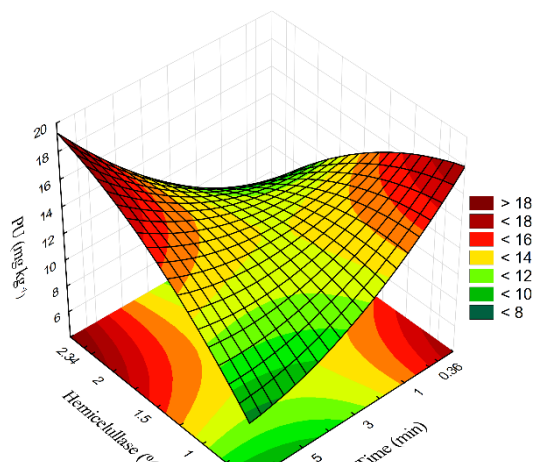
18 (—) nonsignificant terms removed from the models.

19

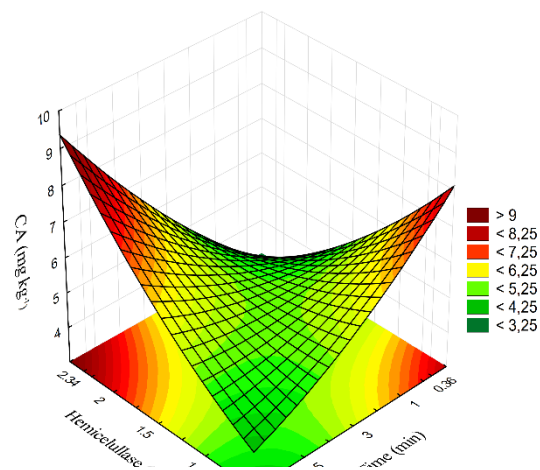
20 **Fig. 1** Response surface plots as a function of %hemicellulose (X_1) and treatment time (X_3): (a)

21 PU, (b) CA, (c) AGM, (d) SPD

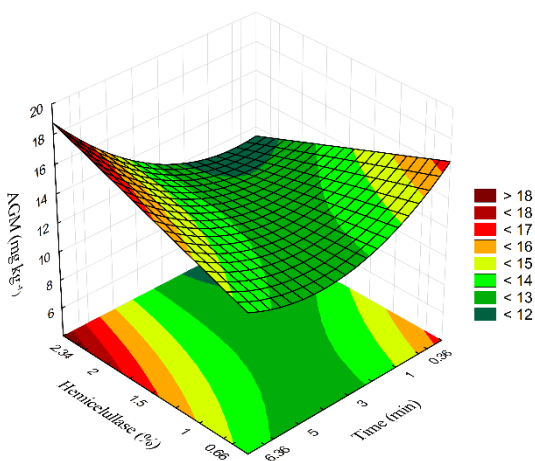
(a)



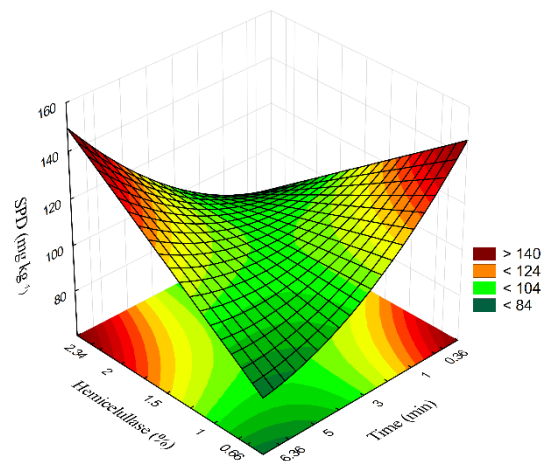
(b)



(c)



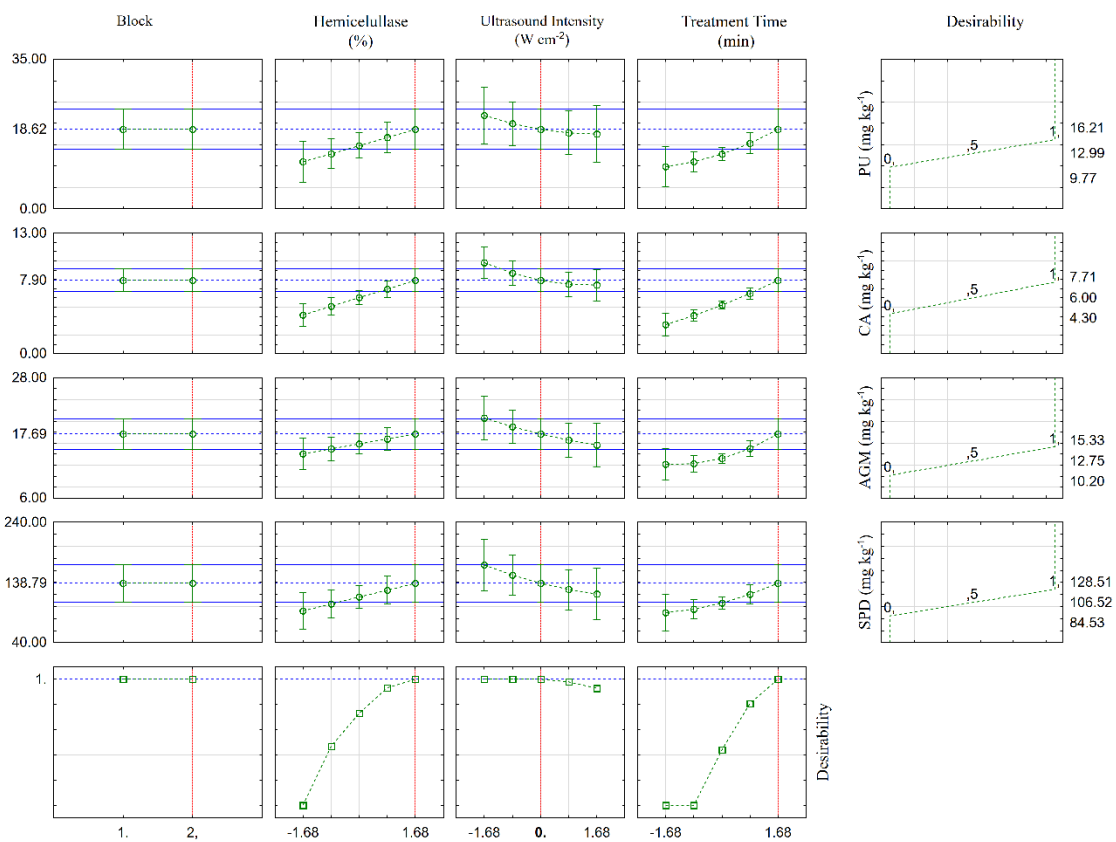
(d)



22

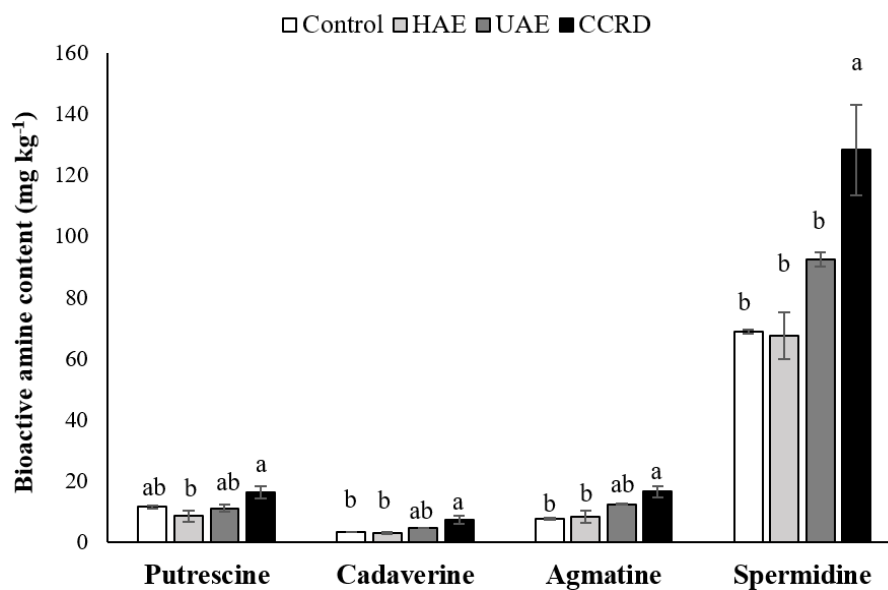
23

24 **Fig. 2** Estimated desirability parameters for maximizing the response function values of PU,
 25 CA, AGM, and SPD



26
27

28 **Fig. 3** Content of bioactive amines in soymilk obtained by conventional method (control),
29 hemicellulase-assisted extraction (HAE), ultrasound-assisted extraction (UAE), and estimated
30 by the models (CCRD). Data represent mean values \pm standard deviation ($n = 2$). Values are
31 expressed as mg amine kg^{-1} sample, on a dry basis. Different letters indicate significant
32 differences ($p < 0.05$) among treatments.



33

1 5.3 ARTIGO CIENTÍFICO 3

2 **Biogenic amines and polyamines in ready-to-eat Japanese meals and evaluation of**
3 **stored tuna sashimi**4 Mariah Benine Ramos Silva^{a*}; Elza Iouko Ida^{a*}; Sònia Sánchez-Pérez^{b,c,d}; Oriol Comas-
5 Basté^{b,c,d}; Maria Luz Latorre-Moratalla^{b,c,d}; Maria Teresa Veciana-Nogués^{b,c,d}; Maria del
6 Carmen Vidal-Carou^{b,c,d}7 ^aLondrina State University, Department of Food Science and Technology, 86051-990 Londrina,
8 Parana State, Brazil.9 ^bDepartment of Nutrition, Food Sciences and Gastronomy, Faculty of Pharmacy and Food
10 Sciences, University of Barcelona (UB), Santa Coloma de Gramenet, Spain.11 ^cResearch Institute of Nutrition and Food Safety of the University of Barcelona (INSA-UB),
12 Santa Coloma de Gramenet, Spain.13 ^dCatalonian Reference Network on Food Technology (XaRTA), Barcelona, Spain.

14 *Corresponding author:

15 Mariah Benine Ramos Silva and Elza Iouko Ida, Londrina State University, Department of
16 Food Science and Technology, 86051-990 Londrina, Parana State, Brazil.

17 E-mail: mariah_benine@hotmail.com, elida@uel.br

18

19 **Abstract**

20 The objective of this work was to evaluate the biogenic amines and polyamines profile and
21 contents in ready-to-eat meals available in Barcelona and the content of these amines in tuna
22 sashimi stored at 5 °C and 20 °C for 1 and 2 days. Prawn nigiri, salmon hosomaki, prawn gyoza,
23 tuna sashimi, and salmon sashimi were analysed in terms of biogenic amines and polyamines
24 by reverse phase ultra-high-performance chromatography (UPLC) with a spectrofluorimetric
25 detector. Tuna sashimi stored at refrigeration and at room temperature for 1 and 2 days showed
26 different concentrations of the biogenic amines, tyramine, putrescine, cadaverine, histamine,
27 phenylethylamine, and the polyamines, spermidine and spermine. Biogenic amines and
28 polyamines contents did not change in tuna sashimi stored at 5 °C, whereas histamine,
29 cadaverine, tyramine, and putrescine contents increased when tuna sashimi was stored at 20 °C
30 for 1 and 2 days. Therefore, it is recommended to control the storage temperature of tuna
31 sashimi to avoid the biogenic amines formation.

32 **Keywords:** Histamine; Fish; Bioactive amines; Ready-to-eat; Temperature.

33

34 1. Introduction

35 Bioactive amines are low molecular weight substances with biological functions in animals,
36 plants, and microorganisms. They can be classified in two groups according to their
37 biosynthetic pathway and chemical structure. Biogenic amines, mainly including tyramine,
38 histamine, tryptamine, β -phenylethylamine, putrescine and cadaverine, are present in food as a
39 consequence of bacterial enzymatic decarboxylation of their precursor amino acids. While
40 polyamines, spermidine and spermine, are physiologically present in all animal and plant tissues
41 and their origin is not related to microbial activity (Biji et al., 2016).

42 The microorganisms that produce decarboxylase enzymes can be part of food
43 microbiota, be used to obtain fermented products, or be a contaminant before, during or after
44 processing. Therefore, biogenic amines have been proposed as a chemical indicator of the
45 hygienic conditions of raw material and deterioration or spoilage of food products (Bover-Cid
46 et al., 2014). High biogenic amines concentrations can occur in various different food groups,
47 such as fish and fish products, meat and meat products and fermented products (cheese and
48 sausage), and beverages (beer and wine) (Linares et al., 2012).

49 The presence of high amounts of biogenic amines in food constitutes a potential public
50 health concern. Histamine, which is the most common cause of biogenic amines-related
51 intoxication, can cause scombroid fish poisoning. The poisoning is usually associated with the
52 *Scombridae* and *Scomberesocidae* fish families, including tuna, which is often used in Japanese
53 foods. Moreover, non-scombroid fish species have also been related to histamine poisoning,
54 including sardines, anchovy, herring, marlin, western Australian salmon and others (EFSA,
55 2011; Visciano et al., 2014). Although, other biogenic amines with possible toxicity include
56 tyramine, the excessive consumption of which might be related to headaches, as well as
57 putrescine and cadaverine, which are known to enhance the adverse effects of histamine and
58 produce carcinogenic nitrosamines (Karovičová & Kohajdová, 2005; Hungerford, 2010).

59 Due to globalization, a change in the behavior of the non-Western population regarding
60 food consumption was observed, since ready-to-eat Japanese meals gained popularity among
61 consumers for being considered "healthier". The most common Japanese products includes
62 sashimi, which is a thin slice of raw fish, and sushi, that is made up from rice dressed with
63 vinegar and other ingredients and can be presented in different ways. The most popular forms
64 of sushi are nigiri-zushi and maki-zushi. Nigiri-zushi is usually an elongated rice ball topped
65 with some ingredient, usually a piece of fish or seafood. The hosomaki is a maki-zushi produced
66 from half of a nori sheet and usually contain only one ingredient inside the roll (Mouritsen,
67 2009). Sashimi and sushi are often considered potentially hazardous food products because of
68 the occurrence of raw fish and seafood. In addition, due to an increase in the consumption of
69 these products in the last years, there is a growing concern in terms of food safety and the impact
70 on consumer's health (Bover-Cid et al., 2014).

71 Among the numerous studies on biogenic amines in fish, few have focused specifically
72 on the ready-to-eat Japanese meals and there is no data in terms of biogenic amines and
73 polyamines in tuna sashimi stored under different conditions. Therefore, the present study
74 aimed to evaluate the profile and contents of biogenic amines and polyamines in ready-to-eat
75 Japanese meals available on the Barcelona market and to determine the content and possible
76 accumulation of these amines in tuna sashimi sold in supermarkets and restaurants in Barcelona
77 stored at 5 °C and 20 °C by 1 and 2 days.

78 **2. Materials and methods**

79 *2.1. Chemicals*

80 The following biogenic amines and polyamines standards were obtained from Sigma (St. Louis,
81 MO, USA): histamine (HI) dihydrochloride, tyramine (TY) free base, β -phenylethylamine (PHE)
82 hydrochloride, serotonin (SE) creatinine sulphate, tryptamine (TR) hydrochloride, octopamine

83 (OC) free base, dopamine (DO) free base, cadaverine (CA) dihydrochloride, putrescine (PU)
84 hydrochloride, agmatine (AG) sulphate, spermine (SPM) tetrahydrochloride, and spermidine
85 (SPD) trihydrochloride. HPLC grade acetonitrile and methanol were obtained from SDS
86 (Peppin, France). The other reagent-grade chemicals used were: sodium acetate anhydrous, Brij
87 35, 2-mercaptoethanol, OPA, and acetic acid from Merck (Darmstadt, Germany); sodium
88 octanesulphonate from Romil Chemicals (Cambridge, UK) and boric acid, potassium
89 hydroxide, hydrochloric acid 35% (HCl), and perchloric acid 70% from Panreac (Montplet &
90 Esteban, Barcelona, Spain).

91 2.2. *Samples and sampling*

92 Ready-to-eat Japanese meals (prawn nigiri, salmon hosomaki, prawn gyoza, tuna sashimi, and
93 salmon sashimi) were purchased from a supermarket chain located in Barcelona, Spain. Tuna
94 sashimi were purchased from the same supermarket chain (eight samples) and from different
95 restaurants (eight samples). All of the analyses conducted were performed in duplicate using
96 independent replicates. All of the restaurants from which the samples were collected were
97 located in Barcelona, Spain. Tuna sashimi as the only product that showed histamine content
98 was chosen to evaluate the biogenic amine and polyamine contents during storage at
99 refrigeration and at room temperature for 1 and 2 days.

100 Separately, each sample of prawn nigiri, salmon hosomaki, prawn gyoza, tuna sashimi,
101 and salmon sashimi was homogenized by blender (Moulinex, DPA5) and immediately
102 subjected to analysis. Moreover, tuna sashimi samples were also homogenized as previously
103 described, and then stored at 5 °C and at 20 °C for 1 and 2 days, being zero time the control.

104

105 2.3. Biogenic amines and polyamines determination

106 An aliquot of 5-10 g of homogenized sample were extracted two times with 10 mL of perchloric
107 acid 0.6 M in a magnetic stirring plate for 20 min. Thereafter, the two phases were separated
108 by centrifugation at 5600 g at 4 °C for 20 min. The supernatants collected were combined and
109 the final volume was adjusted to 25 mL with 0.6 M perchloric acid. Before chromatographic
110 analysis, perchloric extracts were passed through a 0.22 µm filter (GHP, Waters Corp, Milford,
111 MA). The biogenic amines and polyamines, namely octopamine, dopamine, tyramine,
112 putrescine, cadaverine, histamine, agmatina, serotonin, phenylethylamine, spermidine,
113 triptamine and spermine, analysis was performed using an Acquity UPLC BEH C-18 reverse
114 phase column (Waters corp., Milford, MA, USA), followed by post-column derivatization with
115 o-phthalaldehyde and spectrofluorimetric detection in accordance with the method described
116 by Latorre-Moratalla et al. (2009). The detection and determination limits were different for
117 each amine.

118 2.4. Biogenic amines index (BAI)

119 Biogenic amines index was calculated according to the method described by Veciana-Nogués
120 et al. (1997). The formula used are as follows: $BAI = (\text{histamine} + \text{putrescine} + \text{cadaverine} +$
121 $\text{tyramine})$.

122 2.5. Statistical analysis

123 The content of biogenic amines and polyamines were compared among samples by using the
124 Kruskal-Wallis test ($p < 0.05$). Statistical analysis was performed using Statistica 10.0 (StatSoft,
125 Tulsa, OK, USA).

126

127 3. Results and discussion

128 3.1. Biogenic amines and polyamines content in ready-to-eat Japanese meals

129 Biogenic amines and polyamines contents in the ready-to-eat Japanese meals from the
130 Barcelona market is showed in Table 1. These contents varied according to the product and of
131 the five ready-to-eat Japanese meals analysed, prawn nigiri was the only product that no
132 biogenic amines and polyamines were detected. However, putrescine content of 0.06 - 0.52 mg
133 kg⁻¹ was observed in salmon hosomaki, prawn gyoza, and salmon sashimi, whereas not detected
134 in tuna sashimi. Salmon sashimi presented the highest content of putrescine and was 8.6 and
135 2.7 times higher than that of salmon hosomaki and prawn gyoza, respectively. Cadaverine and
136 histamine were detected only in tuna sashimi, while putrescine, spermidine and spermine were
137 detected in prawn gyoza, salmon sashimi and tuna sashimi. It was observed that spermidine
138 was not detected in salmon hosomaki and both spermidine and spermine were not detected in
139 prawn nigiri. The variability of biogenic amines and polyamines contents among these products
140 could be explained by the different ingredients used during their manufacturing. The same
141 biogenic amines (putrescine, histamine, cadaverine and tyramine) and polyamines (spermidine
142 and spermine) were also detected in ready-to-eat sushis available in the Polish market, including
143 nigiri and maki sushi made with different species of fish (salmon, tilapia and tuna) and shrimp
144 (Kulawik et al., 2017). The biogenic amines index (BAI) has been effectively used as an
145 indicator of the spoilage of products, some types of fish, such as tuna and sardines (Veciana-
146 Nogués et al., 1997). In the case of the products under investigation, BAI ranged from 0.06 to
147 0.98 (Table 1), indicating that content of all biogenic amines in these products was relatively
148 low and should not be hazardous to the consumer. Considering that histamine is the most
149 commonly biogenic amine associated with cases of intoxication and intolerance due to fish
150 consumption, specifically tuna, according to the Rapid Alert System for Food and Feed

151 (RASFF) of EFSA (EFSA, 2011), tuna sashimi was chosen to evaluate the biogenic amine and
152 polyamine contents when stored at 5 °C and 20 °C for 1 and 2 days.

153 *3.2. Biogenic amines and polyamines content in tuna sashimi*

154 The content of biogenic amines (tyramine, putrescine, histamine, and phenylethylamine) and
155 polyamines (spermidine and spermine) in tuna sashimi evaluated on the day of purchase (time
156 0) varied according to their origin (Figure 1). The samples purchased in the supermarket
157 presented higher contents of tyramine and putrescine than to the samples of restaurants.
158 Histamine and phenylethylamine were detected only in samples purchased on the supermarket,
159 whereas cadaverine was not detected in any of the samples. The presence of spermidine and
160 spermine were expected since both occur universally in animals and plants tissues, and the
161 content of these amines did not differ between the samples purchased in the supermarket and
162 in restaurants. It can be also remarked that the content of spermine is greater than spermidine
163 as usually happens in foods of animal origin (Kalač & Krausová, 2005).

164 *3.3. Biogenic amines and polyamines content in tuna sashimi stored at 5 °C*

165 Biogenic amines and polyamines contents in tuna sashimi stored under refrigeration for 1 and
166 2 days are shown in Table 2. As it can be seen, tyramine, putrescine, histamine,
167 phenylethylamine, spermidine and spermine contents of tuna sashimi purchased on the
168 supermarket did not present significant differences between 1 and 2 days of storage. Likewise,
169 tuna sashimi purchased at restaurants did not differ among the storage, but in these samples,
170 only tyramine, putrescine, spermidine and spermine were detected. Cadaverine was not detected
171 in both samples when tuna sashimi was purchased from the supermarket and from the
172 restaurants. The biogenic amines and polyamines contents of tuna sashimi stored under
173 refrigeration at 5 °C for 0, 1 and 2 days purchased from the restaurants are in consistency with

174 the results reported by Park et al. (2010), who found similar concentrations of tyramine (nd-5.1
175 mg kg⁻¹), putrescine (nd-1.9 mg kg⁻¹), histamine (nd-0.8 mg kg⁻¹), phenylethylamine (nd-1.2
176 mg kg⁻¹), spermidine (nd-4.4 mg kg⁻¹) and spermine (nd-4.7 mg kg⁻¹) in tuna from Korea
177 market. It should be noted that tyramine and putrescine levels in tuna sashimi purchased from
178 the supermarket were 17 and 50 times higher than the samples purchased from the restaurants,
179 respectively, whereas histamine and phenylethylamine were not detected in tuna sashimi
180 purchased from the restaurants (Table 2). Although the levels of these biogenic amines in tuna
181 sashimi purchased from the supermarket is high compared to that from restaurants, these results
182 are in agreement with the ones reported by Zhai et al. (2012) who observed similar
183 concentrations of tyramine (31.33 mg kg⁻¹) and putrescine (45.16 mg kg⁻¹) in different species
184 of fish commonly consumed in China. Tyramine content, a second biogenic amines frequently
185 associated with food poisoning, was present in the studied tuna sashimi with a concentration of
186 2.35 and 38.88 mg kg⁻¹ for those purchased from a restaurant and from the supermarket,
187 respectively. This content is considered low since the toxic dose established by Ladero et al.
188 (2010) is 125 mg of orally administered tyramine. The BAI of both samples, tuna sashimi
189 purchased from the supermarket and from the restaurants, did not show significant differences
190 between 0, 1 and 2 days of storage at 5 °C and in average they were 83.25 mg kg⁻¹ and 2.71 mg
191 kg⁻¹, respectively. Although when comparing then, the tuna sashimi purchased from the
192 restaurants can be considered safer to consume than tuna sashimi purchased from the
193 supermarket.

194 *3.4. Biogenic amines and polyamines content in tuna sashimi stored at 20 °C*

195 Tyramine levels of tuna sashimi purchased from the supermarket and stored at 20 °C (Table 3)
196 increased 2.10 times on the first day of storage in comparison to the control. On the second day
197 of storage, tyramine levels increased by 20% from the first day. Although tyramine content of

198 tuna sashimi purchased from the restaurants did not present significant difference on the first
199 day of storage and the control, however, differed from the second day of storage with an
200 increase of 3.48 times. Putrescine and histamine contents of tuna sashimi purchased from the
201 supermarket and stored at 20 °C did not show significant differences between the control and
202 the first day of storage but differed from the second day of storage with an increase of 1.88 and
203 2.35 times for putrescine and histamine, respectively. Likewise, putrescine content of tuna
204 sashimi purchased at restaurants and stored at 20 °C did not show significant differences
205 between the control and the first of storage but differed from the second day of storage with a
206 10.5 fold increase. Histamine was not detected in tuna sashimi purchased from the restaurant,
207 however, at the first day of storage at 20 °C the content of 0.27 mg kg⁻¹ was observed and at
208 the second day of storage, these content increased significantly and by 99.4 times. Currently,
209 the only biogenic amine for which the maximum limits have been set is histamine because of
210 its toxicological effects. According to Food and Drug Administration (FDA) the food is
211 considered as spoiled if the histamine level reaches to 50 mg kg⁻¹ while the maximum average
212 content of 100 mg kg⁻¹ has been established by the European Union for acceptance of tuna and
213 other fish belonging to the *Scombridae* and *Scomberesocidae* families (FDA, 2011; EC, 2005;
214 2013). Therefore, tuna sashimi purchased from the supermarket (24.72 mg kg⁻¹ of histamine)
215 stored for 1 day and from the restaurants (26.84 mg kg⁻¹ of histamine) stored for 2 days at 20
216 °C would be acceptable for consumption because they are below of the limit. However, tuna
217 sashimi purchased from the supermarket and stored for 2 days at 20 °C would not be acceptable
218 because it exceeded the limit of consumption of 50 mg histamine kg⁻¹ recommended by the
219 FDA. Cadaverine was not detected in tuna sashimi control samples, and in both purchased from
220 the supermarket and from the restaurant. However, at first day of storage at 20 °C the cadaverine
221 content was 6.76 and 4.22 mg kg⁻¹ and at the second day of storage at 20 °C the cadaverine
222 content increased by 12.32 and 9.94 times, respectively. It is important to note that cadaverine

223 and putrescine are the most common biogenic amines found in seafood and do not present direct
224 toxicological effects on human health. However, the occurrence of these amines may play an
225 important role in food poisoning, as they can potentiate the toxicity of tyramine and histamine.
226 In addition, cadaverine and putrescine may react with nitrite to form heterocyclic nitrosamines,
227 which are some of the most important human carcinogens (Park et al., 2010). Phenylethylamine,
228 spermidine and spermine contents in tuna sashimi purchased from the supermarket stored at 20
229 °C did not show differences ($p < 0.05$) between the 0, 1 and 2 days of storage. In the same way,
230 spermidine and spermine contents did not differ during the storage in tuna sashimi purchased
231 from the restaurants and phenylethylamine was not detected in these samples. The biogenic
232 amines formation in fish and seafood is influenced by free amino acid content, the presence of
233 bacteria synthesizing amino acid decarboxylases, and favorable conditions (EFSA, 2011).
234 Normally, free amino acid levels in fish would gradually increase with storage time due to
235 proteolysis by endogenous and exogenous proteases (Biji et al., 2016). Thus, biogenic amines
236 can be formed by the microbial decarboxylation of free amino acids during storage and are
237 strongly influenced by the conditions under which storage is carried out. In the present study,
238 biogenic amines in tuna sashimi remained unchanged during storage at 5 °C for 1 and 2 days,
239 however, during storage at 20 °C significant changes in tyramine, putrescine, cadaverine and
240 histamine contents was observed. Therefore, these amines can be used as freshness parameters
241 of the ready-to-eat tuna sashimi. The most effective way to prevent the risk of intoxication is to
242 use adequate refrigeration from the point of production to the final consumer. Since the enzyme
243 histidine decarboxylase is present in fish, even without the presence of active bacteria, it can
244 produce histamine. The enzyme can be activated at the refrigeration temperature and once the
245 histamine is produced, it cannot be removed by freezing or cooking (Lehane & Olley, 2000).
246 Tuna sashimi purchased from the restaurants (2.68) can be considered safer than the one
247 purchased from the supermarket due to the low BAI of its control (85). However, it was noted

248 that the BAI of tuna sashimi purchased from the supermarket and from the restaurants presented
249 the same trend, both had an increase after storage at 20 °C for 1 and 2 days. Therefore, it is
250 recommended to check the storage temperature of ready-to-eat meals since the
251 time/temperature binomial is the most critical and determinant risk factor in biogenic amines
252 formation in fresh and lightly preserved fish and seafood products (Bover-Cid et al., 2014).

253 **4. Conclusion**

254 Different profile and content of bioactive amines (putrescine, cadaverine and histamine) and
255 polyamines (spermidine and spermine) were detected and quantified in the ready-to-eat
256 Japanese meals (prawn nigiri, salmon hosomaki, prawn gyoza, tuna sashimi, and salmon
257 sashimi) from the Barcelona market. Only tuna sashimi showed histamine. No significant
258 changes in tyramine, putrescine, histamine, phenylethylamine, spermidine and spermine in tuna
259 sashimi purchased from the supermarket and from the restaurants occurred during storage at 5
260 °C for 0, 1 and 2 days, whereas when stored at 20 °C, tyramine, putrescine, cadaverine and
261 histamine levels increased while spermidine and spermine levels remained unchanged. The
262 storage temperature of ready-to-eat Japanese meals should be carefully monitored to avoid the
263 formation of biogenic amines.

264 **Acknowledgments**

265 M.B.R. Silva acknowledge CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível
266 Superior – Brazil, process #88881.189029/2018-01) for providing her PhD scholarship and the
267 Department of Nutrition, Food Sciences and Gastronomy, Faculty of Pharmacy and Food
268 Sciences, University of Barcelona (UB), Santa Coloma de Gramenet, Spain for their support.
269 E.I. Ida is a CNPq research fellow (process n° 305397/2015-0).

270 **References**

- 271 Biji, K.B., Ravishankar, C.N., Venkateswarlu, R., Mohan, C.O., and Srinivasa Gopal, T.K.
272 (2016) Biogenic amines in seafood: a review. *Journal of Food Science and Technology*,
273 53: 2210-2218.
- 274 Bover-Cid, S., Latorre-Moratalla, M.L., Veciana-Nogués, M.T., and Vidal-Carou, M.C.
275 Processing contaminants: Biogenic amines. In: Motarjemi, Y., Moy, G.G., Todd, E.C.D.
276 (editors) *Encyclopedia of Food Safety*. Vol. 2. Waltham: Elsevier Inc. 2014. pp. 381-
277 391.
- 278 EC, European Commission. Regulation 2073/2005/ EC. *Microbiological criteria for foodstuffs*.
279 Official Journal of the European Union. 2005;338:1-26
- 280 EC, European Commission. Regulation 1019/2013/ EU. *Amending annex I to regulation EC*
281 *No 2073/2005 as regards histamine in fishery products*. Official Journal of the European
282 Union. 2013;282:46-47
- 283 EFSA, European Food Safety Authority (2011) Scientific opinion on risk based control of
284 biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA Journal*, 9 (10) 2393.
- 285 FDA, Food and Drug Administration (2011) *Fish and Fishery Products Hazards and Controls*
286 *Guidance*, Center for Food Safety and Applied Nutrition, College Park, MD, pp. 1-401.
- 287 Hungerfort, J.M. (2010) Scombroid poisoning: a review. *Toxicon*, 56: 231-243.
- 288 Kalač, P., and Krausová, P.A. (2005) A review of dietary polyamines: formation, implications
289 for growth and health and occurrence in foods. *Food Chemistry*, 90: 219-230.
- 290 Karovičová, J., and Kohajdová, Z. (2005) Biogenic amines in food. *Chemical Papers*, 59 (1)
291 70-79.
- 292 Kulawik, P., Dordevic, D., Gambus, F., Szczurowskad Ka, and Zajac, M. (2017) Heavy metal
293 contamination, microbiological, spoilage and biogenic amine content in sushi available
294 on the Polish market. *Journal of the Science of Food Agriculture*, 98 (7) 2809-2815.

- 295 Ladero, V., Calles-Enriquez, M., Fernandez, M., and Alvarez, M. A. (2010) Toxicological
296 effects of dietary biogenic amines. *Current Nutrition & Food Science*, 6: 145-156.
- 297 Latorre-Moratalla, M.L., Bosch-Fusté, J., Lavizzari, T., Bover-Cid, S., Veciana-Nogués, M.T.,
298 and Vidal-Carou, M.C. (2009) Validation of an ultra-high pressure liquid
299 chromatographic method for the determination of biologically active amines in food.
300 *Journal of Chromatography A*, 1216: 7715-7720.
- 301 Lehane, L., and Olley, J. (2000) Histamine fish poisoning revisited. *International Journal of*
302 *Food Microbiology*, 58: 1-37.
- 303 Linares, D.M., del Rio, B., Ladero, V., Martinez, N., Fernandez, M., Martin, M.C., and Alvarez,
304 M.A. (2012) Factors influencing biogenic amines accumulation in dairy products.
305 *Frontiers in Microbiology*, 3: 180.
- 306 Mouritsen, O.G., What is sushi? In: Mouritsen, O.G. *SUSHI Food for the eye, the body & the*
307 *soul*. Springer, Boston, MA, pp. 14-23, 2009.
- 308 Park, J.S., Lee, C.H., Kwon, E.Y., Lee, H.J., Kim, J.Y., and Kim, S.H. (2010) Monitoring the
309 contents of biogenic amines in fish and fish products consumed in Korea. *Food Control*,
310 21 (9) 1219-1226.
- 311 Veciana-Nogués, M.T., Marine, F.A., and Vidal-Carou, M.C. (1997) Biogenic amines as
312 hygienic quality indicators of tuna. Relationships with microbial counts, ATP-related
313 compounds, volatile amines and organoleptic changes. *Journal of Agricultural and*
314 *Food Chemistry*, 45: 2036-2041.
- 315 Visciano, P., Schirone, M., Tofalo, R., and Suzzi, G. (2014) Histamine poisoning and control
316 measures in fish and fishery products. *Frontiers in Microbiology*, 5: 500.
- 317 Zhai, H., Yang, X., Li, L., Xia, G., Cen, J., and Huang, H. (2012) Biogenic amines in
318 commercial fish products sold in southern China. *Food Control*, 25: 303-308.
- 319

320 **Table 1.** Biogenic amines and polyamines contents in ready-to-eat Japanese meals from the
 321 Barcelona market

	PU	CA	HI	PHE	SPD	SPM	Biogenic Amine Index (BAI)
Prawn nigiri	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-
Salmon hosomaki	0,06 ± 0,02	nd	nd	nd	nd	0,39 ± 0,05	0.06
Prawn gyoza	0,19 ± 0,00	nd	nd	nd	0,41 ± 0,08	0,56 ± 0,01	0.19
Tuna sashimi	nd	0,25 ± 0,04	0,73 ± 0,05	nd	1,3 ± 0,14	5,73 ± 0,33	0.98
Salmon sashimi	0,52 ± 0,06	nd	nd	nd	1,89 ± 0,00	3,56 ± 0,60	0.52

322 Abbreviations: PU, putrescine; CA, cadaverine; HI, histamine; PHE, phenylethylamine; SPD, spermidine; SPM,
 323 spermine. Biogenic amine and polyamine contents in mg kg⁻¹ of fresh weight. Data represent mean values ±
 324 standard deviation. nd = not detected.

325

326 **Table 2.** Biogenic amines and polyamines contents in tuna sashimi stored at 5°C

Days	Biogenic amines					Polyamines		Biogenic Amine Index
	TY	PU	CA	HI	PHE	SPD	SPM	BAI
Supermarket								
control	39.36 ± 5.03	20.55 ± 13.89	nd	25.09 ± 2.80	3.48 ± 0.44	2.69 ± 0.97	9.82 ± 0.94	85
1	37.93 ± 7.63	19.77 ± 13.49	nd	23.82 ± 3.04	3.11 ± 0.57	2.96 ± 0.65	9.53 ± 0.68	81.52
2	39.35 ± 5.76	19.71 ± 13.59	nd	24.19 ± 2.85	3.15 ± 0.54	2.95 ± 0.53	9.68 ± 0.98	83.25
Restaurant								
control	2.28 ± 2.08	0.40 ± 0.39	nd	nd	nd	2.03 ± 0.72	11.84 ± 1.48	2.68
1	2.30 ± 2.29	0.31 ± 0.33	nd	nd	nd	2.11 ± 0.85	12.54 ± 1.24	2.61
2	2.49 ± 2.23	0.40 ± 0.39	nd	nd	nd	2.03 ± 0.73	12.14 ± 1.41	2.84

327 Abbreviations: TY, tyramine; PU, putrescine; CA, cadaverine; HI, histamine; PHE, phenylethylamine; SPD,
328 spermidine; SPM, spermine. Biogenic amine and polyamine contents in mg kg⁻¹ of fresh weight. Data represent
329 mean values ± standard deviation. nd = not detected. Values in the same column with different letters were
330 significant different ($p < 0.05$).

331

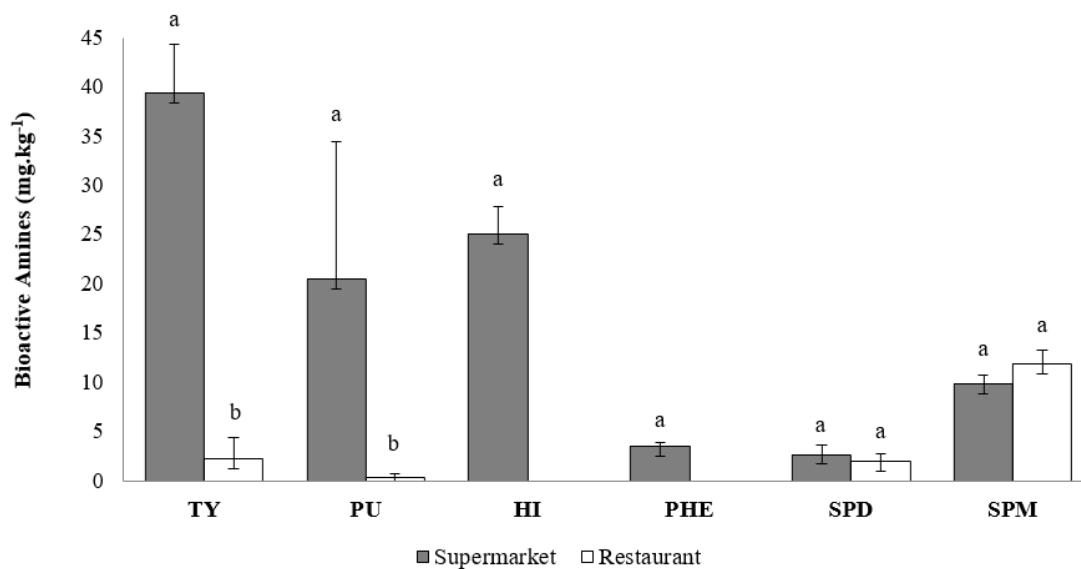
332 **Table 3.** Biogenic amines and polyamines contents in tuna sashimi stored at 20°C

Days	Biogenic amines				Polyamines			Biogenic Amine Index
	TY	PU	CA	HI	PHE	SPD	SPM	BAI
Supermarket								
control	39.36 ± 5.03 ^b	20.55 ± 13.89 ^b	nd	25.09 ± 2.80 ^b	3.48 ± 0.44	2.69 ± 0.97	9.82 ± 0.94	85
1	82.72 ± 15.51 ^a	20.28 ± 13.84 ^b	6.76 ± 4.03 ^b	24.72 ± 4.53 ^b	2.91 ± 0.59	2.78 ± 0.53	9.36 ± 1.11	134.48
2	99.24 ± 8.30 ^a	38.35 ± 23.67 ^a	83.35 ± 44.46 ^a	58.76 ± 21.70 ^a	3.42 ± 1.05	2.58 ± 0.92	9.05 ± 2.72	279.70
Restaurant								
control	2.28 ± 2.08 ^b	0.40 ± 0.39 ^b	nd	nd	nd	2.03 ± 0.72	11.84 ± 1.48	2.68
1	2.15 ± 2.15 ^b	0.87 ± 0.99 ^b	4.22 ± 6.46 ^b	0.27 ± 0.75 ^b	nd	1.94 ± 0.78	12.20 ± 1.19	7.51
2	7.70 ± 6.52 ^a	6.61 ± 6.62 ^a	41.98 ± 27.62 ^a	26.84 ± 46.15 ^a	nd	1.88 ± 0.87	11.44 ± 1.54	83.13

333 Abbreviations: TY, tyramine; PU, putrescine; CA, cadaverine; HI, histamine; PHE, phenylethylamine; SPD,
334 spermidine; SPM, spermine. Biogenic amine and polyamine contents in mg kg⁻¹ of fresh weight. Data represent
335 mean values ± standard deviation. nd = not detected. ^{a-b} Values in the same column with different letters were
336 significant different ($p < 0.05$).

337

338 **Figure 1.** Biogenic amines and polyamines contents in control samples (time 0) of tuna sashimi
 339 from supermarket and restaurant



340

341 Abbreviations: TY, tyramine; PU, putrescine; HI, histamine; PHE, phenylethylamine; SPD, spermidine; SPM,

342 spermine. Biogenic amine and polyamine contents in mg kg⁻¹ of fresh weight. Data represent mean values ±

343 standard deviation (n=8). ^{a-b} Means with different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

6 CONCLUSÕES

A extração assistida por hemicelulase e ultrassom influenciou a atividade de β -glicosidases, perfil de isoflavonas e potencial antioxidante de extratos de soja. A maior atividade de β -glicosidases e conteúdo de isoflavonas agliconas foram observadas nos extratos assistidos por ultrassom, seguido de hemicelulase e controle. O potencial antioxidante dos extratos assistidos por ultrassom e hemicelulase não apresentaram diferenças e foi maior do que o controle.

A soja BRS257 e os extratos assistidos por hemicelulase e ultrassom apresentaram o mesmo perfil e diferente conteúdo de aminas bioativas (putrescina, cadaverina, agmatina, espermidina e espermina) com predominância de espermidina. O teor de aminas bioativas destes extratos foi maior do que o controle.

A adição de hemicelulase, intensidade de ultrassom e o tempo de tratamento para obtenção de extratos de soja apresentaram diferentes efeitos lineares, quadráticos e de interações sobre as funções respostas PU, CA, AGM e SPD, enquanto que nenhum efeito significativo foi apresentado para a função resposta SPM.

A aplicação do DCCR foi adequada e os modelos foram utilizados para fins preditivos, cujas funções respostas máximas de PU, CA, AGM e SPD dos extratos de soja foram quando se utilizou hemicelulase a 2,34%, intensidade de ultrassom de 50 W cm^{-2} e tempo de tratamento de 6,36 min.

Diferentes perfis e conteúdo de aminas bioativas (putrescina, cadaverina, histamina, espermidina e espermina) foram detectados e quantificados nos produtos prontos para consumo (nigiri de camarão, hosomaki de salmão, gyoza de camarão, sashimi de atum e sashimi de salmão) disponíveis no mercado de Barcelona.

Não foram observadas alterações no conteúdo de tiramina, putrescina, histamina, espermidina e espermina em sashimis de atum adquiridos em supermercado e restaurantes especializados de Barcelona quando armazenados a $5 \text{ }^\circ\text{C}$ por 0, 1 e 2 dias. Entretanto, quando armazenados a $20 \text{ }^\circ\text{C}$, o conteúdo de tiramina, putrescina, cadaverina e histamina aumentou e de espermidina e espermina permaneceu inalterado. Assim sendo, recomenda-se que a temperatura de armazenamento destes produtos deve ser adequadamente controlada para evitar a formação de aminas biogênicas.

ANEXOS

ANEXO A - Autorização da editora International Society for Nutraceuticals and Functional Foods (ISNFF) para incluir na tese a versão impressa do artigo intitulado “Ultrasound- and hemicellulase-assisted extraction increase β -glucosidase activity, the content of isoflavone aglycones and antioxidant potential of soymilk”.

Re: PhD thesis - authorization for use



Adriano Costa de Camargo <adrianoesalq@gmail.com>

Qua, 10/07/2019 11:08

Você: Fereidoon Shahidi; Etza Ida



Em ter, 9 de jul de 2019 às 18:05, Fereidoon Shahidi <fshahidi@gmail.com> escreveu:

Greetings:

If this is a requirement of the university, then that should be obtained. JFB considers the material in the thesis is owned by the student unless the associated university has its own internal regulations.

Best,

FS

On Tue, Jul 9, 2019 at 5:51 PM Adriano Costa de Camargo <adrianoesalq@gmail.com> wrote:

Dear Dr. Shahidi:

The first author of the paper JFB-19-0128, Mariah Benine Ramos Silva, has asked me if she need any type of authorization to use her paper as a chapter of her PhD thesis in Brazil. If so, please let me know how she needs to proceed.

Best regards

Adriano

ANEXO B - Comprovante de submissão do artigo intitulado “Effect of ultrasound- and hemicellulase-assisted extraction on the bioactive amine content of soymilk”.

FABT-D-19-01285 Acknowledgement of Receipt



Food and Bioprocess Technology <em@editorialmanager.com>
Ter, 24/09/2019 17:19
Você



Dear Mrs Silva:

Thank you for submitting your manuscript, "Effect of ultrasound- and hemicellulase-assisted extraction on the bioactive amine content of soymilk", to Food and Bioprocess Technology.

The submission id is: FABT-D-19-01285

Please refer to this number in any future correspondence.

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript by accessing the following web site:

<https://www.editorialmanager.com/fabt/>

Your username is: mariah_benine@hotmail.com

If you forgot your password, you can click the 'Send Login Details' link on the EM Login page.

Should you require any further assistance please feel free to contact the Editorial Office by clicking on the "contact us" in the menu bar to send an email to us.

With kind regards,

The Editorial Office
Food and Bioprocess Technology

Recipients of this email are registered users within the Editorial Manager database for this journal. We will keep your information on file to use in the process of submitting, evaluating and publishing a manuscript. For more information on how we use your personal details please see our privacy policy at <https://www.springernature.com/production-privacy-policy>. If you no longer wish to receive messages from this journal or you have questions regarding database management, please contact the Publication Office at the link below.

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: <https://www.editorialmanager.com/fabt/login.asp?a=r>). Please contact the publication office if you have any questions.