



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

CRISTIANE WING CHONG BORGES

**EFEITO DAS CONDIÇÕES DE PREPARO DO TEMPEH DE  
SOJA NA BIOCONVERSÃO DAS ISOFLAVONAS  
GLICOSÍDICAS EM AGLICONAS**

---

Londrina  
2013

CRISTIANE WING CHONG BORGES

**EFEITO DAS CONDIÇÕES DE PREPARO DO TEMPEH DE  
SOJA NA BIOCONVERSÃO DAS ISOFLAVONAS  
GLICOSÍDICAS EM AGLICONAS**

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

Orientadora: Prof. Dra. Elza Iouko Ida

Londrina  
2013

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina.**

### **Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

B732e Borges, Cristiane Wing Chong.

Efeito das condições de preparo do tempeh de soja na bioconversão das isoflavonas glicosídicas em agliconas / Cristiane Wing Chong Borges - Londrina, 2013.  
57f. : il.

Orientador: Elza louko Ida..

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

1. Soja - Produtos - Teses. 2. Alimentos fermentados - Teses.  
3. Isoflavonas - Teses. 4. Farinha de tempe. I. Ida, Elza louko. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. III. Título.

CDU 664.6/7

CRISTIANE WING CHONG BORGES

**EFEITO DAS CONDIÇÕES DE PREPARO DO TEMPEH DE SOJA NA  
BIOCONVERSÃO DAS ISOFLAVONAS GLICOSÍDICAS EM  
AGLICONAS**

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

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profª. Dra. Elza Iouko Ida  
UEL – Londrina - PR

---

Dr. Marcelo Alvares de Oliveira  
Embrapa Soja – Londrina - PR

---

Prof. Dra. Cristiane Canan  
UTFPR – Medianeira – PR

Londrina, 27 de maio de 2013

## **DEDICO**

À Deus, pela vida, pela saúde e pelo trabalho que engrandece a alma. Ao meu querido amor Gabriel Simoni Netto, pelo incentivo, força e confiança durante a realização e concretização deste projeto. À minha mãe, Rosa Mirtha Marmanillo, meus irmãos Luiz Felipe Wing C. Borges, Tatiana Wing C. Borges e meu pai Luiz Thadeu Bittencourt Borges por seu amor mais puro. À todos os meus familiares e amigos que estiveram perto e vibrando por mim.

## **AGRADECIMENTOS**

À Prof. Dra. Elza Iouko Ida pela orientação e ensinamentos na realização deste trabalho.

À Fundação CAPES - Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- pela concessão da bolsa de estudos.

À Universidade Estadual de Londrina (UEL), Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos (DCTA) por meio do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos pela oportunidade no desenvolvimento deste trabalho.

À todos os docentes do Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos pelos ensinamentos e dedicação dispensados.

À todos os funcionários dos laboratórios do DCTA pela atenção e boa vontade em nos proporcionar um bom ambiente de trabalho.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Soja (EMBRAPA - PR) pelo fornecimento de amostras de soja e inóculo.

À Dra. Josemeyre Bonifácio da Silva, Pós Doutoranda por seu profissionalismo e persistente colaboração na realização deste trabalho.

Aos Professores Cassio Tsay e João Coelho pela oportunidade de ingresso na carreira docente.

Aos amigos da Turma de 2011 de Mestrado em Ciência de Alimentos- UEL - PR, pela convivência em todos os momentos, especialmente os amigos Cintia Handa, Daiana Rosso e Marsilvio Filho por seu apoio e amizade.

*Lembre-se: em sua vontade está o onipotente poder de Deus. Quando surgem inúmeras dificuldades e você se recusa a desistir, apesar de todos os obstáculos; quando a sua mente torna-se "firme", então você perceberá Deus lhe respondendo.*

**Paramahansa Yogananda**

BORGES, Cristiane W. C. **Efeito das condições de preparo do tempeh de soja na bioconversão das isoflavonas glicosídicas em agliconas.** 2013. 57f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

## RESUMO

O tempeh é um alimento tradicional fermentado com elevado teor de proteína e elaborado a partir dos grãos de soja descascados, hidratados, cozidos e fermentados. O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito dos diferentes tempos de hidratação, cozimento e fermentação dos grãos de soja com *Rhizopus oligosporus* durante a elaboração do tempeh na bioconversão das isoflavonas glicosídicas em agliconas aplicando o delineamento composto central (DCC)  $2^3$  com três variáveis independentes e 3 níveis de variação totalizando 17 ensaios. Os grãos de soja cultivar BRS 267 foram hidratados por 6, 12 e 18 h, cozidos por 15, 30 e 45 min e fermentados com o fungo por 18, 24 e 30 h a 37°C. Os tempehs assim preparados foram avaliados quanto ao teor das diferentes formas de isoflavonas por cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE). Os grãos de soja triturados e desengordurados apresentaram os seguintes teores de isoflavonas glicosídicas: 48,33 mg de genistina  $100\text{ g}^{-1}$  amostra, 14,84 mg de daidzina  $100\text{ g}^{-1}$  de amostra, malonil-glicosídicas: 157,67 mg de malonil-genistina  $100\text{ g}^{-1}$  de amostra e 60,59 mg de malonil-daidzina  $100\text{ g}^{-1}$  de amostra, as formas acetil-glicosídicas não foram detectadas e as agliconas foram de 8,80 mg de genisteína  $100\text{ g}^{-1}$  de amostra. A forma aglicona daidzeína não foi detectada nos grãos, porém após o processo de obtenção do tempeh utilizando 18 h de hidratação dos grãos, 45 min de cozimento dos cotilédones e 18h de fermentação, o teor deste constituinte foi de 2,75 mg de daidzeína em 100 g de tempeh desengordurado. Enquanto que a forma aglicona genisteína após o processo de obtenção do tempeh utilizando 18 h de hidratação dos grãos, 45 min de cozimento dos cotilédones e 18 h de fermentação, o teor deste constituinte foi de 36,34 mg de genisteína em 100 g de tempeh desengordurado, indicando uma bioconversão de 4,2 vezes em relação ao teor inicial dos grãos de soja.

**Palavras-chave:** Tempeh. Cozimento. Fermentação. *Rhizopus oligosporus*. Genisteína. Daidzeína.

BORGES, Cristiane W.C. **Efeito das condições de preparo do tempeh de soja na bioconversão das isoflavonas glicosídicas em agliconas.** 2013. 57p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina. 2013.

### ABSTRACT

Tempeh is a traditional fermented soybean food with high protein and prepared from hulled grains, soaked, boiled and fermented. The aim of this study was to investigate the effect of different times of soaking, boiling and fermentation of soybeans grains with *Rhizopus oligosporus* during the preparation of tempeh in the bioconversion of isoflavone glucosides to aglycones using Central Composite Design (CCD)  $2^3$  with 3 independent variables and 3 varying levels totalizing 17 experiments. The soybean grains of BRS 267 cultivar were hydrated in water for 6, 12 and 18 h, cooked in boiling water for 15, 30 and 45 min and fermented for 18, 24 and 30h at 37 °C with the *Rhizopus oligosporus*. The tempehs obtained were evaluated for isoflavones levels by Liquid Chromatography Ultra Efficiency (CLUE). The soybean BRS 267 cultivar showed the following levels of isoflavone: 48.33 mg of genistin  $100\text{g}^{-1}$  of sample, 14.84 mg of daidzin  $100\text{g}^{-1}$  of sample, 157.67 mg of malonyl genistein  $100\text{g}^{-1}$  of sample, 60.59 mg of malonyl-daidzin  $100\text{g}^{-1}$  of sample, acetyl-glucoside (not detected) and the aglycones were 8.80 mg of genistein  $100\text{g}^{-1}$  of sample. The daidzein was not detected in soybean grains and after the processing to production of tempeh with 18 h of soaking of grains, 45 min of cooking of cotyledons and 18 h of fermentation, the level was 2.75 mg of daidzeína  $100\text{g}^{-1}$  of lyophilized and defatted tempeh sample. After 18 h of soaking, 45 min of cooked and 18 h of fermentation, the content was 36.34 mg of genisteín  $100\text{g}^{-1}$  of lyophilized and defatted tempeh sample, indicating bioconversion of 4.2 times in relation to the initial content of the soybeans grains.

**Key words:** Tempeh. Cooking. Fermentation. *Rhizopus oligosporus*. Genistein. Daidzein.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Composição química dos grãos de soja .....	15
<b>Figura 2</b> – Estrutura química das 12 formas de isoflavonas da soja.....	15
<b>Figura 3</b> – Preparo de tempeh com cultivar de soja BRS 267 aplicando diferentes condições de hidratação, cozimento e fermentação com o fungo <i>Rhizopus oligosporus</i> .....	26
<b>Figura 4</b> – Modelo de superfície de resposta para concentração de genistina em tempeh de soja, como uma função de $x_1$ (tempo de hidratação), $x_2$ (tempo de cozimento) e $x_3$ (tempo de fermentação).....	46
<b>Figura 5</b> – Modelo de superfície de resposta para concentração de malonil-daidzina em tempeh de soja, como uma função de $x_1$ (tempo de hidratação), $x_2$ (tempo de cozimento) e $x_3$ (tempo de fermentação).....	47
<b>Figura 6</b> – Modelo de superfície de resposta para concentração de malonil-genistina em tempeh de soja, como uma função de $x_1$ (tempo de hidratação), $x_2$ (tempo de cozimento) e $x_3$ (tempo de fermentação).....	47
<b>Figura 7</b> – Modelo de superfície de resposta para concentração de daidzeína em tempeh de soja, como uma função de $x_1$ (tempo de hidratação), $x_2$ (tempo de cozimento) e $x_3$ (tempo de fermentação).....	48
<b>Figura 8</b> – Modelo de superfície de resposta para concentração de genisteína em tempeh de soja, como uma função de $x_1$ (tempo de hidratação), $x_2$ (tempo de cozimento) e $x_3$ (tempo de fermentação).....	48
<b>Figura 9</b> – Parâmetros de desejabilidade para a função resposta $Y_1$ (mg 100 g <sup>-1</sup> de genistina).....	49
<b>Figura 10</b> – Parâmetros de desejabilidade para a função resposta $Y_2$ (mg 100 g <sup>-1</sup> de malonil-daidzina).....	49
<b>Figura 11</b> – Parâmetros de desejabilidade para a função resposta $Y_3$ (mg 100 g <sup>-1</sup> de malonil-genistina).....	49
<b>Figura 12</b> – Parâmetros de desejabilidade para a função resposta $Y_4$ (mg 100 g <sup>-1</sup> de daidzeína) .....	50
<b>Figura 13</b> – Parâmetros de desejabilidade para a função resposta $Y_5$ (mg 100 g <sup>-1</sup> de genisteína) .....	50

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Níveis reais e codificados das variáveis independentes utilizadas no DCC (2 <sup>3</sup> ).....	45
<b>Tabela 2</b> – Matriz do delineamento composto central (DCC) 2 <sup>3</sup> para elaboração de tempehs utilizando cultivar de soja BRS 267 .....	45
<b>Tabela 3</b> – Funções respostas das diferentes formas de isoflavonas dos tempehs elaborados com cultivar de soja BRS 267.....	46

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	13
2.1 A SOJA.....	13
2.2 ISOFLAVONAS DA SOJA.....	14
2.3 PRODUTOS DE SOJA .....	17
2.3.1 Produtos Não-Fermentados De Soja.....	17
2.3.2 Produtos Fermentados De Soja.....	18
2.4 TEMPEH.....	19
2.4.1 Preparo Do Tempeh .....	20
2.4.1.1 Remoção das cascas.....	20
2.4.1.2 Hidratação e cozimento .....	21
2.4.1.3 Fermentação.....	21
2.4.2 Composição Do Tempeh .....	22
2.4.3 Efeitos Benéficos Do Tempeh .....	23
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	24
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	25
4.1 MATERIAIS.....	25
4.2 MÉTODOS.....	25
4.2.1 Planejamento Experimental Do Preparo Do Tempeh.....	25
4.2.2 Quantificação De Isoflavonas Por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência.....	28
<b>5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	29
<b>6 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	34
6.1 ARTIGO CIENTÍFICO 1: EFEITO DAS CONDIÇÕES DE PREPARO DO TEMPEH DE SOJA NA BIOCONVERSÃO DAS ISOFLAVONAS GLICOSÍDICAS EM AGLICONAS .....	34
6.1.1 Introdução.....	35
6.1.2 Material E Métodos .....	37
6.1.2.1 Materiais .....	37

6.1.3 Métodos .....	38
6.1.3.1 Planejamento experimental do preparo do tempeh.....	38
6.1.3.2 Quantificação de isoflavonas por CLUE .....	39
6.1.4 Resultados E Discussão .....	40
6.1.5 Conclusões.....	43
6.1.6 Referências .....	43
<b>CONCLUSÃO</b> .....	51
<b>ANEXOS</b> .....	52

## 1 INTRODUÇÃO

O tempeh é o alimento de soja mais popular na Indonésia e consome aproximadamente 64% dos grãos de soja produzidos no país. A produção é artesanal e é realizada em pequenas lojas que produzem tempeh fresco diariamente. A produção anual de tempeh ultrapassa 170.000 toneladas. O tempeh é comercializado e consumido de diversas maneiras, principalmente como substituto da carne ou peixe na dieta. Em pequena escala de produção, 30–50 kg de grãos de soja são transformados em 50–80 kg de tempeh. Estima-se que o consumo de tempeh na Indonésia é de 19-34 g dia/per capita ( LIU, 2004; NOUT; KIERS, 2004).

A produção de tempeh tem sido extensivamente revisada por vários autores desde 1979. Com alto conteúdo de proteínas (40–50% em base seca), o tempeh é servido como um complemento proteico saboroso e pode substituir a carne ou peixe. Vários substratos (soja amarela, soja preta, ervilha, feijão, cevada, trigo e suas misturas) podem ser utilizados na elaboração do tempeh, desde que possibilitem o crescimento do fungo *Rhizopus oligosporus* e sejam apropriados para o consumo humano. O tempeh recebe diferentes denominações (tempeh kedelai, t. lamtoro, t. koro, entre outros) de acordo com o substrato utilizado. Uma alternativa para utilização do tempeh é a elaboração de farinha de tempeh, rica em proteína, para uso como ingrediente alimentício (CUEVAS-RODRIGUEZ et al., 2004; REYES-MORENO et al., 2004; NOUT; KIERS, 2004). Segundo o método tradicional descrito por Wei (1991), os grãos de soja são descascados manualmente, hidratados, cozidos em água, secos, resfriados à temperatura ambiente e inoculados com o fungo *Rhizopus oligosporus*. Após a inoculação, o produto é fermentado em temperaturas de 32-37°C, até que seja totalmente recoberto pelos micélios do fungo. O aspecto do tempeh é semelhante a uma massa branca compacta. Os parâmetros ideais para obtenção de um tempeh de boa qualidade devem estar baseados no estudo das alterações químicas, bioquímicas, nutricionais, sensoriais e possíveis problemas toxicológicos associados ao consumo do produto (STEINKRAUS, 1983; KARYADI, 2001).

Assim, o presente trabalho teve como objetivo investigar o efeito das condições de elaboração do tempeh sobre a bioconversão das isoflavonas glicosídicas em agliconas.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 A SOJA

A soja *Glycine max* (L.) Merrill originária no Norte da China, há cerca de 5.000 anos, era considerada como um dos cinco grãos sagrados juntamente com o arroz, trigo, cevada e milho. Da China o cultivo se espalhou para o Japão, Coréia e demais países asiáticos, foi introduzida na Europa e América do Norte no século XVII. Nos Estados Unidos a produção em larga escala ocorreu no início dos anos 1900. O Brasil iniciou o cultivo em 1882 na Bahia e em 1914 no Rio Grande do Sul, como cultura de verão nas áreas de cultivo do trigo (LIU, 2004; EMBRAPA, 2009). Considerada uma *commoditie* agrícola, está presente em diversas transações do comércio mundial. No Brasil os padrões para a soja são estabelecidos e monitorados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento através da Instrução Normativa nº 11 de 15 de maio de 2007 que define o padrão oficial de classificação com os requisitos de identidade e qualidade intrínseca e extrínseca, amostragem e a marcação ou rotulagem. A soja pode ser classificada em dois grupos principais: a soja tipo grão (convencional) cultivada principalmente para atender as indústrias processadoras de óleo e farelo e a soja tipo alimento direcionadas para o consumo humano (VELLO, 1992). A estimativa da produção mundial de soja safra 2012/2013 é de 270 milhões de toneladas. Dentre os maiores produtores estão os Estados Unidos, Brasil e Argentina com aproximadamente 87, 78 e 55 milhões de toneladas/ano. No Brasil os estados do Mato Grosso e Paraná lideram a produção nacional com 20 e 15 milhões de toneladas/ano respectivamente (EMBRAPA, 2012; USDA, 2013). O consumo de soja e derivados está associado aos hábitos alimentares de cada região. Por exemplo, nos países asiáticos China, Taiwan e Japão o consumo médio ultrapassa os 19 kg/ano/per capita e nos Estados Unidos o consumo médio é de 8 kg/ano/per capita. No Brasil, o consumo de produtos a base de soja ainda é pouco expressivo, devido ao sabor da soja. Estima-se que 85% dos grãos produzidos são destinados para a produção de óleo vegetal e produtos para alimentação animal (KITAMURA, 1993).

A soja contém elevado teor de proteínas e lipídeos, o que torna a sua cultura bastante vantajosa em relação a outras espécies de leguminosas. A composição centesimal média dos grãos de soja é 40% de proteínas, 20% de lipídios, 35% de carboidratos e 5% de cinzas. Essa composição varia de acordo com as características das cultivares, época da semeadura e localização geográfica (KUDOU et al., 1991).

Dentre as proteínas vegetais, as proteínas da soja apresentam o maior valor biológico. As proteínas da soja são ricas em aminoácidos como leucina e lisina, porém, como as demais leguminosas, apresentam deficiência dos aminoácidos sulfurados metionina e cisteína (CARRÃO-PANIZZI; BORDIGNON, 2000). A proteína isolada da soja possui um PDCAAS (Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score) de 92% método oficial da Organização Mundial de Saúde (OMS), que faz a correção da digestibilidade proteica levando em conta o escore de aminoácidos, o que demonstra que a soja supre a necessidade de aminoácidos, inclusive os sulfurados, desde que ingerida em quantidade adequada, ou seja, acima de  $0,6 \text{ g kg}^{-1}$  de peso corpóreo dia (MORAIS; SILVA, 2000). A soja contém ácidos graxos insaturados, ácido oléico, linoléico e linolênico, fibras e outros compostos fitoquímicos como as isoflavonas e saponinas, benéficos para a saúde e responsáveis pelo sabor amargo e adstringente da soja. O sabor de feijão cru, relacionado com a soja, é formado por diversos compostos voláteis, tais como 1-octen-3-ol, 1-hexanol, hexanal, 1-pentanol, (E)-3-hexen-1-ol, 2-hepta-nona e 2-pentilfurano, que se formam por meio de oxidação de ácidos graxos insaturados, processo que é catalizado pela atividade da enzima lipoxigenase (KONOVSKY; LUMPKIN; MCCLARY, 1994; MORAIS; SILVA, 2000; LIU, 2004).

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa da Soja, desenvolveu por meio de seu programa de melhoramento genético, cultivares de soja especiais para alimentação humana, com alto teor de proteínas (44-46%) e grãos de diferentes tamanhos.

A cultivar de soja BRS 267 apresenta sabor agradável devido ao teor de sacarose e dos aminoácidos ácido glutâmico e alanina presentes. Entretanto, o ciclo de cultivo é longo e a produtividade é 20% inferior quando comparada com as demais cultivares de soja. A composição centesimal para a cultivar na safra 2009/2010 plantada em várias localidades do estado do Paraná, foi de 39% de proteínas, 20% de lipídeos, 34% de carboidratos totais, 6% de cinzas e 6% de umidade (SILVA et al., 2009).

## 2.2 ISOFLAVONAS DA SOJA

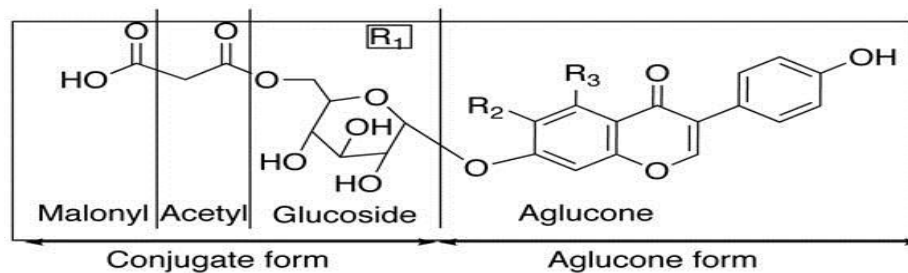
As isoflavonas são compostos fenólicos pertencentes ao grupo dos flavonoides que apresentam estrutura química composta por dois anéis benzenos ligados a um terceiro anel na posição do carbono 3 (LIU, 1997).

As isoflavonas podem ocorrer em quatro formas químicas (Figura 1), as agliconas (daidzeína, genisteína e gliciteína),  $\beta$ -glicosídicas (daidzina, genistina e glicitina),

acetil-glicosídicas conjugadas (6''-O-acetildaidzina, 6''-O-acetilgenistina, 6''-O-acetilglicitina) e malonil-glicosídicas conjugadas (6''-O-malonildaidzina, 6''-O-malonilgenistina, 6''-O-malonilglicitina) totalizando 12 diferentes formas. As formas  $\beta$ -glicosídicas possuem uma molécula de glicose ligada na posição 7 do anel benzeno e as formas conjugadas são esterificadas no carbono 6 da molécula de glicose (LIU, 1999).

A estrutura química das isoflavonas da soja é similar a estrutura do hormônio estrogênio (KUDOU et al., 1991).

**Figura 1** – Representação geral das quatro formas químicas das isoflavonas da soja



Fonte: Liu (1999).

**Figura 2** – Estrutura química das 12 formas de isoflavonas da soja.

Isoflavonas	R	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Daidzeína	H	H	-
Genisteína	H	OH	-
Gliciteína	OCH <sub>3</sub>	H	-
Daidzina	H	H	H
Genistina	H	OH	H
Glicitina	OCH <sub>3</sub>	H	H
6'' O-acetil-daidzina	H	H	COCH <sub>3</sub>
6'' O-acetil-genistina	H	OH	COCH <sub>3</sub>
6'' O-acetil-glicitina	OCH <sub>3</sub>	H	COCH <sub>3</sub>
6'' O-malonil-daidzina	H	H	COCH <sub>2</sub> COOH
6'' O-malonil-genistina	H	OH	COCH <sub>2</sub> COOH
6'' O-malonil-glicitina	OCH <sub>3</sub>	H	COCH <sub>2</sub> COOH

Fonte: Liu (1997).

As isoflavonas são compostos com atividade biológica e têm atraído atenção devido aos efeitos benéficos à saúde humana. Dentre eles, atividade estrogênica, antifúngica, anti-tumoral, antioxidante, contribuição para a redução do LDL, prevenção da osteoporose e melhoria nos sintomas da menopausa (LEE et al., 1991, MESSINA, 2003). Em cada

indivíduo, o efeito das isoflavonas se diferencia, dependendo da sua imunidade, hidrólise pelas bactérias intestinais, trânsito intestinal, idade, grupo étnico, dieta e presença ou não de doenças intestinais. As isoflavonas são absorvidas no intestino delgado e grosso, onde sofrem hidrólise pelas bactérias intestinais e vão para o fígado, onde sofrem conjugação com o ácido glicurônico e em menor quantidade com o ácido sulfúrico, para então passarem a ter biodisponibilidade e atividade biológica no organismo (SETCHELL, 1998).

Em outubro de 1999, o FDA aprovou a indicação de consumo de 25 g de soja por dia, em uma dieta com baixo teor de ácidos graxos insaturados e colesterol para a contribuição na redução do risco de doenças coronárias. A recomendação para o consumo diário é de 30–50 mg de isoflavonas totais.

Os grãos de soja apresentam teor de 300 mg de isoflavonas totais 100 g<sup>-1</sup> de amostra em base seca (KUDOU et al., 1991). O teor e perfil de isoflavonas está relacionado com o genótipo da planta e com as condições edafoclimáticas (CARRÃO-PANIZZI, 1999). Em estudo realizado entre diferentes cultivares de soja brasileira o teor variou entre 57 a 188 mg de isoflavonas totais 100 g<sup>-1</sup> de amostra em base seca, sendo que as formas glicosiladas representaram 90-95% das isoflavonas totais. (GENOVESE et al., 2005). Em diferentes produtos comerciais analisados o teor de isoflavonas totais variou entre 126 a 388 mg 100 g<sup>-1</sup> de amostra em base seca (WANG; MURPHY, 1994a). As formas agliconas representaram entre 2 - 19% das isoflavonas totais nos grãos de soja e entre 4-94% em produtos fermentados o teor variou 4 e 94% (CHEN; WEI, 2008).

A aglicona genisteína é a forma de maior absorção pelo organismo humano. As agliconas são absorvidas diretamente e não são ligadas ao açúcar, enquanto que as outras formas requerem hidrólise para a absorção pelo organismo (IZUMI et al., 2000; ESTEVES et al., 2001). Nos países asiáticos recomenda-se um consumo médio de 8-9 g de proteína de soja com teor 30 a 35 mg de isoflavonas agliconas 100 g<sup>-1</sup> (MESSINA; MESSINA, 2000).

Após a ingestão, as formas conjugadas das isoflavonas são hidrolisadas pelas enzimas  $\beta$ -glucosidases provenientes das bactérias intestinais. Ocorre a liberação das agliconas daidzeína e genisteína, dos metabólitos específicos, equol e/ou o-desmetilangolensin (ODMA), que são produzidos a partir da daidzeína e o p-etinilfenol produzido a partir da genisteína. Similarmente aos estrógenos, essas substâncias podem sofrer recirculação enterohepática por meio da qual as isoflavonas são desconjugadas no intestino e reabsorvidas ou excretadas pelas fezes (SETCHELL, 1998). O metabolismo intestinal é essencial para absorção e para a biodisponibilidade das isoflavonas, os pesquisadores avaliaram as concentrações das formas de isoflavonas glicosídicas e agliconas no plasma

humano e identificaram que as agliconas são absorvidas mais rapidamente pelo organismo do que a sua forma conjugada e que a genisteína é absorvida mais rapidamente do que a daidzeína, comprovando que as agliconas são biologicamente ativas (SETCHELL et al., 1999).

A baixa incidência de câncer de mama de próstata em mulheres e homens asiáticos é atribuída ao elevado consumo de soja, cerca de 100 mg de isoflavonas totais por dia (TAVARES et al., 2000; ADLERCREUTZ et al., 2000; BROUNS, 2002).

## 2.3 PRODUTOS DE SOJA

Produtos de soja tradicionais fermentados e não-fermentados são elaborados há muitos anos em diversos países. Os americanos desenvolveram produtos inovadores para estimular o consumo de produtos de soja como o *tofu hot dog*, *tofu ice cream*, *veggie burger*, *tempeh burger*, *soymilk yogurt*, *soymilk cheese* e *soy flour pancake* (MORAIS; SILVA, 2000).

### 2.3.1 Produtos Não-Fermentados De Soja

Dentre os principais alimentos tradicionais não fermentados de soja, estão o extrato hidrossolúvel de soja (EHS), tofu, okara, edamame, brotos de soja e farinha de soja.

O EHS possui aplicação na forma de bebida ou como ingrediente de produtos lácteos para a indústria alimentícia. É obtido através da seleção, maceração, tratamento térmico, cocção e centrifugação dos grãos de soja. A adição de EHS em sucos de frutas é uma excelente alternativa para estimular o seu consumo, pois a baixa aceitabilidade do EHS pelos ocidentais deve-se ao sabor desagradável (GENOVESE; LAJOLO, 2002; BEHREN; SILVA, 2004).

O tofu é obtido a partir da aquecimento, coagulação e compressão do EHS, utilizando agentes coagulantes, glucona-delta-lactona (GDL), cloreto de magnésio, cloreto de cálcio ou sulfato de cálcio. O produto final é um gel branco de textura leve que varia de acordo com o tipo e quantidade de coagulante utilizado no processamento, possui aspecto similar ao queijo e sua composição centesimal média é de 85% de umidade, 7,8% de proteínas, 4,2% de lipídeos e 2 mg de cálcio  $\text{g}^{-1}$  de tofu (LIU, 1997).

O okara é obtido a partir do resíduo da filtração do EHS e mantém muitas das propriedades nutricionais e funcionais da soja. Possui maior aplicação na fabricação de

rações animais, não é muito utilizado em alimentos, a sua composição média é de 37% de proteínas e 42,5% de fibras (BOWLES; DEMIATE, 2006).

O edamame é a forma de consumo da soja verde e fresca. É também conhecido como soja verde, tipo hortaliça, imatura ou soja tipo vegetal. O edamame é comercializado em maços, vagens soltas ou com grãos debulhados em pacotes na forma fresca ou congelada. Como soja tipo hortaliça, as vagens são colhidas no estágio de desenvolvimento R8, onde os grãos são verdes, porém estão 80% maduros, as vagens estão completamente preenchidas e a enzima lipoxigenase possui baixa atividade. Nestas condições, o sabor é mais doce, suave, com menor adstringência e amargor do que o sabor da soja convencional (LIU, 2004).

Os brotos de soja são alimentos altamente nutritivos, livres do uso de adubos ou defensivos agrícolas na sua produção. São alimentos totalmente naturais, que utilizam apenas as reservas armazenadas nas sementes para germinar e alcançar o tamanho para serem consumidos, as sementes germinadas irão formar o caule e as folhas, que vão preenchendo-se pouco a pouco com clorofila, originando os brotos. São fontes de minerais, vitaminas e proteínas, e apresentam baixa caloria. Os brotos são apreciados pelo seu paladar e pelo seu valor nutritivo e medicinal (VIEIRA; LOPES, 2001).

A farinha de soja pode ser utilizada como ingrediente para uma variedade de produtos alimentícios incluindo sopas, bebidas, sobremesas, produtos de padaria, cereais matinais e produtos cárneos (HETTIRACHCHY; KALAPATH, 1997). A farinha de soja desengordura contém de 44 a 54% de proteínas, 0,5 a 1% de lipídeos, 17 a 18% de fibra alimentar e 30 a 35% de carboidratos totais, além disso, apresenta maior teor de isoflavonas do que o grão de soja ou produtos derivados (GOLBITZ; JORDAN, 2006). Em relação às formas de isoflavonas a farinha desengordurada de soja comercial apresenta predominância de conjugados malonil glicosídeos e  $\beta$ -glicosídeos similar aos grãos de soja (BARBOSA et al., 2006).

### 2.3.2 Produtos Fermentados De Soja

Alimentos fermentados representam em média 30% do total de alimentos consumidos. A fermentação origina alterações nas propriedades sensoriais e nutricionais dos cereais. No oriente, a tradicional arte de processamento da soja por fermentação tem resultado em produtos de fácil digestibilidade, nutritivos e saudáveis. Os produtos fermentados de soja são fabricados em pequenas e médias escalas. O monitoramento e controle da fermentação

ainda é um desafio para os engenheiros de processo. O estudo das condições de fermentação, formação de componentes bioativos, atividade enzimática, microrganismos utilizados, alterações bioquímicas, sensoriais, valor nutricional e problemas toxicológicos são de fundamental importância (STEINKRAUS, 1983; NOUT; KIERS, 2004).

Dentre os principais alimentos tradicionais fermentados de soja estão o shoyu, misô, natto e o tempeh. O shoyu e o misô são conhecidos respectivamente como molho de soja e pasta de soja e constituem os melhores exemplos de alimentos elaborados a partir da fermentação dos grãos de soja adicionados ou não de outros grãos como trigo, arroz e cevada. Os produtos são fermentados com diferentes tipos de microrganismos do gênero *Aspergillus* e são considerados como agentes saborizantes. O shoyu é obtido na forma líquida enquanto o misô na forma pastosa (BOYE; RIBÉREAU, 2011).

O natto é também conhecido como Itohiki-natto foi originado no Japão há 1000 anos. Para o seu preparo são utilizados grãos de soja pequenos, que são lavados, hidratados, cozidos e fermentados com diferentes tipos de microrganismos do gênero *Bacillus subtilis* ou *Bacillus natto*. O produto possui aparência viscosa, sabor doce e aroma característico. No Japão, é consumido com shoyu e mostarda e produtos similares também são encontrados na Indonésia e na Tailândia (LIU, 1997).

O sufu também conhecido como doufuru ou furu, em Mandarim, toufuju ou fuju, em Cantonese ou ainda, como queijo chinês. É um alimento popular na China, porém não é muito conhecido no Japão e na Coreia. O produto possui aparência similar ao tofu, recoberto com fungos brancos ou micélios de fungos branco-amarelados, textura firme, sabor salgado e aroma característico. O sufu é obtido a partir do tofu fresco fermentado com diferentes tipos de fungos *Mucorhiemalis* ou *Actinomucorelegans* e microrganismos dos gêneros *Rhizopus*, *Aspergillus* e *Bacillus* (LIU, 1997).

## 2.4 TEMPEH

O tempeh é o alimento de soja mais popular na Indonésia e consome aproximadamente 64% dos grãos de soja produzidos no país. A produção é artesanal e é realizada em pequenas lojas que produzem tempeh fresco diariamente. A produção anual de tempeh ultrapassa 170.000 toneladas. O tempeh é comercializado e consumido de diversas maneiras, principalmente como substituto da carne ou peixe na dieta. Em pequena escala de produção, 30–50 kg de grãos de soja são transformados em 50–80 kg de tempeh. Estima-se

que o consumo de tempeh na Indonésia é de 19-34 g dia per capita ( LIU, 2004; NOUT; KIERS, 2004).

A produção de tempeh tem sido extensivamente revisada por vários autores desde 1979. Com alto conteúdo de proteínas (40–50% em base seca) o tempeh é servido como um complemento proteico saboroso e pode substituir a carne ou peixe. Vários substratos (soja amarela, soja preta, ervilha, feijão, cevada, trigo e suas misturas) podem ser utilizados na elaboração do tempeh, desde que possibilitem o crescimento do fungo *Rhizopus oligosporus* e sejam apropriados para o consumo humano. O tempeh recebe diferentes denominações (tempeh kedelai, t. lamtoro, t. koro, entre outros) de acordo com o substrato utilizado. Uma alternativa para utilização do tempeh é a elaboração de farinha de tempeh rica em proteína, para uso como ingrediente alimentício (CUEVAS-RODRIGUEZ et al., 2004; REYES-MORENO et al., 2004; NOUT; KIERS, 2004).

#### 2.4.1 Preparo Do Tempeh

Segundo método tradicional de preparo do tempeh descrito por Wei (1991), os grãos de soja são descascados manualmente, hidratados, cozidos em água, secos, resfriados à temperatura ambiente e inoculados com o fungo *Rhizopus oligosporus*. Após a inoculação, o produto é fermentado em temperaturas entre 32 - 37°C, até que seja totalmente recoberto pelos micélios do fungo. O aspecto do tempeh é semelhante a uma massa branca compacta. Os parâmetros ideais para obtenção de um tempeh de boa qualidade devem estar baseados no estudo das alterações químicas, bioquímicas, nutricionais, sensoriais e possíveis problemas toxicológicos associados ao consumo do produto (STEINKRAUS, 1983; KARYADI, 2001).

##### 2.4.1.1 Remoção das cascas

O *Rhizopus oligosporus* não se desenvolve nos grãos de soja com casca, portanto esta etapa é essencial para o preparo do tempeh. As cascas podem ser removidas à seco ou de forma úmida. Em pequenas escalas, nas produções artesanais, a remoção é manual após a hidratação dos grãos. Já em escala industrial a soja é aquecida por 10min a 93°C e as cascas podem ser aspiradas ou separadas por gravidade com auxílio de tecnologias adequadas (WINARNO; REDDY, 1986).

#### 2.4.1.2 Hidratação e cozimento

A hidratação é o processo onde os grãos de soja são submersos em água na proporção (1:10 m/v) durante 12 – 15 h a temperatura ambiente. Durante a hidratação os compostos solúveis atuam como substratos para a atividade bacteriana, resultando em acidificação do meio. Para o controle de pH e inibição do crescimento de bactérias indesejáveis, é utilizado ácido láctico ou ácido acético ( $\leq 0,5\%$ ). A inibição do fungo *Rhizopus oligosporus* ocorre em  $\text{pH} \leq 3,5$  (STEINKRAUS, 1983).

Durante a etapa de cozimento, que pode variar entre 10 min e 3 h, ocorrem alterações bioquímicas nos grãos de soja. O cozimento facilita a penetração do fungo nos grãos e disponibiliza nutrientes requeridos para a fermentação; inibe as bactérias contaminantes e fatores antinutricionais, além de contribuir para a melhoria de textura, sabor e aromas. Após o cozimento os grãos são drenados, secos e resfriados a temperatura ambiente para a inoculação do fungo *Rhizopus oligosporus* (WINARNO; REDDY, 1986; NOUT; ROMBOUTS, 1990; LIU, 2004).

O aquecimento promove a conversão das formas de isoflavonas malonil à acetil-glicosídicas, através da hidrólise das enzimas  $\beta$ -glicosidases naturalmente presentes na soja ou produzidas pelos microrganismos inoculados, liberando glicose e agliconas (WANG; MURPHY 1996).

#### 2.4.1.3 Fermentação

A etapa de fermentação sofre influência das condições de preparo do tempeh, dentre elas, o tempo, temperatura de incubação, pH, presença de oxigênio, quantidade de inóculo e umidade relativa (NOUT; KIERS, 2004). O *Rhizopus oligosporus* é a espécie preferida para a fermentação do tempeh de soja, devido ao rápido crescimento a temperaturas entre 30 - 42°C. Dentre as principais características do fungo estão a alta atividade proteolítica, lipolítica, forte produção de antioxidantes e a incapacidade de fermentar a sacarose (STEINKRAUS et al., 1983; SHARMA; SARBHOY, 1984; LIU, 1997).

Durante a etapa de fermentação, o substrato é degradado pelas enzimas carboidratases (poligalacturonase, endocelulase, xilanase, arabinanase e pequenas quantidade de  $\alpha$ -D-galactosidase,  $\beta$ -B-galactosidase,  $\beta$ -D-xilosidase,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase e  $\alpha$ -D-glucosidase), lipases, proteases e fitases. A síntese destas enzimas contribuem para o desenvolvimento de textura e aroma agradável ao tempeh. O *Rhizopus oligosporus* não

produz a enzima  $\alpha$ -galactosidase, responsável pela degradação dos oligossacarídeos (estaquiose e rafinose) que causam os sintomas de flatulência (NOUT; ROMBOOTS, 1990; HACHMEISTER; FUNG, 1993; REHMS; BARZ, 1995).

Em estudo realizado por Winarno (1989), foi obtido tempeh com boas características sensoriais em 30 h de fermentação a 32°C. Após 48 h ocorreu rápida deterioração do produto, com formação de forte cheiro de amônia, escurecimento e colapso da textura.

#### 2.4.2 Composição Do Tempeh

Devido as diversas formas de consumo do tempeh, o valor nutricional do produto varia de acordo com o tipo de preparo antes do consumo (HACHMEISTER; FUNG; 1993).

A composição do tempeh fresco varia entre 48 - 55% de proteínas, 14 - 25% de lipídeos, 20 - 28% de carboidratos, 3 - 18% de fibras, 2 - 3% de cinzas, em base seca (WINARNO; REDDY, 1986; VANDER RIET et al., 1987).

O teor e perfil de isoflavonas está relacionado com o genótipo da planta e com as condições edafoclimáticas. Os teores variam de 102,7 - 205 mg de isoflavonas totais 100 g<sup>-1</sup> de amostra em base seca (NAKAJIMA, 2005; HARON, 2009).

Em 22 h de fermentação os tempelhs apresentaram redução de 57% das isoflavonas glicosídicas e aumento de 6,5 vezes das isoflavonas agliconas em tempeh. (WANG; MURPHY 1996) .

Em 24 h de fermentação os tempelhs apresentaram os seguintes teores de isoflavonas: 87 mg de isoflavonas malonil-glicosídicas 100 g<sup>-1</sup> de tempeh e 15,7 mg de isoflavonas agliconas 100 g<sup>-1</sup> de tempeh, sendo 8,0 mg de daidzeína 100 g<sup>-1</sup> de tempeh e 7,2 mg de genisteína 100 g<sup>-1</sup> de tempeh (NAKAJIMA et al., 2005).

O teor das isoflavonas e a composição centesimal de tempeh preparado com as cultivares de soja BR 16 e IAS 5 sob diferentes condições de processamento de tempeh armazenado e refrigerado foram analisados. O teor de agliconas triplicou no intervalo entre 6 e 24 h de fermentação. Porém, os autores não consideraram o efeito das outras variáveis do processo como a hidratação e o cozimento (FERREIRA, et al., 2011). Entretanto, tempelhs preparados com diferentes cultivares de soja brasileira utilizando 17 h de hidratação, 30 minutos de cozimento e 26 h de fermentação com *Rhizopus oligosporus* a 32°C obtiveram um

aumento de apenas 0,5 vezes no teor de isoflavonas agliconas, quando comparado com os grãos de soja (BAVIA et al., 2012).

#### 2.4.3 Efeitos Benéficos Do Tempeh

O tempeh é um alimento com alto valor nutritivo de fácil digestibilidade devido a degradação das macromoléculas em unidades menores. É um produto de fácil aceitação pelo consumidor.

A fermentação reduz os fatores antinutricionais, taninos, fitase e produz ácidos que inibem a produção de bactérias patogênicas, uma particularidade importante na produção de alimentos especiais para grupos como crianças e idosos. Em estudo realizado com crianças desnutridas com diarreia, a reabilitação foi mais rápida quando as crianças foram alimentadas com mingau contendo milho e tempeh, do que quando foram alimentadas com mingau contendo milho e leite, além de apresentar proteção contra os efeitos nocivos da infecção por *E.coli* (KIERS et al., 2002; LIU,2004).

Devido ao alto conteúdo de proteínas da soja, o tempeh pode reduzir o risco de doenças cardiovasculares, pois é livre de gorduras saturadas e possui baixos níveis de colesterol e LDL. O FDA declara " 25 g de proteína de soja por dia como parte da dieta com baixos níveis de colesterol e gorduras, pode reduzir o risco de doenças coronárias" (BABU et al., 2009).

Pesquisas sugerem que o consumo de proteína de soja pode ajudar na proteção de ossos fracos e quebradiços, especialmente nas mulheres no período de pós-menopausa, que possuem o maior risco à osteoporose. Também auxilia na perda de peso pela redução da quantidade de gordura armazenada no corpo, aumentando a massa muscular (MESSINA; HUGHES, 2003).

Um dos maiores interesses no tempeh são as modificações das isoflavonas da soja. Entre vários alimentos de soja analisados o tempeh apresentou maior teor de agliconas (WANG; MURPHY, 1996).

### 3 OBJETIVOS

O objetivo do trabalho foi investigar o efeito dos diferentes tempos de hidratação, cozimento e fermentação dos grãos de soja da cultivar BRS267 com *Rhizopus oligosporus*, durante a elaboração do tempeh sobre a bioconversão das isoflavonas glicosídicas em agliconas.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAIS

Para o preparo do tempeh foi utilizada a cultivar de soja BRS 267 fornecida pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa-Soja, Londrina/Paraná, safra 2010/2011, cultivada na região de Ponta Grossa – PR (Latitude 25°09', Longitude 50°16', a 975 m de altitude, com temperatura média anual de 17,6°C).

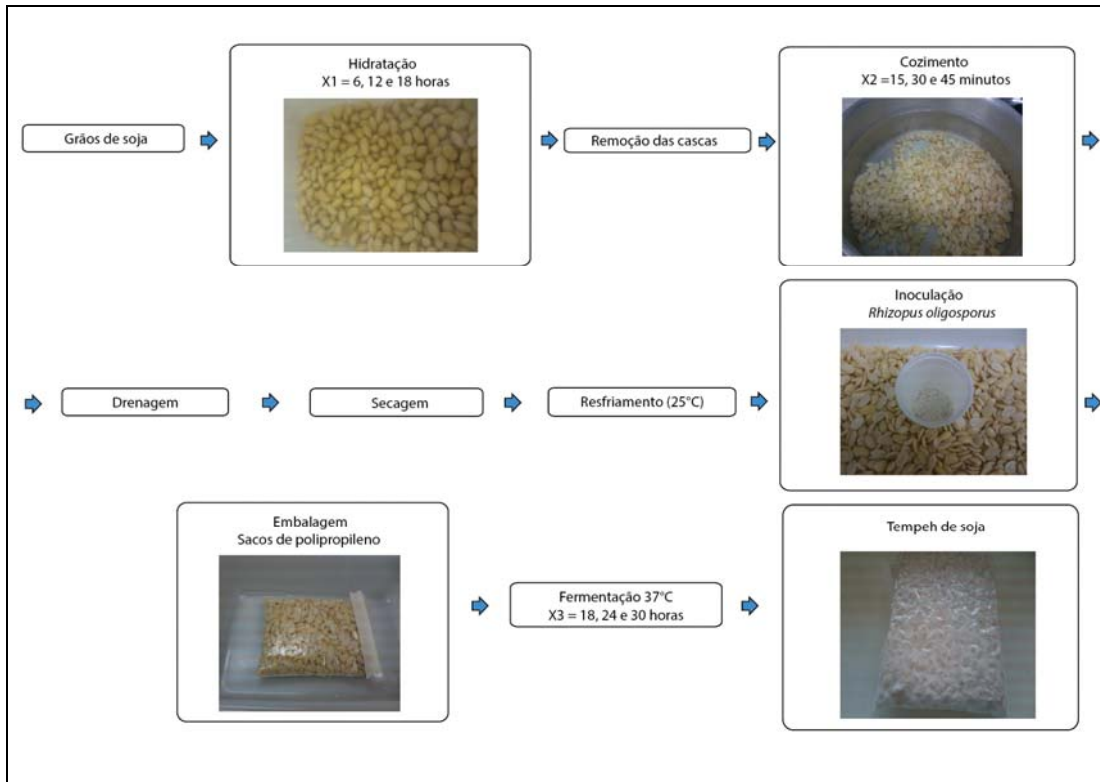
Para a fermentação dos grãos de soja foi utilizado o inóculo do fungo *Rhizopus microsporus var. oligosporus* adquirido pelo INTSOY (International Soybean Program, University of Illinois, EUA).

### 4.2 MÉTODOS

#### 4.2.1 Planejamento Experimental do Preparo do Tempeh

Os tempehs foram preparados conforme o método tradicional descrito por Wei (1991) com modificações (Figura 2). Foi aplicado o delineamento composto central (DCC)  $2^3$  com 3 variáveis independentes e 3 níveis de variação, totalizando 17 experimentos, conforme apresentado nas Tabelas 1 e 2. Para cada ensaio, foi utilizado 100 g de soja que foram hidratadas ( $X_1 = 6, 12$  e  $18$  h) na proporção de 1:10 (p/v) e descascadas manualmente. Os cotilédones foram cozidos em água ( $X_2 = 15, 30$  e  $45$  min), drenados e mantidos a temperatura de 25°C. Em seguida, os cotilédones foram inoculados com *Rhizopus oligosporus*, utilizando 2 g de inóculo por 100 g de cotilédones de soja cozidos. Os cotilédones foram homogeneizados com o inóculo e acondicionados em sacos de polipropileno perfurados e mantidos a 37°C em BOD conforme estabelecido o tempo de fermentação ( $X_3 = 18, 24$  e  $30$  h). O tempo mínimo de 18 h de fermentação foi necessário para que os micélios do fungo apresentassem uma distribuição uniforme sobre os cotilédones e para a obter um produto com aspecto de massa compacta e branca característico de um tempeh. Em seguida, os tempehs foram liofilizados (ChristAlpha 2-4 LD plus, Germany), armazenados em freezer a temperatura de -26°C até a realização das análises de isoflavonas.

**Figura 3** – Preparo de tempeh com cultivar de soja BRS 267 e aplicando diferentes condições de hidratação, cozimento e fermentação com o fungo *Rhizopus oligosporus*.



Para avaliar os diferentes efeitos dos tempos de hidratação, cozimento e fermentação dos grãos de soja sobre o teor de isoflavonas foi utilizado um delineamento composto central (DCC)  $2^3$  com 3 repetições no ponto central, totalizando 17 ensaios aleatorizados. A Tabela 1 apresenta os níveis reais e codificados das variáveis independentes utilizadas no (DCC)  $2^3$ , cada variável apresentou três níveis de variação que foram estabelecidos em ensaios preliminares. A Tabela 2 apresenta a matriz do delineamento com os níveis de variação das variáveis independentes  $X_1$  = horas de hidratação,  $X_2$  = minutos de cozimento e  $X_3$  = horas de fermentação.

**Tabela 1** – Níveis reais e codificados das variáveis independentes utilizadas no DCC ( $2^3$ )

Fatores	Níveis		
	-1	0	+1
$X_1$ : Tempo de hidratação (h)	6	12	18
$X_2$ : Tempo de cozimento (min)	15	30	45
$X_3$ : Tempo de fermentação (h)	18	24	30

**Tabela 2** – Matriz do delineamento composto central (DCC)  $2^3$  para elaboração de temphehs utilizando cultivar de soja BRS 267

<u>Ensaio</u>	$\bar{X}_1$ Tempo de hidratação (h)	$\bar{X}_2$ Tempo de cozimento (min)	$\bar{X}_3$ Tempo de fermentação (h)
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	+1
3	-1	+1	-1
4	-1	+1	+1
5	+1	-1	-1
6	+1	-1	+1
7	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1
9	-1	0	0
10	+1	0	0
11	0	-1	0
12	0	+1	0
13	0	0	-1
14	0	0	+1
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0

Após a elaboração dos temphehs de acordo com o delineamento experimental foram determinadas as seguintes funções respostas:  $Y_1$  = mg de genistina  $100 \text{ g}^{-1}$  de amostra liofilizada e desengordurada,  $Y_2$  = mg de malonil-daidzina  $100 \text{ g}^{-1}$  de amostra liofilizada e desengordurada,  $Y_3$  = mg de malonil-genistina  $100 \text{ g}^{-1}$  de amostra liofilizada e desengordurada,  $Y_4$  = mg de daidzeína  $100 \text{ g}^{-1}$  de amostra liofilizada e desengordurada e  $Y_5$  = mg de genisteína  $100 \text{ g}^{-1}$  de amostra liofilizada e desengordurada de cada ensaio e o modelo foi expresso conforme a equação (1): onde  $Y$  = função resposta,  $X_1$ ,  $X_2$  e  $X_3$  = variáveis codificadas,  $\beta$  = coeficientes estimados na superfície de resposta,  $e$  = resíduo (erro experimental).

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + e, \text{ Equação (1)}$$

A partir das avaliações das funções respostas ( $Y_1$ ,  $Y_2$ ,  $Y_3$ ,  $Y_4$ ,  $Y_5$ ) foram realizadas as análises de regressão, análise de variância (ANOVA) e determinados o coeficiente de regressão ( $R^2$ ). O modelo da equação foi ajustado aos dados experimentais e obtido o modelo proposto. A partir dos gráficos de superfícies de respostas, foram estimados os parâmetros de desejabilidade e efetuada a comparação dos resultados das funções respostas obtidas ( $Y$ ) e funções respostas estimadas ( $\hat{Y}$ ), para a validação do modelo proposto e a obtenção da melhor condição de processamento do tempheh com maior conversão de isoflavonas glicosídicas em agliconas.

Todas as análises foram realizadas utilizando o programa STATISTICA 8.0 (Stat Soft Inc.,Tulsa, USA, 2007).

#### 4.2.2 Quantificação De Isoflavonas Por Clue

Os grãos de soja foram moídos e desengordurados com hexano (1:10 p/v) por 60 min a temperatura ambiente com agitação rotativa contínua e filtrados à vácuo. Os tempeshs foram liofilizados, moídos e desengordurados. A extração de isoflavonas foi realizada com uma mistura de solventes orgânicos contendo água ultra pura, acetona e etanol (1:1:1, v/v/v), conforme descrito por Yoshiara et al. (2012). A extração foi realizada em triplicada utilizando 0,3 g de amostra com 6mL de solvente extrator e agitação em vortex a cada 15 min por 1 h à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras com a solução extratora foram colocadas em banho ultrassônico por 15 min à temperatura ambiente, centrifugadas (2500 *xg*. 15 min a 4 °C) (Centrifuge 5804R-Eppendorf, Hamburg, GE) e filtradas (Millexfilter – LH (0,22  $\mu\text{m}$ ). Aliquotas de 1,4  $\mu\text{L}$  em triplicata do filtrado foram injetadas automaticamente no cromatógrafo líquido UPLC® Waters.

A separação e quantificação das isoflavonas foram conduzidas em coluna de fase reversa (modelo Acquity – UPLC BEH C18, Waters, dimensão de 2,1 mm x 50 mm e tamanho da partícula de 1,7  $\mu\text{m}$ ). A eluição foi realizada com gradiente não linear, utilizando fase móvel. A água acidificada em pH 3,0 ajustado com ácido acético glacial e B acetonitrila com fluxo de 0,7 mL min<sup>-1</sup> a 35°C. O gradiente foi iniciado com 90% de eluente A e 10% de eluente B e em 8 min de eluição, o gradiente atingiu proporção de 0% de A e 100% de B e as condições iniciais retornaram em 9 min. O tempo total de corrida foi de 10 min. O detector foi de arranjo de diodos (Waters) com comprimento de onda ajustado para 260 nm. As soluções padrão para a construção das curvas de calibração (área de pico x teor de isoflavonas) foram daidzina, genistina, glicitina, malonil-daidzina, malonil-genistina, malonil-glicitina, acetildaidzina, acetilgenistina, acetilglicitina, gliciteína e genisteína (0,1; 0,025; 0,006 e 0,002 mg ml<sup>-1</sup>) e daidzeína (0,1; 0,025; 0,006; 0,002 e 0,001 mg ml<sup>-1</sup>). Os padrões em triplicata foram injetados originando os cromatogramas correspondentes e cada forma química de isoflavonas com respectivos tempos de retenção. Os picos de cada forma de isoflavonas foram identificados por comparação dos tempos de retenção e espectros na região do UV dos respectivos padrões de referência. O aplicativo acoplado no cromatógrafo gerou as curvas de calibração e as concentrações de isoflavonas foram calculadas e expressas em mg de isoflavonas 100 g<sup>-1</sup> de amostra liofilizada e desengordurada. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLERCREUTZ, H.; MAZUR, W.; BARTELS, P.; ELOMAA, Vv.; WATANABE, S.; WAHALA, K.; LANDSTROM, M.; LUNDIN E.; BERGH, A.; DAMBER, J.E.; AMAN, P.; WIDMARK, A.; JOHANSSON, A.; ZHANG, J.X.; HALLMANS, G. Phytoestrogens and prostate disease. **J. Nutrition**. 130 (3), p. 658-659, 2000.
- BABU, D., BHAKYARAJ; VIDHYALAKSHMI R..A Low Cost Nutritious Food “Tempeh”- A Review, **World Journal of Dairy & Food Sciences** 4 (1): 22-27, 2009.
- BARBOSA, A. C. L.; HASSIMOTTO, N. M. A.; LAJOLO, M. F.; GENOVESE, M. I. Teores de isoflavonas e capacidade antioxidante da soja e produtos derivados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 4, p. 921-926, out.-dez. 2006.
- BAVIA, A.C.F.; SILVA, C.E.; FERREIRA, M.P.; LEITE, R.S.; MANDARINO, J.M.G.; CARRÃO-PANIZZI, M.C. Chemical composition of tempeh from soybean cultivars specially developed for human consumption. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 32(3): 613-620. jul.-set. 2012.
- BEHRENS, J.H.; SILVA, M.A. Atitude do consumidor em relação à soja e produtos derivados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.24, p. 431-439, 2004.
- BOWLES, S.; DEMIATE, I. M. Caracterização físico-química de okara e aplicação em pães do tipo francês. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, p.652-659, jul –set, 2006.
- BOYE, J.; RIBÉREAU S. Assessing Compositional Differences in Soy Products and Impacts on Health Claims, Soybean and Nutrition, Prof. Hany El-Shemy (Ed.), ISBN: 978-953-307-536-5, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/soybean-and-nutrition/assessing-compositional-differences-in-soy-products-and-impacts-on-health>. **Food Research and Development Centre. Agriculture and Agri-food Canada**. 2011.
- BROUNS, F. Soy isoflavones: a new and promising ingredient for the health food sector. **Food Research International**, v.35, p.187–193, 2002.
- CARRÃO-PANIZZI, M.C., BELEIA A.D.; KITAMURA; OLIVEIRA M.C. Effects of genetics and environment on isoflavone content of soybean from different regions of Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, n.10, p.1787-1795, out. 1999.
- CARRÃO-PANIZZI, M. C., BORDIGNON, J.R. Activity of beta-glucosidase and levels of isoflavon e glucosides in soybean cultivars affected by the environment. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 35, (5), p. 873-878, 2000.
- CHEN, T. R.; WEI, Q. K. Analysis of bioactive aglycone isoflavones in soybean and soybean products. **Nutrition & Food Science**, v. 38, n. 6, p. 540 – 547, 2008.
- CUEVAS-RODRIGUEZ, E.O., MIAN-CARRILLO, J., MORA-ESCOBEDO, R., CARDENAS-VALENZUEL, O.G.; REYES-MORENO, C. 2004. Quality protein maize (*Zea mays L.*) tempeh flour through solid state fermentation process. **Lebensmittel Wissenschaft Und Technologie Food Science and Technology** 37, 59-67.

ESTEVEES, E.A.; MONTEIRO, J.B.R. Efeitos benéficos das isoflavonas de soja em doenças crônicas. **Revista de Nutrição**, Campinas, 14(1), 43-52, 2001.

FERREIRA, M.P.; OLIVEIRA N. M.C.; MANDARINO, J.M.; SILVA J.B.; IDA I.E.; CARRÃO-PANIZII, M.C. Changes in the isoflavone profile and in the chemical composition. **Revista de Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.46, n.11, p.1555-1561, nov. 2011.

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

GENOVESE, M.I.; HASSIMOTTO, N.M.A.; LAJOLO F.M. Isoflavone Profile and Antioxidant Activity of Brazilian Soybean Varieties. **Food Science and Technology International**, v.11, p. 205–211, 2005.

GOLBITZ, P.; JORDAN, J. Soyfoods: Market and Products. In: RIAZ, Mian N. **Soy applications in food**. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006. p. 1-22.

HACHMEISTER, K. A.; FUNG, Y. C. D. Tempeh: a mold-modified indigenous fermented food made from soybeans and/or cereal grains. **Critical Reviews in Microbiology**, 19 (3): 137-188. 1993.

HETTIRACHCHY, N., KALAPATH, U. Soybean Protein Products. In LIU, K. **Soybeans chemistry, technology and utilization**. New York: Chapman & Hall, 1997. 532 p.

HOPPE, B.M.; JHA C.H.; EGGE H., Structure of an antioxidant from fermented soybeans (tempeh). *Journal of the American Oil Chemists' Society*, Volume 74, Issue 4, p. 477-479, 1997.

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

KARYADI, D. The development of tempeh across five continents. In: AGRANOFF, J. (ed). **The complete handbook of tempeh: the unique fermented soyfood of Indonesia**. 2<sup>nd</sup> ed. Singapore: American Soybean Association, Liat Towers, 2001. p. 21-25.

KIERS, J.L.; M.J.R. NOUT; F.M. ROMBOUTS; M.J.A. NABUURS AND J. VAN DER MEULEN, 2002. Inhibition of adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 by soya bean Tempe. *Letters in Applied Microbiology*, 35: 311-315.

KITAMURA, A.J. Breeding trials for improving the food-processing quality of soybeans. **Trends in Food Science and Technology**, v.43, p. 64-67, 1993.

KONOVSKY, J.; LUMPKIN, T.A.; MACCLARY, D. **Edamame: the vegetable soybean**. In. A.D. O'Rourke (Ed), *Understanding the Japanese Food and Agrimarket: a multifaceted opportunity*. Binghamton: Haworth Press, 1994. p.173-181.

KUDOU, S.; FLEURY, Y.; WELTI, D.; MAGNOLATO, D.; UCHIDA, T.; KITAMURA, K.; OKUBO, K. Malonyl isoflavone glycosides in soybeans seeds (*Glycine max* Merrill). **Agriculture and Biological Chemistry**, v. 55, n. 9, p. 2227-2233, 1991.

LEE, H.P.; GOURLEY, L.; DUFFY, S.W.; LEE, J.E.; DAY, N.E. Dietary effects on breast-cancer risk in Singapore. **Lancet**.v.337, p.1197 – 1200, 1991.

LIU, K. **Soybeans: Chemistry, Technology and Utilization**. New York: Chapman & Hall, 1997. 532p.

LIU, K. Current constraints in soybean food utilization and efforts to overcome them. **IV WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE IV**.IN: **Proceedings**. p.409-418,1999.

LIU, K. **Soybeans as functional foods and ingredients**.Illinois: AOCS Press, 2004. 331 p.

LONDRINA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA. Informe técnico. 2009.

LONDRINA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA. Informe técnico. 2012.

LUND T.D.; MUNSON DJ.; HALDY M.E., SETCHELL K.D.; LEPHART E.D.; HANDA R.J. Equol is a novel anti-androgen that inhibits prostate growth and hormone feedback. **Biol. Reprod.** 70:1188-1195. 2004.

MCCUE, P.; SHETTY, K. Health Benefits of Soy Isoflavonoids and Strategies for Enhancement: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.44, p.361-367, 2004.

MESSINA M., MESSINA V. Soyfoods, soybean isoflavones, and bone health: A brief overview, **Journal of Renal Nutrition**, Volume 10, Issue 2, April 2000, pages 63-68.

MESSINA M.J.; HUGHES C. Efficacy of soyfoods and soybean isoflavone supplement for alleviating menopausal symptoms is positively related to initial hot flash frequency. **J. Med. Food**, 6:1-11. 2003.

MORAIS, C. A.; SILVA, A.L. Valor nutritivo e funcional da soja. **Revista brasileira de nutrição clínica**, 15(2):306-15, abr. - jun. 2000.

NAKAJIMA, N. et al. Analysis of Isoflavone Content in Tempeh, a Fermented Soybean, and Preparation of a New Isoflavone-Enriched Tempeh. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 100, no. 6, p. 685–687, 2005.

NOUT, M. J. R.; ROMBOUTS, F.M. Recent developments in tempeh research – A review. **Journal Applied Bacteriology**. v.69, p. 609 – 633, 1990.

NOUT, M. J. R.; KIERS, J. L. Tempeh as a functional food. In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 7.; INTERNATIONAL SOYBEAN PROCESSING AND UTILIZATION CONFERENCE, 4.; CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 3., 2004, Foz do Iguaçu. **Abstracts of contributed papers and posters**. Londrina: Embrapa Soybean, 2004. p. 708-713. (Embrapa Soja. Documentos, n. 228). Editado por Flávio Moscardi, Clara Beatriz Hoffmann-Campo, Odilon Ferreira Saraiva, Paulo Roberto Galerani, Francisco Carlos Krzyzanowski, Mercedes Concordia Carrão-Panizzi.

REHMS, H.; BARZ, W. 1995. Degradation of stachyose, raffinose, melibiose and sucrose by different tempeh-producing *Rhizopus* fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology** 44, 47-52.

REYES-MORENO, C., CUEVAS-RODRIGUEZ, E.O., MILAN-CARRILLO, J., CARDENAS-VALENZUELA, O.G., BARRON-HOYOS, J. 2004. Solid state fermentation process for producing chickpea (*Cicerarietinum L*) tempeh flour. Physicochemical and nutritional characteristics of the product. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 84, 271-278.

RIAZ, N. Miaz. **Soy Application in Foods**. CRC Press, Ed.1. 2006. 288 p.

SETCHELL, K. D. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. **Am J Clin Nutr**. vol. 68, no. 6, p.1333S-1346S, December 1998.

SETCHELL, K.D., NECHEMIAS, L.Z., CAI J., HEUBI J.E. Isoflavone content of infant formulas and the metabolic fate of these phytoestrogens in early life. **Am J Clin Nutr**. vol. 68 no. 61453S-1461S. December 1998.

SETCHELL, K.D. CASSIDY, A. Dietary isoflavonas: biological effects and relevance to human health. **The Journal of Nutrition**. v.129, p. 758S-767S, 1999.

SHARMA, R. ; SARBHOY, A.K. Tempeh-a fermented food from soybean. **Current Science** 53, p. 325-326.1984.

SHURTLEFF, W.; AOYAGI, A. **The book of tempeh**. New York: Harper & Row, 2001.

STEINKRAUS, K.H. Indonesian tempeh and relates fermentation. In: STEINKRAUS, K.H. (ed.). **Handbook of indigenous fermented foods**. New York: Marcel Dekker, p.1 – 94, 1983.

SILVA, J.B.; CARRÃO-PANIZZI, M.C.C.; PRUDENCIO, S. H. Chemical and physical composition of grain-type and food-type soybean for food processing. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n.7, p. 777-784, 2009.

STEINKRAUS, K.H. Indonesian tempeh and relates fermentation. In: STEINKRAUS, K.H. (ed.). **Handbook of indigenous fermented foods**. New York: Marcel Dekker, p.1 – 94, 1983.

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

TORRES-PENARANDA, A.V.; REITMEIER, C.A. Sensory descriptive analysis of soymilk. **Journal of Food Science**, v.66, p.352-356, 2001.

USDA,.United States Department of Agriculture. **World Agricultural Supply and Demand Estimates**. January 11, 2013.

VAN DER RIET, W.B. Food chemical analysis of tempeh prepared from South African-grown soy beans. **Food Chem**. v.25:197-206. Wight AW, Cilliers J JL, Datel JM. 1987.

VELLO, N.A. Ampliação da base genética do germoplasma e melhoramento da soja na ESALQ-USP. In: **Simpósio sobre cultura e produtividade da soja**, 1.; 1991, Piracicaba. Anais. Piracicaba: FEALQ, 1992. p. 60-81.

VIEIRA, R. F.; LOPES, J. D. S. **Produção de Brotos Comestíveis: Feijão Moyashi, Alfafa, Trevo, Rabanete e Brócolis**. Viçosa: CPT, 2001. 108 p.

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

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

WEI, L.S. Domestic soybean consumption in Asia. In: SOYBEAN PROCESSING FOR FOOD USES, Illinois, 1991. **Anais of Illinois: International soybean program**, 1991. p.162 – 183.

WINARNO, F.G. AND N.R.REDDY. Tempe. In Reddy, N.R., M.D. Pierson, and D. K. Salunkhe (eds.) **Legume-Based Fermented Foods**. CRC Press. Boca Raton. 93-117. 1986.

WINARNO, F.G. Production and utilization of tempeh in Indonesian Foods. In: APPLEWHITE, T.H. (ed). **Proceedings of the World Congress: vegetable protein utilization in human food and animal feedstuffs**. Champaign: **American Oil Chemists Society**, 1989. p.363.

YOSHIARA, L. Y., MADEIRA, T. B., DELAROZA, F., SILVA, J. B., IDA, E. I. Optimization of soy isoflavone extraction with different solvents using the simplex-centroid mixture design. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, 9, p.978-986.2012.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos estão redigidos na forma de artigo científico.

### 6.1 ARTIGO: EFEITO DAS CONDIÇÕES DE PREPARO DO TEMPEH DE SOJA NA BIOCONVERSÃO DAS ISOFLAVONAS GLICOSÍDICAS EM AGLICONAS

**Cristiane Wing Chong Borges<sup>a</sup>, Mercedes Concórdia Carrão-Panizzi<sup>b</sup>, José Marcos Gontijo Mandarinho<sup>c</sup>, Josemeyre Bonifácio da Silva<sup>a</sup> e Elza Iouko Ida<sup>a</sup>**

**RESUMO:** O tempeh é um alimento tradicional fermentado com elevado teor de proteína e elaborado a partir dos grãos de soja descascados, hidratados, cozidos e fermentados. O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito dos diferentes tempos de hidratação, cozimento e fermentação dos grãos de soja com *Rhizopus oligosporus* durante a elaboração do tempeh na bioconversão das isoflavonas glicosídicas em agliconas aplicando o delineamento composto central (DCC) 2<sup>3</sup> com três variáveis independentes e 3 níveis de variação totalizando 17 ensaios. Os grãos de soja cultivar BRS 267 foram hidratados por 6, 12 e 18 h, cozidos por 15, 30 e 45 min e fermentados com o fungo por 18, 24 e 30 h a 37°C. Os tempehs assim preparados foram avaliados quanto ao teor das diferentes formas de isoflavonas por cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE). A cultivar de soja BRS 267 apresentou 48,33 mg de genistina 100 g<sup>-1</sup> de amostra liofilizada e desengordurada, 14,84 mg de daidzina 100 g<sup>-1</sup> de amostra liofilizada e desengordurada, 157,67 mg de malonil-genistina 100 g<sup>-1</sup> amostra liofilizada e desengordurada e 60,59 mg de malonil-daidzina 100 g<sup>-1</sup> amostra liofilizada e desengordurada, 8,80 mg de genisteína 100 g<sup>-1</sup>, a daidzeína e as formas acetil glicosídicas não foram detectadas. Após o processo de obtenção do tempeh utilizando 18 h de hidratação, 45 min de cozimento e 18 h de fermentação, o teor de daidzeína foi de 2,75 mg em 100 g de amostra desengordurada. Enquanto que a forma aglicona genisteína após o processo de obtenção do tempeh utilizando 18 h de hidratação, 45 min de cozimento e 18 h de fermentação, o teor deste constituinte foi de 36,34 mg em 100 g de amostra desengordurada, indicando uma bioconversão de 4,2 vezes em relação ao teor inicial dos grãos de soja.

**Palavras-chave:** Tempeh. Cozimento. Fermentação. *Rhizopus oligosporus*. Genisteína. Daidzeína.

<sup>a</sup> Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Caixa Postal 10.001, CEP 86.057-970, Londrina, Paraná, Brasil. E-mail: criswborges@hotmail.com, josibonifacio@uel.br; elida@uel.br;

<sup>b</sup> Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Centro Nacional de Pesquisa de Trigo, Rodovia BR 285, km 294 – Caixa Postal 451, CEP 99001-970, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil, E-mail: mercedes@embrapa.br.

<sup>c</sup> Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Soja, Rodovia Carlos João Strass, Caixa Postal 231, CEP 86001-970, Londrina, Paraná, Brasil, E-mail: jmarcos@embrapa.br

**ABSTRACT:** Tempeh is a traditional fermented soybean food with high protein and prepared from hulled grains, soaked, boiled and fermented. The aim of this study was to investigate the effect of different times of soaking, boiling and fermentation of soybeans grains with *Rhizopus oligosporus* during the preparation of tempeh in the bioconversion of isoflavone glucosides to aglycones using Central Composite Design (CCD)  $2^3$  with 3 independent variables and 3 varying levels totalizing 17 experiments. The soybean grains of BRS 267 cultivar were hydrated in water for 6, 12 and 18 h, cooked in boiling water for 15, 30 and 45 min and fermented for 18, 24 and 30 h at 37 °C with the *Rhizopus oligosporus*. The tempehs obtained were evaluated for isoflavones levels by Liquid Chromatography Ultra Efficiency (CLUE). The soybean BRS 267 cultivar showed the following levels of isoflavone: 48.33 mg of genistin  $100\text{ g}^{-1}$  lyophilized and defatted sample, 14.84 mg of daidzin  $100\text{ g}^{-1}$  lyophilized and defatted sample, 157.67 mg of malonyl-genistin  $100\text{ g}^{-1}$  lyophilized and defatted sample, 60.59 mg of malonyl-daidzin  $100\text{ g}^{-1}$  lyophilized and defatted sample, acetyl-glucoside (not detected) and 8.80 mg of genistein  $100\text{ g}^{-1}$  lyophilized and defatted sample. The daidzein was not detected in soybean grains and after the processing to production of tempeh with 18 h of soaking, 45 min of cooking and 18 h of fermentation, the level of this constituent was 2.75 mg.  $100\text{ g}^{-1}$  of lyophilized and defatted sample. After 18 h of soaking, 45 min of cooked and 18 h of fermentation, the content of genistein was 36.34 mg  $100\text{ g}^{-1}$  of lyophilized and defatted sample, indicating bioconversion of 4.2 times in relation to the initial content of the soybeans grains.

**Key words:** Tempeh. Cooking. Fermentation. *Rhizopus oligosporus*. Genistein. Daidzein.

### 6.1.1 Introdução

O tempeh é um alimento de soja fermentado e tradicionalmente produzido na Indonésia, onde é diariamente comercializado e consumido de diversas maneiras (LIU, 2004). É elaborado a partir dos grãos inteiros de soja descascados, que são hidratados, cozidos e fermentados com o fungo *Rhizopus oligosporus* em temperaturas de 32 a 37°C. A composição química do tempeh fresco é de 48% de proteínas e 25% de lipídeos (KARYADI, 2001)

A soja contém compostos bioativos sendo que as isoflavonas são os mais relevantes devido aos efeitos benéficos à saúde humana. Dentre eles, atividade estrogênica, antifúngica, anti-tumoral, antioxidante, contribuição para a redução do LDL, prevenção da osteoporose e melhoria nos sintomas da menopausa (LEE et al., 1991, MESSINA, 2003). Em cada indivíduo, o efeito das isoflavonas se diferencia, dependendo da sua imunidade, hidrólise pelas bactérias intestinais, trânsito intestinal, idade, grupo étnico, dieta e presença ou não de doenças intestinais. As isoflavonas são absorvidas no intestino delgado e grosso, onde sofrem hidrólise pelas bactérias intestinais e vão para o fígado, onde sofrem conjugação com o ácido

glicurônico e em menor quantidade com o ácido sulfúrico, para então passarem a ter biodisponibilidade e atividade biológica no organismo (SETCHELL, 1998).

A aglicona genisteína é a forma de maior absorção pelo organismo humano. Após a ingestão, as formas conjugadas das isoflavonas são hidrolisadas pelas enzimas  $\beta$ -glucosidases provenientes das bactérias intestinais. Ocorre a liberação das agliconas daidzeína e genisteína, dos metabólitos específicos, equol e/ou o-desmetilangolensin (ODMA), que são produzidos a partir da daidzeína e o p-etinilfenol produzido a partir da genisteína. Similarmente aos estrógenos, essas substâncias podem sofrer recirculação enterohepática por meio da qual as isoflavonas são desconjugadas no intestino e reabsorvidas ou excretadas pelas fezes (SETCHELL, 1998).

Foram identificados teores superiores a 300 mg de isoflavonas totais  $100\text{g}^{-1}$  de grãos de soja em base seca e foram identificados teores que variaram de 126 a 388 mg de isoflavonas totais  $100\text{g}^{-1}$  de produtos comerciais de soja. Esta composição varia de acordo com as características das cultivares, época da semeadura e localização geográfica (KUDOU et al., 1991; WANG; MURPHY, 1994a).

Em outubro de 1999, o FDA aprovou a indicação de consumo de 25 g de soja por dia, em uma dieta com baixo teor de ácidos graxos insaturados e colesterol para a contribuição na redução do risco de doenças coronárias. A recomendação para o consumo diário é de 30–50 mg de isoflavonas totais.

As condições para o preparo de tempeh variam de acordo com o tempo e temperatura de hidratação, cozimento e fermentação dos grãos de soja (HACHMEISTER; FUNG, 1993). Durante a fermentação, ocorrem diversas modificações químicas responsáveis pelo sabor, aroma e textura característicos do produto (NOUT; KIERS, 2004).

Em tempehs fermentados por 24 h não foram detectadas as formas glicosídicas e acetil-glicosídicas. Foram detectados 87 mg de isoflavonas malonil-glicosídicas  $100\text{g}^{-1}$  de tempeh, 15,7 mg das formas agliconas  $100\text{g}^{-1}$  de tempeh, sendo que 8,0 mg de daidzina  $100\text{g}^{-1}$  de tempeh e 7,2 mg de genisteína  $100\text{g}^{-1}$  de tempeh (NAKAJIMA et al., 2005).

O teor das diferentes formas de isoflavonas e composição centesimal de tempeh preparado com as cultivares de soja BR 16 e IAS 5 sob diferentes condições de processamento de tempeh armazenado e refrigerado foram analisados. O teor de agliconas triplicou no intervalo entre 6 - 24 h de fermentação. Porém, os autores não consideraram o efeito das outras variáveis do processo como a hidratação e o cozimento (FERREIRA et al., 2011). Entretanto, tempehs preparados com diferentes cultivares de soja brasileira utilizando

17 h de hidratação, 30 minutos de cozimento e 26 h de fermentação com *Rhizopus oligosporus* a 32°C obtiveram um aumento de apenas 0,5 vezes no teor de isoflavonas agliconas, quando comparado com os grãos de soja (BAVIA et al., 2012).

A bioconversão de isoflavonas glicosídicas requer hidrólise pela ação da enzima  $\beta$ -glicosidase para converter nas formas agliconas (daidzeína, genisteína e gliciteína). O processo de fermentação sofre influência das condições de preparo do tempeh, dentre elas, tempo, temperatura, pH, oxigênio, quantidade de inóculo e umidade relativa (NOUT; KIERS, 2004).

O *Rhizopus oligosporus* é a espécie preferida para a fermentação do tempeh de soja, devido ao rápido crescimento a temperaturas entre 30 a 42°C. Dentre as principais características do fungo estão a alta atividade proteolítica, lipolítica, forte produção de antioxidantes e a incapacidade de fermentar a sacarose (STEINKRAUS et al., 1983; SHARMA; SARBHOY, 1984; LIU, 1997).

O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito da hidratação, cozimento e fermentação da soja cultivar BRS267 com o fungo *Rhizopus oligosporus* na bioconversão das isoflavonas glicosídicas em agliconas.

## 6.1.2 Material e Métodos

### 6.1.2.1 Materiais

Para o preparo do tempeh foi utilizada a cultivar de soja BRS 267 fornecida pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa-Soja, Londrina/Paraná, safra 2010/2011, cultivada na região de Ponta Grossa – PR (Latitude 25°09', Longitude 50°16', a 975 m de altitude, com temperatura média anual de 17,6°C).

Para a quantificação de isoflavonas por cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) foram utilizados os seguintes padrões: glicosídeos, malonil e acetil conjugados e agliconas da Sigma Aldrich (St. Louis, Estados Unidos). Os solventes para separação e quantificação foram de grau cromatográfico. Todos os demais reagentes foram de grau analítico e de diferentes procedências.

Para a fermentação dos grãos de soja foi utilizado o inóculo do fungo *Rhizopus microsporus var. oligosporus* adquirido pelo INTSOY (International Soybean Program, University of Illinois, EUA).

### 6.1.3 Métodos

#### 6.1.3.1 Planejamento experimental do preparo do tempeh

Para avaliar os efeitos dos diferentes tempos de hidratação, cozimento e fermentação dos grãos de soja sobre o perfil de isoflavonas foi aplicado o delineamento composto central (DCC)  $2^3$  com 3 variáveis independentes e 3 níveis de variação, totalizando 17 experimentos. A Tabela 1 apresenta os níveis reais e codificados das variáveis independentes utilizadas no (DCC)  $2^3$ , cada variável apresentou três níveis de variação que foram estabelecidos em ensaios preliminares. A Tabela 2 apresenta a matriz do delineamento com os níveis de variação das variáveis independentes  $X_1$  = horas de hidratação,  $X_2$  = minutos de cozimento e  $X_3$  = horas de fermentação.

Os tempehs foram preparados conforme o método tradicional descrito por Wei (1991) com modificações. Para cada ensaio foram utilizadas 100 g de grãos de soja que foram hidratadas ( $X_1$  = 6, 12 e 18 h) na proporção de 1:10 (p/v) e descascadas manualmente. Os cotilédones foram cozidos em água ( $X_2$  = 15, 30 e 45 min), drenados e mantidos a temperatura de 25°C. Em seguida, os cotilédones foram inoculados com *Rhizopus oligosporus*, utilizando 2 g de inóculo por 100 g de cotilédones de soja cozidos. Os cotilédones foram homogeneizados com o inóculo e acondicionados em sacos de polipropileno perfurados e mantidos a 37°C em BOD conforme estabelecido o tempo de fermentação ( $X_3$  = 18, 24 e 30 h). O tempo mínimo de 18 h de fermentação foi necessário para que os micélios do fungo apresentassem uma distribuição uniforme sobre os cotilédones e para a obter um produto com aspecto de massa compacta e branca característico de um tempeh. Em seguida, os tempehs foram liofilizados (Christ Alpha 2-4 LD plus, Germany), armazenados em freezer a temperatura de -26°C até a realização das análises de isoflavonas.

Após a elaboração dos tempehs de acordo com o delineamento experimental foram determinadas as seguintes funções respostas:  $Y_1$  = mg de genistina 100 g<sup>-1</sup> de amostra liofilizada e desengordurada,  $Y_2$  = mg de malonil-daidzina 100 g<sup>-1</sup> de amostra liofilizada e desengordurada,  $Y_3$  = mg de malonil-genistina 100 g<sup>-1</sup> de amostra liofilizada e desengordurada,  $Y_4$  = mg de daidzeína 100 g<sup>-1</sup> de amostra liofilizada e desengordurada e  $Y_5$  = mg de genisteína 100 g<sup>-1</sup> de amostra liofilizada e desengordurada de cada ensaio e o modelo foi expresso conforme a equação (1): onde  $Y$  = função resposta,  $X_1$ ,  $X_2$  e  $X_3$  = variáveis codificadas,  $\beta$  = coeficientes estimados na superfície de resposta, e = resíduo (erro experimental).

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{33} x_3^2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + e, \text{ Equação (1)}$$

A partir das avaliações das funções respostas ( $Y_1, Y_2, Y_3, Y_4, Y_5$ ) foram realizadas as análises de regressão, análise de variância (ANOVA) e determinados o coeficiente de regressão ( $R^2$ ). O modelo da equação foi ajustado aos dados experimentais e obtido o modelo proposto. A partir dos gráficos de superfícies de respostas, foram estimados os parâmetros de desejabilidade e efetuada a comparação dos resultados das funções respostas obtidas ( $Y$ ) e funções respostas estimadas ( $\hat{Y}$ ), para a validação do modelo proposto e a obtenção da melhor condição de processamento do tempeh com maior conversão de isoflavonas glicosídicas em agliconas.

Todas as análises foram realizadas utilizando o programa STATISTICA 8.0 (Stat Soft Inc., Tulsa, USA, 2007).

#### 6.1.3.2 Quantificação de isoflavonas por CLUE

Os grãos de soja foram moídos e desengordurados com hexano (1:10 p/v) por 60 min a temperatura ambiente com agitação rotativa contínua e filtrados à vácuo. Os tempehs foram liofilizados, moídos e desengordurados. A extração de isoflavonas foi realizada com uma mistura de solventes orgânicos contendo água ultra pura, acetona e etanol (1:1:1, v/v/v), conforme descrito por Yoshiara et al. (2012). A extração foi realizada em triplicada utilizando 0,3 g de amostra com 6mL de solvente extrator e agitação em vortex a cada 15 min por 1 h à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras com a solução extratora foram colocadas em banho ultrassônico por 15 min à temperatura ambiente, centrifugadas (2500 *xg*. 15 min a 4 °C) (Centrifuge 5804R-Eppendorf, Hamburg, GE) e filtradas (Millexfilter – LH (0,22  $\mu\text{m}$ )). Alíquotas de 1,4  $\mu\text{L}$  em triplicata do filtrado foram injetadas automaticamente no cromatógrafo líquido UPLC® Waters.

A separação e quantificação das isoflavonas foram conduzidas em coluna de fase reversa (modelo Acquity – UPLC BEH C18, Waters, dimensão de 2,1 mm x 50 mm e tamanho da partícula de 1,7  $\mu\text{m}$ ). A eluição foi realizada com gradiente não linear, utilizando fase móvel. A água acidificada em pH 3,0 ajustado com ácido acético glacial e B acetonitrila com fluxo de 0,7 mL.min<sup>-1</sup> a 35°C. O gradiente foi iniciado com 90% de eluente A e 10% de eluente B e em 8 min de eluição, o gradiente atingiu proporção de 0% de A e 100% de B e as condições iniciais retornaram em 9 min. O tempo total de corrida foi de 10 min. O detector foi de arranjo de diodos (Waters) com comprimento de onda ajustado para 260 nm. As soluções padrão para a construção das curvas de calibração (área de pico x teor de isoflavonas) foram

daidzina, genistina, glicitina, malonil-daidzina, malonil-genistina, malonil-glicitina, acetildaidzina, acetilgenistina, acetilglicitina, gliciteína e genisteína (0,1; 0,025; 0,006 e 0,002 mg ml<sup>-1</sup>) e daidzeína (0,1; 0,025; 0,006; 0,002 e 0,001 mg ml<sup>-1</sup>). Os padrões em triplicata foram injetados originando os cromatogramas correspondentes e cada forma química de isoflavonas com respectivos tempos de retenção. Os picos de cada forma de isoflavonas foram identificados por comparação dos tempos de retenção e espectros na região do UV dos respectivos padrões de referência. O aplicativo acoplado no cromatógrafo gerou as curvas de calibração e as concentrações de isoflavonas foram calculadas e expressas em mg de isoflavonas 100 g<sup>-1</sup> de amostra liofilizada e desengordurada. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

#### 6.1.4 Resultados E Discussão

Os grãos de soja da cultivar BRS 267 apresentaram os seguintes teores de isoflavonas: 48,33 mg de genistina 100 g<sup>-1</sup> de amostra desengordurada, 14,84 mg de daidzina 100 g<sup>-1</sup> de amostra desengordurada, 157,67 mg de malonil-genistina 100 g<sup>-1</sup> de amostra desengordurada, 60,59 mg de malonil-daidzina 100 g<sup>-1</sup> de amostra desengordurada e 8,80 mg de genisteína 100 g<sup>-1</sup> de amostra desengordurada, todos os resultados expressos em base seca. Em estudos realizados com a mesma cultivar foram encontrados 90 mg de daidzina 100 g<sup>-1</sup> de amostra desengordurada e 73,96 mg de genistina 100 g<sup>-1</sup> de amostra desengordurada, 117 mg de malonil-daidzina 100 g<sup>-1</sup> de amostra desengordurada e 86,56 mg de malonil- genistina 100 g<sup>-1</sup> de amostra desengordurada e para as agliconas 6 mg de daidzeína 100 g<sup>-1</sup> de amostra desengordurada e 21,44 mg de genisteína 100 g<sup>-1</sup> de amostra desengordurada, em base seca (SILVA et al., 2009; BAVIA et al., 2012). O teor de isoflavonas pode variar com o genótipo da planta e com as condições edafoclimáticas.

Dentre os 17 experimentos realizados (Tabela 3), o ensaio 3 obteve o maior teor de 17,41 mg de genistina 100 g<sup>-1</sup> de amostra liofilizada e desengordurada, o ensaio 1 obteve os maiores teores de 29,25 mg de malonil-daidzina 100 g<sup>-1</sup> de amostra liofilizada e desengordurada e 104,57 mg de malonil-genistina 100 g<sup>-1</sup> de amostra liofilizada e desengordurada e o ensaio 7 obteve os maiores teores 2,75 mg de daidzeína 100 g<sup>-1</sup> de amostra liofilizada e desengordurada e de 36,34 mg de genisteína 100 g<sup>-1</sup> de amostra liofilizada e desengordurada.

De acordo com os parâmetros de regressão e análise de variância (ANOVA), a variável X<sub>1</sub> (tempo de hidratação dos grãos de soja, h) apresentou efeito linear

negativo e significativo  $\beta_0 = - 2,1134$  a 5 % de significância sobre a função resposta  $Y_1 = \text{mg}$  de genistina  $100 \text{ g}^{-1}$  de amostra liofilizada e desengordurada enquanto que os demais efeitos não foram significativos. Considerando apenas o efeito da variável significativa  $X_1$ , o modelo matemático pode ser descrito como  $Y_1 = 10,1879 - 2,1134 x_1$ . A falta de ajuste do modelo não foi significativa (ao nível de 95%) e 76 % ( $R^2$ ) dos dados experimentais foram adequadamente ajustados ao modelo proposto.

Quando analisado os parâmetros de regressão e análise de variância (ANOVA) sobre a função resposta  $Y_2$  (mg de malonil-daidzina  $100\text{g}^{-1}$  de amostra liofilizada e desengordurada) foi observado que a variável  $X_2$  (tempo de cozimento, min) e a variável  $X_3$  (tempo de fermentação, h) apresentaram efeito linear e negativo significativos,  $\beta_0 = - 9,3451$  e  $\beta_0 = - 2,0020$  respectivamente e a interação das variáveis  $X_1$  (tempo de hidratação, h) e  $X_2$  apresentou efeito linear positivo e significativo  $\beta_0 = 3,3149$  a 5 % de significância. Os demais efeitos não foram significativos. Considerando o efeito das variáveis significativas  $X_2$ ,  $X_3$  e a interação das variáveis  $X_1$  e  $X_2$ , o modelo matemático pode ser descrito como  $Y_2 = 15,5125 - 9,3451 x_2 - 2,0020 x_3 + 3,3149 x_1 x_2$ . A falta de ajuste do modelo não foi significativa (ao nível de 95%) e 96 % ( $R^2$ ) dos dados experimentais foram adequadamente ajustados ao modelo proposto.

Para a função resposta  $Y_3 = \text{mg}$  de malonil-genistina  $100 \text{ g}^{-1}$  de amostra liofilizada e desengordurada foi verificado que a variável  $X_1$  (tempo de hidratação, h) apresentou efeito linear negativo e significativo  $\beta_0 = - 5,6641$ , a variável  $X_2$  (tempo de cozimento, min) apresentou efeito linear negativo e significativo  $\beta_0 = - 23,6220$ , a variável  $X_3$  (tempo de fermentação, h) apresentou efeito linear positivo e significativo  $\beta_0 = 4,8394$  e a interação das variáveis  $X_1$  e  $X_2$  apresentou efeito linear positivo e significativo  $\beta_0 = 6,8396$  a 5 % de significância. Os demais efeitos também não foram significativos. Considerando o efeito das variáveis significativas  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$  e a interação das variáveis  $X_1$  e  $X_2$ , o modelo matemático pode ser descrito como  $Y_3 = 57,7868 - 5,6641 x_1 - 23,6220 x_2 - 4,8394 x_3 + 6,8396 x_1 x_2$ . A falta de ajuste do modelo não foi significativa (ao nível de 95%) e 98 % ( $R^2$ ) dos dados experimentais foram adequadamente ajustados ao modelo proposto.

Para a função resposta  $Y_4 = \text{mg}$  de daidzeína  $100 \text{ g}^{-1}$  de amostra liofilizada e desengordurada), a variável  $X_2$  (tempo de cozimento, min) apresentou efeito linear negativo e significativo  $\beta_0 = - 0,2090$ , a interação das variáveis  $X_1$  (tempo de hidratação, h) e  $X_2$  apresentou efeito linear positivo e significativo ( $\beta_0 = 0,3321$ ), a interação das variáveis  $X_1$  e  $X_3$  (tempo de fermentação, h) apresentou efeito linear negativo e significativo  $\beta_0 = - 0,2313$  e a interação das variáveis  $X_2$  e  $X_3$  apresentou efeito linear negativo e significativo  $\beta_0 = - 0,1950$

a 5 % de significância e os demais efeitos não foram significativos. Considerando o efeito das variáveis significativas  $X_2$  e a interação das variáveis  $X_1$  e  $X_2$ ,  $X_1$  e  $X_3$ ,  $X_2$  e  $X_3$ , o modelo matemático pode ser descrito como  $Y_4 = 2,01138 - 0,209064 x_2 + 0,3321 x_1x_2 - 0,2313 x_1x_3 - 0,1950 x_2x_3$ . A falta de ajuste do modelo não foi significativa (ao nível de 95%) e 87 % ( $R^2$ ) dos dados experimentais foram adequadamente ajustados ao modelo proposto.

Para a função resposta  $Y_5 = \text{mg de genisteína } 100\text{g}^{-1}$  de amostra liofilizada e desengordurada), foi verificado que a variável  $X_3$  (tempo de fermentação, h) apresentou efeito linear negativo e significativo  $\beta_0 = - 4,44890$  a 5 % de significância e que os demais efeitos não foram significativos. Considerando o efeito da variável significativa  $X_3$ , o modelo matemático pode ser descrito como  $Y_5 = 28,8533 - 4,44890 x_3$ . A falta de ajuste do modelo não foi significativa (ao nível de 95%) e 85 % ( $R^2$ ) dos dados experimentais foram adequadamente ajustados ao modelo proposto.

A partir da análise de regressão e variância (ANOVA), dos gráficos de superfície de resposta (Figuras 4 a 8) e dos parâmetros de desejabilidade (Figuras 9 a 13) observou-se que para a obtenção de um tempeh de soja otimizado, ou seja, com o máximo teor de isoflavonas glicosídicas  $Y_1 = 16,98 \text{ mg de genistina } 100 \text{ g}^{-1}$  de amostra liofilizada e desengordurada, ocorreu quando  $x_1 = -1$ ,  $x_2 = 0,5$  e  $x_3 = -1$ ; malonil-glicosídicas  $Y_2 = 28,16 \text{ mg de malonil-daidzina } 100 \text{ g}^{-1}$  de amostra liofilizada e desengordurada e  $Y_3 = 103,99 \text{ mg de malonil-genistina } 100 \text{ g}^{-1}$  de amostra liofilizada e desengordurada ocorreu quando  $x_1 = -1$ ,  $x_2 = -1$  e  $x_3 = -1$  e quando  $x_1 = -1$ ,  $x_2 = -1$  e  $x_3 = -1$ , respectivamente; agliconas  $Y_4 = 2,68 \text{ mg de daidzeína } 100 \text{ g}^{-1}$  de amostra liofilizada e desengordurada e  $Y_5 = 35,04 \text{ mg de genisteína } 100 \text{ g}^{-1}$  de amostra liofilizada e desengordurada ocorreu quando  $x_1 = -1$ ,  $x_2 = -1$  e  $x_3 = 0,5$  e quando  $x_1 = 1$ ,  $x_2 = 0$  e  $x_3 = -1$ , respectivamente. Destaca-se que no grão de soja não foi detectado o teor da aglicona daidzeína. Entretanto, para obtenção de tempeh com máximo teor da isoflavona aglicona genisteína o modelo previsto foi  $Y_5 = 28,8533 - 4,44890 x_3$  e a condição de desejabilidade foi  $\hat{Y}_5 = 28,853$ , ou seja, entre 28,128 e 36,347 mg de genisteína  $100 \text{ g}^{-1}$  de amostra liofilizada e desengordurada e os valores estimados  $\hat{Y}_5 = 33,30 \text{ mg de genisteína } 100 \text{ g}^{-1}$  de amostra liofilizada e desengordurada e obtidos  $Y_5 = 36,34 \text{ mg de genisteína } 100 \text{ g}^{-1}$  de amostra liofilizada e desengordurada estão dentro do intervalo da desejabilidade. Assim sendo, a melhor condição para obter um tempeh com maior teor de agliconas será utilizar a condição de  $x_1 = 18 \text{ h de hidratação}$ ,  $x_2 = 45 \text{ min de cozimento}$  e  $x_3 = 18 \text{ h de fermentação}$  que coincide com o tempo mínimo para que ocorra uma completa fermentação. Considerando que o grão de soja utilizado apresentou 8,80 mg de genisteína  $100 \text{ g}^{-1}$  de amostra desengordurada, pode-se verificar que o tempeh obtido neste processo

apresentou um aumento de 4,2 vezes cujo aumento foi devido principalmente a etapa de fermentação dos grãos de soja pelo fungo *Rhizopus oligosporus*. Este produto pode ser recomendado para ser utilizado como um alimento rico em isoflavonas agliconas.

#### 6.1.5 Conclusões

A cultivar de soja BRS 267 apresentou os seguintes teores de isoflavonas glicosídicas: 48,33 mg de genistina 100 g<sup>-1</sup> de amostra desengordurada, 14,84 mg de daidzina 100 g<sup>-1</sup> de amostra desengordurada, 157,67 mg de malonil-genistina 100 g<sup>-1</sup> de amostra desengordurada e 60,59 mg de malonil-daidzina 100 g<sup>-1</sup> de amostra desengordurada, as formas acetil-glicosídicas não foram detectadas e as agliconas apresentaram teor de 8,80 mg de genisteína 100 g<sup>-1</sup> de amostra desengordurada.

A forma aglicona daidzeína não foi detectada nos grãos de soja e após o processo de obtenção do tempeh utilizando 18 h de hidratação, 45 min de cozimento e 18 h de fermentação, o teor aumentou para 2,75 mg de daidzeína 100 g<sup>-1</sup> de amostra desengordurada.

A forma aglicona genisteína apresentou nos grãos de soja o teor de 8,80 mg de genisteína 100 g<sup>-1</sup> de amostra desengordurada e após o processo de obtenção do tempeh utilizando 18 h de hidratação, 45 min de cozimento e 18 h de fermentação, o teor deste constituinte foi de 36,34 mg de genisteína 100 g<sup>-1</sup> de amostra desengordurada, indicando um aumento de 4,2 vezes em relação ao teor inicial nos grãos de soja.

#### 6.1.6 Referências

BAVIA, A.C.F.; SILVA, C.E.da; FERREIRA, M.P.; LEITE, R.S.; MANDARINO, J.M.G.; CARRÃO-PANIZZI, M.C. Chemical composition of tempeh from soybean cultivars specially developed for human consumption. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 32(3): 613-620. jul.-set. 2012.

FERREIRA, M.P.; OLIVEIRA N. M.C.; MANDARINO, J.M.; SILVA J.B.; IDA I.E.; HACHMEISTER, K. A.; FUNG, Y. C. D. Tempeh: a mold-modified indigenous fermented food made from soybeans and/or cereal grains. **Critical Reviews in Microbiology**, 19 (3): 137-188. 1993.

KARYADI, D. The development of tempeh across five continents. In: AGRANOFF, J. (ed). **The complete handbook of tempeh: the unique fermented soy food of Indonesia**. 2<sup>nd</sup> ed. Singapore: American Soybean Association, Liat Towers, p. 21-25.2001.

KUDOU, S.; FLEURY, Y.; WELTI, D.; MAGNOLATO, D.; UCHIDA, T.; KITAMURA, K.; OKUBO, K. Malonyl isoflavone glycosides in soybeans seeds (*Glycine max* Merrill). **Agriculture and Biological Chemistry**, v. 55, n. 9, p. 2227-2233, 1991.

LEE, H.P.; GOURLEY, L.; DUFFY, S.W.; LEE, J.E.; DAY, N.E. Dietary effects on breast-cancer risk in Singapore. **Lancet**.v.337, p.1197 – 1200, 1991.

LIU, KeShun. **Soybeans: Chemistry, Technology and Utilization**. New York: Chapman & Hall, 1997. 532p.

MESSINA M.J.; HUGHES C. Efficacy of soyfoods and soybean isoflavone supplement for alleviating menopausal symptoms is positively related to initial hot flash frequency. **J. Med. Food**, 6:1-11. 2003.

NAKAJIMA, N. et al. Analysis of Isoflavone Content in Tempeh, a Fermented Soybean, and Preparation of a New Isoflavone-Enriched Tempeh. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 100, no. 6, p. 685–687, 2005.

NOUT, M. J. R.; KIERS, J. L. Tempeh as a functional food. In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 7.; INTERNATIONAL SOYBEAN PROCESSING AND UTILIZATION CONFERENCE, 4.; CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 3., 2004, Foz do Iguaçu. **Abstracts of contributed papers and posters...** Londrina: Embrapa Soybean, 2004. p. 708-713. (Embrapa Soja. Documentos, n. 228). Editado por Flávio Moscardi, Clara Beatriz Hoffmann-Campo, Odilon Ferreira Saraiva, Paulo Roberto Galerani, Francisco Carlos Krzyzanowski, Mercedes Concordia Carrão-Panizzi.

SETCHELL, K. D. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. **Am J Clin Nutr**.vol. 68, no. 6, p.1333S-1346S, December 1998.

SHARMA, R.; SARBHOY, A.K. Tempeh-a fermented food from soybean.**Current Science** 53, p. 325-326.1984.

STEINKRAUS, K.H. Indonesian tempeh and relates fermentation. In: STEINKRAUS, K.H. (ed.). **Handbook of indigenous fermented foods**. New York: Marcel Dekker, p.1 – 94, 1983.

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

WEI, L.S. Domestic soybean consumption in Asia. In: SOYBEAN PROCESSING FOR FOOD USES, Illinois, 1991. **Anais of Illinois: International soybean program**, 1991. p.162 – 183.

YOSHIARA, L. Y., MADEIRA, T. B., DELAROZA, F., SILVA, J. B., IDA, E. I. Optimization of soy isoflavone extraction with different solvents using the simplex-centroid mixture design. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, 9, p.978-986.2012.

**Tabela 1** – Níveis reais e codificados das variáveis independentes utilizadas no DCC ( $2^3$ )

Fatores	Níveis		
	-1	0	+1
X <sub>1</sub> : tempo de hidratação (h)	6	12	18
X <sub>2</sub> : tempo de cozimento (min)	15	30	45
X <sub>3</sub> : tempo de fermentação (h)	18	24	30

**Tabela 2** – Matriz do delineamento composto central (DCC)  $2^3$  para elaboração de tempes utilizando cultivar de soja BRS 267

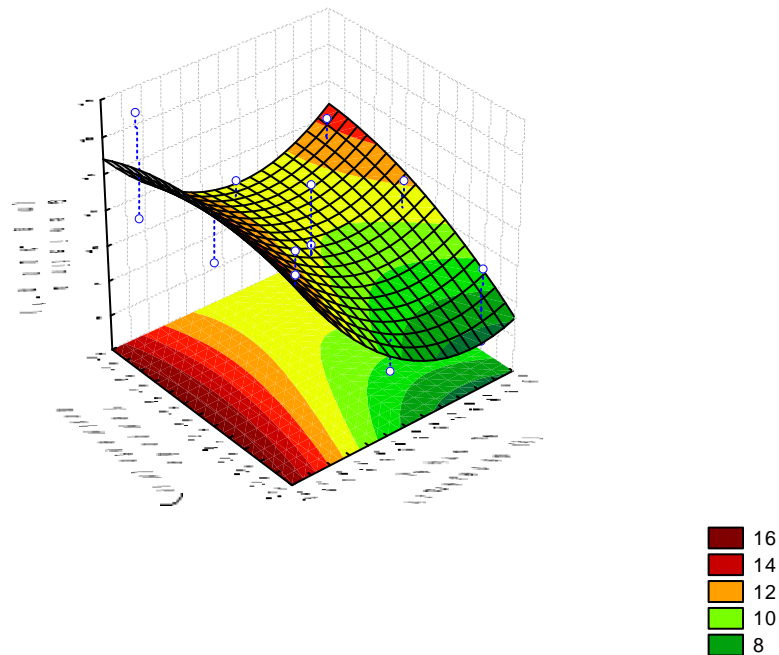
Ensaio	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>
	Tempo de hidratação (h)	Tempo de cozimento (min)	Tempo de fermentação (h)
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	+1
3	-1	+1	-1
4	-1	+1	+1
5	+1	-1	-1
6	+1	-1	+1
7	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1
9	-1	0	0
10	+1	0	0
11	0	-1	0
12	0	+1	0
13	0	0	-1
14	0	0	+1
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0

**Tabela 3** – Funções respostas das diferentes formas de isoflavonas dos tempes elaborados com cultivar de soja BRS 267

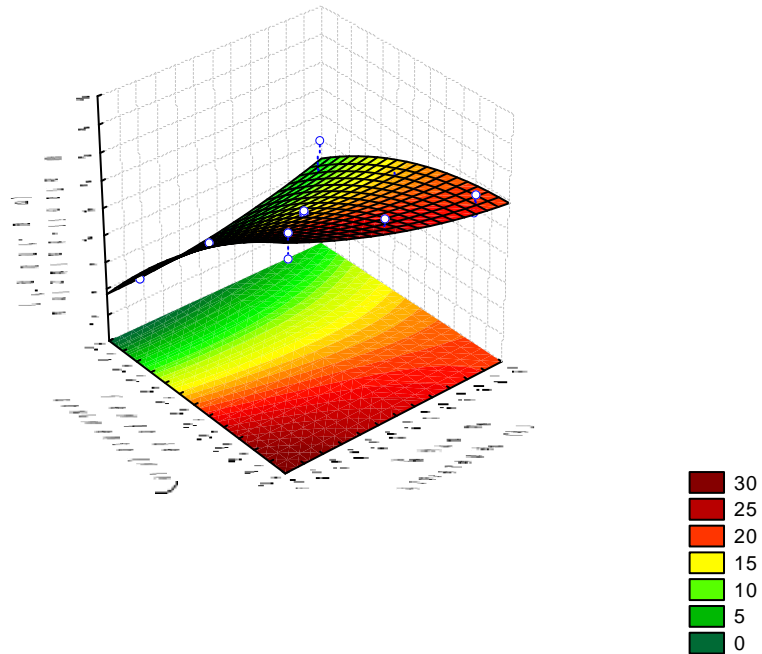
Ensaio	$x_1$	$x_2$	$x_3$	$Y_1$	$\hat{Y}_1$	$Y_2$	$\hat{Y}_2$	$Y_3$	$\hat{Y}_3$	$Y_4$	$\hat{Y}_4$	$Y_5$	$\hat{Y}_5$
1	-1	-1	-1	15,61	12,30	29,25	30,17	104,5	98,75	2,07	2,13	30,76	33,30
2	-1	-1	+1	14,38	12,30	24,69	26,17	89,22	89,07	2,41	2,98	25,08	24,40
3	-1	+1	-1	17,41	12,30	2,37	4,85	40,86	37,83	1,15	1,43	23,81	33,30
4	-1	+1	+1	11,58	12,30	2,36	0,85	34,79	28,15	1,37	1,51	19,96	24,40
5	+1	-1	-1	5,62	8,07	20,86	23,54	77,06	73,74	1,68	1,92	29,88	33,30
6	+1	-1	+1	9,78	8,07	17,57	19,54	65,60	64,07	1,76	1,85	21,75	24,40
7	+1	+1	-1	9,78	8,07	13,37	11,48	44,31	40,18	2,75	2,56	36,34	33,30
8	+1	+1	+1	12,74	8,07	2,36	7,48	34,92	30,50	1,39	1,71	19,90	24,40
9	-1	0	0	12,06	12,30	18,13	15,51	66,04	63,45	2,18	2,01	30,22	28,85
10	+1	0	0	11,98	8,07	14,89	15,51	56,95	52,12	2,17	2,01	30,29	28,85
11	0	-1	0	6,51	10,19	23,93	24,86	89,63	81,41	2,31	2,22	32,47	28,85
12	0	+1	0	11,49	10,19	2,38	6,17	34,99	34,16	1,47	1,80	20,77	28,85
13	0	0	-1	10,65	10,19	15,52	17,51	57,66	62,63	1,88	2,01	31,22	33,30
14	0	0	+1	9,38	10,19	14,38	13,51	51,54	52,95	1,48	2,01	20,82	24,40
15	0	0	0	9,05	10,19	16,14	15,51	58,34	57,79	2,01	2,01	30,13	28,85
16	0	0	0	13,99	10,19	14,51	15,51	53,47	57,79	1,99	2,01	27,40	28,85
17	0	0	0	9,29	10,19	16,49	15,51	59,78	57,79	2,13	2,01	29,91	28,85

$x_1$  = h de hidratação,  $x_2$  = min de cozimento,  $x_3$  = h de fermentação,  $Y$  = teor de isoflavonas obtidos,  $\hat{Y}$  = teor de isoflavonas estimados, sendo  $Y_1$ = genistina,  $Y_2$ = malonil-daidzina,  $Y_3$  = malonil-genistina,  $Y_4$ = daidzeína e  $Y_5$  = genisteína (mg 100 g<sup>-1</sup> de amostra desengordurada)

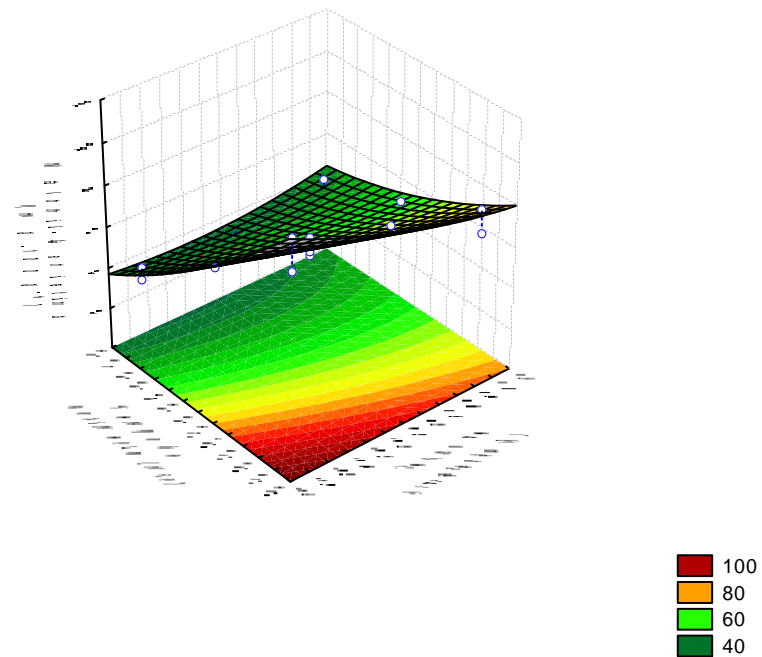
**Figura 4** – Modelo da superfície de resposta para o teor de genistina (mg de genistina 100 g<sup>-1</sup> de amostra liofilizada e desengordurada) como função de  $X_1$  (tempo de cozimento, min) e  $X_2$  (tempo de hidratação, h)



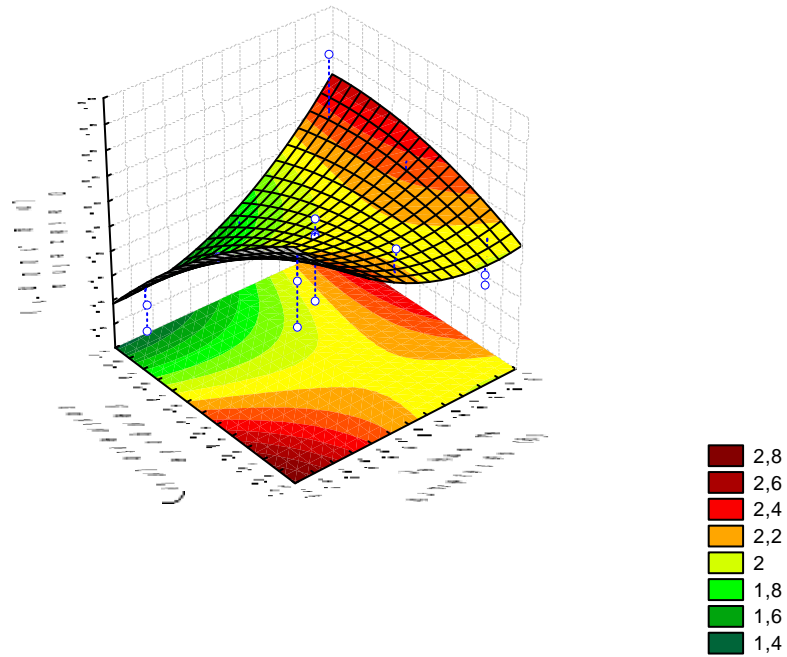
**Figura 5** – Modelo da superfície de resposta para o teor de malonil-daidzina (mg de malonil-daidzina  $100\text{ g}^{-1}$  de amostra liofilizada e desengordurada) como função de  $X_1$  (tempo de cozimento, min) e  $X_2$  (tempo de hidratação, h)



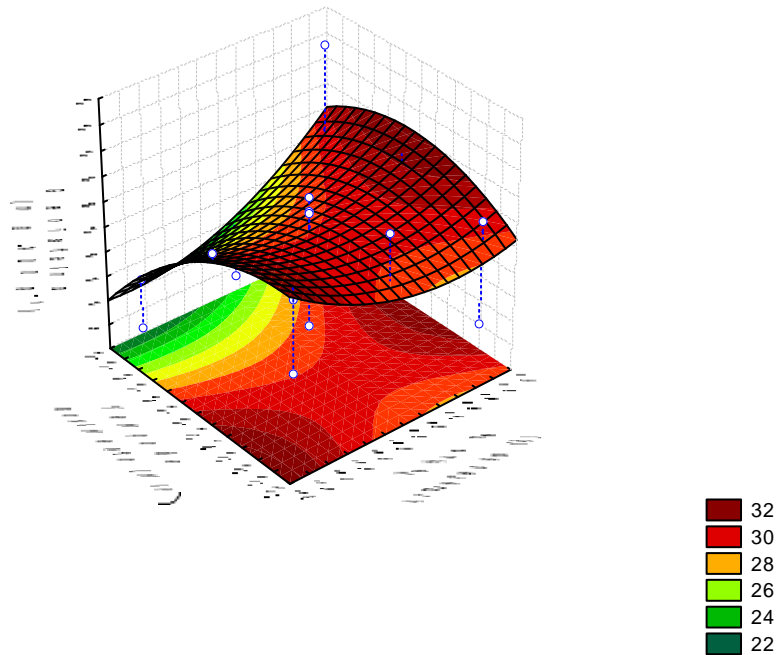
**Figura 6** – Modelo da superfície de resposta para o teor de malonil-genistina (mg de malonil-genistina  $100\text{ g}^{-1}$  de amostra liofilizada e desengordurada) como função de  $X_1$  (tempo de cozimento, min) e  $X_2$  (tempo de hidratação, h)



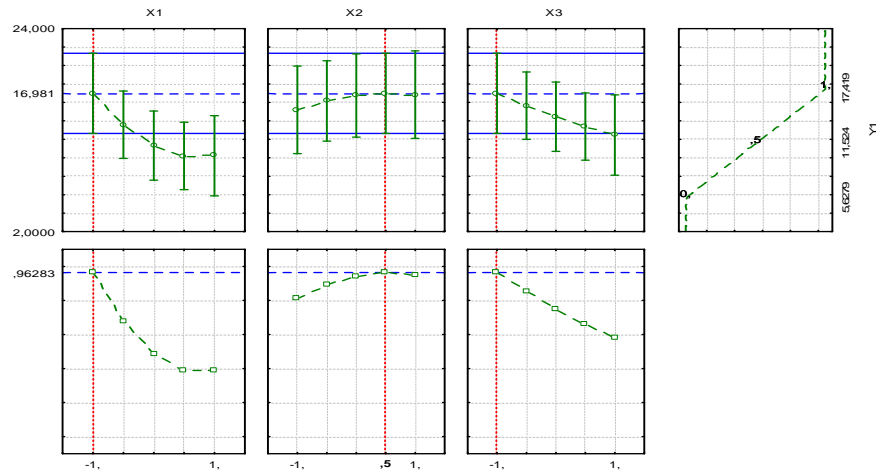
**Figura 7** – Modelo da superfície de resposta para o teor de daidzeína (mg de daidzeína  $100\text{ g}^{-1}$  de amostra liofilizada e desengordurada) como função de  $X_1$  (tempo de cozimento, min) e  $X_2$  (tempo de hidratação, h)



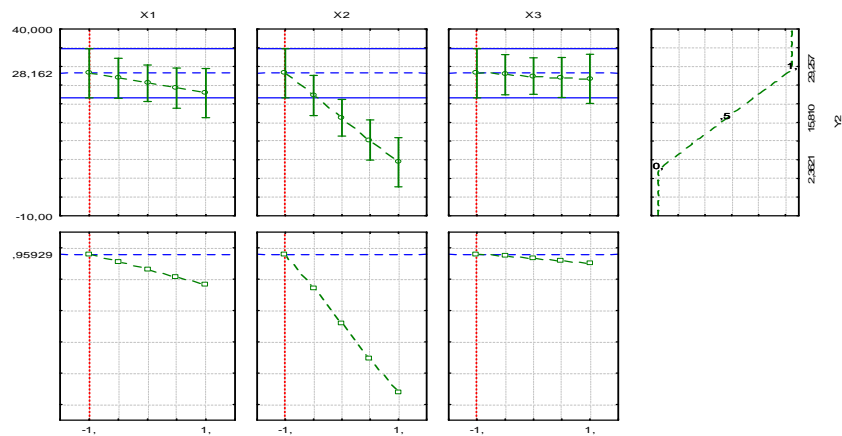
**Figura 8** – Modelo da superfície de resposta para o teor de genisteína (mg de genisteína  $100\text{ g}^{-1}$  de amostra liofilizada e desengordurada) como função de  $X_1$  (tempo de cozimento, min) e  $X_2$  (tempo de hidratação, h)



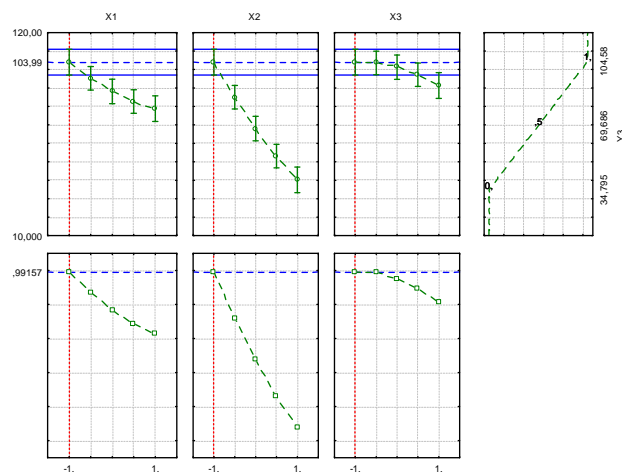
**Figura 9** – Parâmetros de desejabilidade para a função resposta  $Y_1$  (mg de genistina  $100\text{ g}^{-1}$  de amostra liofilizada e desengordurada)



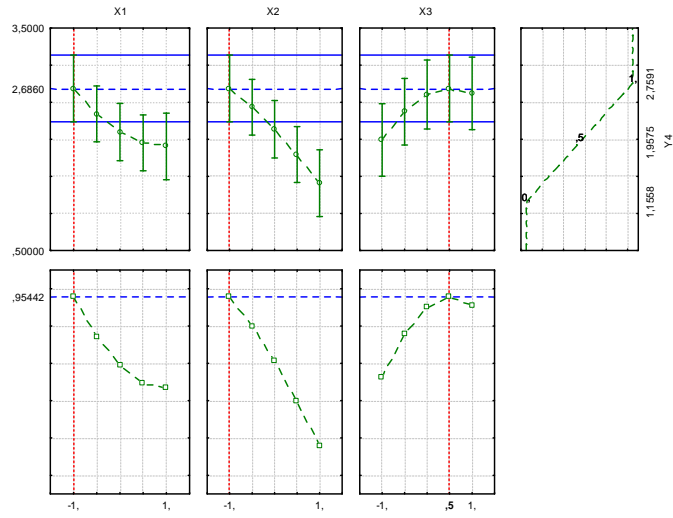
**Figura 10** – Parâmetros de desejabilidade para a função resposta  $Y_2$  (mg malonil-daidzina  $100\text{ g}^{-1}$  de amostra liofilizada e desengordurada)



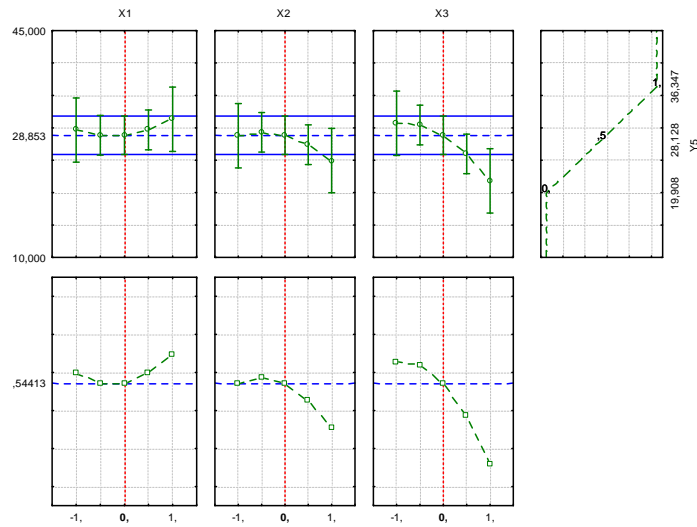
**Figura 11** – Parâmetros de desejabilidade para a função resposta  $Y_3$  (mg de malonil-genistina  $100\text{ g}^{-1}$  de amostra liofilizada e desengordurada)



**Figura 12** – Parâmetros de desejabilidade para a função resposta  $Y_4$  (mg de daidzeína  $100\text{ g}^{-1}$  de amostra liofilizada e desengordurada)



**Figura 13** – Parâmetros de desejabilidade para a função resposta  $Y_5$  (mg de genisteína  $100\text{ g}^{-1}$  de amostra liofilizada e desengordurada)



## CONCLUSÕES

A cultivar de soja BRS 267 apresentou os seguintes teores de isoflavonas glicosídicas: 48,33 mg de genistina  $100\text{ g}^{-1}$  de amostra desengordurada, 14,84 mg de daidzina  $100\text{ g}^{-1}$  de amostra desengordurada, 157,67 mg de malonil-genistina  $100\text{ g}^{-1}$  de e 60,59 mg de malonil-daidzina  $100\text{ g}^{-1}$  de amostra desengordurada, as formas acetil-glicosídicas não foram detectadas e as agliconas apresentaram teor de 8,80 mg de genisteína  $100\text{ g}^{-1}$  de amostra desengordurada.

A forma aglicona daidzeína não foi detectada nos grãos de soja e após o processo de obtenção do tempeh utilizando 18 h de hidratação, 45 min de cozimento e 18 h de fermentação, o teor aumentou para 2,75 mg de daidzeína  $100\text{ g}^{-1}$  de amostra desengordurada.

A forma aglicona genisteína apresentou nos grãos de soja o teor de 8,80 mg de genisteína  $100\text{ g}^{-1}$  de amostra desengordurada e após o processo de obtenção do tempeh utilizando 18 h de hidratação, 45 min de cozimento e 18 h de fermentação, o teor deste constituinte foi de 36,34 mg de genisteína  $100\text{ g}^{-1}$  de amostra desengordurada, indicando um aumento de 4,2 vezes em relação ao teor inicial nos grãos de soja.

**ANEXOS**

### Anexo 1

Análise de regressão das variáveis sobre a função resposta  $Y_1$  (mg de genistina 100 g<sup>-1</sup> de amostra desengordurada)

Fonte de variação	Coefficiente de regressão	Erro padrão	T	P
<b>Média</b>	10,18795	0,962869	10,58083	0,000015
$x_1$ <b>Hidratação (L)</b>	-2,11342	0,711582	-2,97004	0,020807
$x_1$ <b>Hidratação (Q)</b>	2,28273	1,374734	1,66049	0,140774
$x_2$ <b>Cozimento (L)</b>	1,11141	0,711582	1,56189	0,162284
$x_2$ <b>Cozimento (Q)</b>	-0,73928	1,374734	-0,53776	0,607405
$x_3$ <b>Fermentação (L)</b>	-0,12152	0,711582	-0,17077	0,869234
$x_3$ <b>Fermentação(Q)</b>	0,27635	1,374734	0,20102	0,846401
$x_1$ e $x_2$ (L)	1,01364	0,795573	1,27411	0,243293
$x_1$ e $x_3$ (L)	1,77257	0,795573	2,22805	0,061147
$x_2$ e $x_3$ (L)	-0,72460	0,795573	-0,91079	0,392689

( $p \leq 0,05$ )

### Anexo 2

ANOVA para predição da função resposta  $Y_1$  (mg de genistina 100 g<sup>-1</sup> de amostra desengordurada)

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F	P
$x_1$ <b>Hidratação (L)</b>	44,6656	1	44,66559	8,821115	0,020807
$x_1$ <b>Hidratação (Q)</b>	13,9612	1	13,96117	2,757225	0,140774
$x_2$ <b>Cozimento (L)</b>	12,3524	1	12,35240	2,439506	0,162284
$x_2$ <b>Cozimento (Q)</b>	1,4643	1	1,46431	0,289190	0,607405
$x_3$ <b>Fermentação (L)</b>	0,1477	1	0,14767	0,029163	0,869234
$x_3$ <b>Fermentação (Q)</b>	0,2046	1	0,20461	0,040408	0,846401
$x_1$ e $x_2$	8,2198	1	8,21978	1,623344	0,243293
$x_1$ e $x_3$	25,1361	1	25,13610	4,964189	0,061147
$x_2$ e $x_3$	4,2003	1	4,20035	0,829537	0,392689
<b>Falta de ajuste</b>	19,9387	5	3,98775	0,514360	0,762658
<b>Erro puro</b>	15,5057	2	7,75283		
<b>Total</b>	148,8467	16			

Observação: % de variação explicada ( $R^2$ ) = 0,7618

### Anexo 3

Análise de regressão das variáveis sobre a função resposta  $Y_2$  (mg de malonil-daidzina 100 g<sup>-1</sup> de amostra desengordurada)

Fonte de variação	Coefficiente de regressão	Erro padrão	T	P
<b>Média</b>	15,5125	0,9339	16,6091	0,000001
$x_1$ <b>Hidratação (L)</b>	-0,7743	0,6902	-1,1219	0,2989
$x_1$ <b>Hidratação (Q)</b>	1,1583	1,3334	0,8687	0,4138
$x_2$ <b>Cozimento (L)</b>	-9,3451	0,6902	-13,5392	0,000003
$x_2$ <b>Cozimento (Q)</b>	-2,1975	1,3334	- 1,6480	0,1433
$x_3$ <b>Fermentação (L)</b>	-2,0020	0,6902	-2,9005	0,02296
$x_3$ <b>Fermentação(Q)</b>	-0,4029	1,3334	-0,3022	0,7712
$x_1$ e $x_2$ (L)	3,3149	0,7717	4,2957	0,00358
$x_1$ e $x_3$ (L)	-1,2158	0,7717	-1,5755	0,1591
$x_2$ e $x_3$ (L)	-0,3952	0,7717	-0,5122	0,6243

( $p \leq 0,05$ )

### Anexo 4

ANOVA para predição da função resposta  $Y_2$  (mg de malonil-daidzina 100 g<sup>-1</sup> de amostra desengordurada)

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F	P
$x_1$ <b>Hidratação (L)</b>	5,996	1	5,9960	1,2586	0,298927
$x_1$ <b>Hidratação (Q)</b>	3,595	1	3,5951	0,7546	0,413807
$x_2$ <b>Cozimento (L)</b>	873,314	1	873,314	183,3088	0,000003
$x_2$ <b>Cozimento (Q)</b>	12,938	1	12,9384	2,7158	0,143352
$x_3$ <b>Fermentação (L)</b>	40,081	1	40,0806	8,4129	0,022969
$x_3$ <b>Fermentação (Q)</b>	0,435	1	0,4350	0,0913	0,771292
$x_1$ e $x_2$	87,913	1	87,9133	18,4530	0,003586
$x_1$ e $x_3$	11,826	1	11,8255	2,4822	0,159146
$x_2$ e $x_3$	1,250	1	1,2496	0,2623	0,624304
<b>Falta de ajuste</b>	31,112	5	6,2225	5,5639	0,1593
<b>Erro puro</b>	2,237	2	1,1184		
<b>Total</b>	1070,799	16			

Observação: % de variação explicada ( $R^2$ ) = 0,96886

### Anexo 5

Análise de regressão das variáveis sobre a função resposta  $Y_3$  (mg de malonil-genistina 100 g<sup>-1</sup> de amostra desengordurada)

Fonte de variação	Coefficiente de regressão	Erro padrão	T	P
<b>Média</b>	57,7868	1,4092	41,0058	0,000000
$x_1$ <b>Hidratação (L)</b>	-5,6641	1,0414	-5,4386	0,000968
$x_1$ <b>Hidratação (Q)</b>	3,2749	2,0120	1,6277	0,147621
$x_2$ <b>Cozimento (L)</b>	-23,6220	1,0414	-22,681	0,000000
$x_2$ <b>Cozimento (Q)</b>	4,0898	2,0120	2,0327	0,08159
$x_3$ <b>Fermentação (L)</b>	-4,8394	1,0414	-4,6467	0,002351
$x_3$ <b>Fermentação(Q)</b>	-3,6190	2,0120	-1,7987	0,115103
$x_1$ e $x_2$ (L)	6,8396	1,1643	5,8740	0,000615
$x_1$ e $x_3$ (L)	0,0710	1,1643	0,0610	0,95309
$x_2$ e $x_3$ (L)	1,4199	1,1643	1,2194	0,26217

( $p \leq 0,05$ )

### Anexo 6

ANOVA para predição da função resposta  $Y_3$  (mg de malonil-genistina 100 g<sup>-1</sup> de amostra desengordurada)

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F	P
$x_1$ <b>Hidratação (L)</b>	320,820	1	320,820	29,5787	0,000968
$x_1$ <b>Hidratação (Q)</b>	28,735	1	28,735	2,6493	0,147621
$x_2$ <b>Cozimento (L)</b>	5579,980	1	5579,980	514,4582	0,000000
$x_2$ <b>Cozimento (Q)</b>	44,814	1	44,814	4,1317	0,081591
$x_3$ <b>Fermentação (L)</b>	234,196	1	234,196	21,5922	0,002351
$x_3$ <b>Fermentação (Q)</b>	35,091	1	35,091	3,2353	0,115103
$x_1$ e $x_2$	374,245	1	374,245	34,5043	0,000615
$x_1$ e $x_3$	0,040	1	0,040	0,0037	0,953097
$x_2$ e $x_3$	16,128	1	16,128	1,4870	0,262178
<b>Falta de ajuste</b>	54,024	5	10,805		
<b>Erro puro</b>	21,900	2	10,950		
<b>Total</b>	6712,142	16			

Observação: % de variação explicada ( $R^2$ ) = 0,9886

### Anexo 7

Análise de regressão das variáveis sobre a função resposta  $Y_4$  (mg de daidzeína 100 g<sup>-1</sup> de amostra desengordurada)

Fonte de variação	Coefficiente de regressão	Erro padrão	t	P
<b>Média</b>	2,011388	0,099327	20,25021	0,000000
$x_1$ <b>Hidratação (L)</b>	0,057073	0,073405	0,77752	0,462317
$x_1$ <b>Hidratação (Q)</b>	0,196775	0,141814	1,38756	0,207837
$x_2$ <b>Cozimento (L)</b>	-0,209064	0,073405	-2,84810	0,024756
$x_2$ <b>Cozimento (Q)</b>	-0,088695	0,141814	-0,62544	0,551522
$x_3$ <b>Fermentação (L)</b>	-0,112463	0,073405	-1,53209	0,169361
$x_3$ <b>Fermentação(Q)</b>	-0,298375	0,141814	-2,10399	0,073437
$x_1$ e $x_2$ (L)	0,332160	0,082069	4,04733	0,004887
$x_1$ e $x_3$ (L)	-0,231390	0,082069	-2,81946	0,025793
$x_2$ e $x_3$ (L)	-0,195019	0,082069	-2,37628	0,049150

( $p \leq 0,05$ )

### Anexo 8

ANOVA para predição da função resposta  $Y_4$  (mg de daidzeína 100 g<sup>-1</sup> de amostra desengordurada)

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F	P
$x_1$ <b>Hidratação (L)</b>	0,032574	1	0,032574	0,60453	0,462317
$x_1$ <b>Hidratação (Q)</b>	0,103741	1	0,103741	1,92532	0,207837
$x_2$ <b>Cozimento (L)</b>	0,437079	1	0,437079	8,11170	0,024756
$x_2$ <b>Cozimento (Q)</b>	0,021077	1	0,021077	0,39117	0,551522
$x_3$ <b>Fermentação (L)</b>	0,126479	1	0,126479	2,34731	0,169361
$x$ <b>Fermentação (Q)</b>	0,238526	1	0,238526	4,42678	0,073437
$x_1$ e $x_2$	0,882641	1	0,882641	16,38085	0,004887
$x_1$ e $x_3$	0,428331	1	0,428331	7,94935	0,025793
$x_2$ e $x_3$	0,304258	1	0,304258	5,64669	0,049150
<b>Falta de ajuste</b>	0,365717	5	0,073143	12,7641	0,074242
<b>Erro puro</b>	0,011461	2	0,005730		
<b>Total</b>	2,936452	16			

Observação: % de variação explicada ( $R^2$ ) = 0,8715

### Anexo 9

Análise de regressão das variáveis sobre a função resposta  $Y_5$  (mg de genisteína 100 g<sup>-1</sup> de amostra desengordurada)

Fonte de variação	Coefficiente de regressão	Erro padrão	T	P
<b>Média</b>	28,8533	1,2501	23,07986	0,00000
$x_1$ <b>Hidratação (L)</b>	0,83272	0,923890	0,90132	0,397369
$x_1$ <b>Hidratação (Q)</b>	1,63433	1,784900	0,91564	0,390307
$x_2$ <b>Cozimento (L)</b>	-1,91545	0,923890	-2,07324	0,076848
$x_2$ <b>Cozimento (Q)</b>	-1,99989	1,784900	-1,12045	0,299486
$x_3$ <b>Fermentação (L)</b>	-4,44890	0,923890	-4,81541	0,001932
$x_3$ <b>Fermentação(Q)</b>	-2,60232	1,784900	-1,45797	0,188206
$x_1$ e $x_2$ (L)	2,08574	1,032940	<b>2,01923</b>	0,083225
$x_1$ e $x_3$ (L)	-1,87944	1,032940	-1,81951	0,111649
$x_2$ e $x_3$ (L)	-0,80994	1,032940	-0,78411	0,458684

( $p \leq 0,05$ )

### Anexo 10

ANOVA para predição da função resposta  $Y_5$  (mg de genisteína 100 g<sup>-1</sup> de amostra desengordurada)

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F	P
$x_1$ <b>Hidratação (L)</b>	6,9342	1	6,9342	0,81238	0,397369
$x_1$ <b>Hidratação (Q)</b>	7,1564	1	7,1564	0,83840	0,390307
$x_2$ <b>Cozimento (L)</b>	36,6894	1	36,6894	4,29833	0,076848
$x_2$ <b>Cozimento (Q)</b>	10,7158	1	10,7158	1,25541	0,299486
$x_3$ <b>Fermentação (L)</b>	197,9275	1	197,9275	23,1881	0,001932
$x_3$ <b>Fermentação (Q)</b>	18,1441	1	18,1441	2,12567	0,188206
$x_1$ e $x_2$	34,8025	1	34,8025	4,07728	0,083225
$x_1$ e $x_3$	28,2585	1	28,2585	3,31061	0,111649
$x_2$ e $x_3$	5,2480	1	5,2480	0,61483	0,458684
<b>Falta de ajuste</b>	55,1575	5	11,0315	4,80408	0,181223
<b>Erro puro</b>	4,5926	2	2,2963		
<b>Total</b>	415,1484	16			

Observação: % de variação explicada ( $R^2$ ) = 0,8560