



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

GRICIELLE APARECIDA SUTIL

**TRATAMENTO HIDROTÉRMICO E AÇÃO DA ENZIMA
 β -GLICOSIDASE NA FORMAÇÃO
DE AGLICONAS EM SOJA**

FLORIANÓPOLIS
2006

GRICIELLE APARECIDA SUTIL

**TRATAMENTO HIDROTÉRMICO E AÇÃO DA ENZIMA
β-GLICOSIDASE NA FORMAÇÃO
DE AGLICONAS EM SOJA**

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos. Área de concentração: Processo de separação com membranas.

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Cunha Petrus

FLORIANÓPOLIS
2006

GRICIELLE APARECIDA SUTIL

TRATAMENTO HIDROTÉRMICO E AÇÃO DA ENZIMA β -GLICOSIDASE NA FORMAÇÃO DE AGLICONAS EM SOJA

Dissertação julgada para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos, área de Processo de separação com membranas e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

Prof. Dr. José Carlos Cunha Petrus
Orientador

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. José Carlos Cunha Petrus

Prof^a. Dr^a. Edna Regina Amante

Prof^a. Dr^a. Elane Schwinden Prudêncio

Florianópolis SC, 2006

AGRADECIMENTOS

A Deus acima de tudo, pela coragem, perseverança e por colocar as pessoas certas no meu caminho.

A minha família pelo apoio e incentivo em todos os momentos.

Ao professor Dr. José Carlos da Cunha Petrus, pela orientação, paciência e confiança depositada.

Aos pesquisadores Vera de Toledo Benassi e José Marcos Mandarino, pelas valiosas sugestões e oportunidade de realização deste trabalho na EMBRAPA-SOJA.

Aos estagiários Wladimir, Andréia e Adriana e funcionários Gustavo, Donizete, Mariluci, Tânia e Ivani da EMBRAPA-SOJA, pelo auxílio na condução dos experimentos de laboratório, análises estatísticas e principalmente pela amizade.

Aos colegas do LABSEM e do curso, pelas conversas, troca de conhecimentos e amizade.

A Silvana Góes-Favoni Pedroso pelas correções, sugestões e amizade.

A todos os meus amigos em especial Thaís e Miquele que acompanharam de perto, sempre com palavras de incentivo e carinho.

A todos que torceram e acreditaram no meu trabalho.

Dedico este trabalho a:

Carlos Sutil
Elza Aparecida Sutil

SUMÁRIO

1. Introdução	10
2. OBJETIVOS	12
2.1 Objetivo Geral	12
2.2 Objetivos Específicos.....	12
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1 Soja	14
3.1.1 Composição do Grão de Soja.....	15
3.1.2 A Soja como Alimento Funcional.....	18
3.3 Isoflavonas	20
3.3.1 Alterações nas isoflavonas durante o processamento	24
3.3.2 Tratamento Hidrotérmico e pH	26
3.2 Enzima β - Glicosidase	28
3.4 Processo de Separação com Membranas	31
4. MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1 Material	38
4.1.1 Soja	38
4.1.3 Membranas Comerciais	39
4.1.4 Equipamentos e Dispositivos Utilizados nos Experimentos	40
4.1.4.1 Célula de Filtração	40
4.1.4.2 Equipamentos Utilizados nos Experimentos	40
4.2 Métodos	41
4.2.1 Tratamento Hidrotérmico	41
4.2.2 Determinação do Teor de Isoflavonas	43
4.2.3 Unidade De Atividade Específica (UAE) Da Enzima β -Glicosidase	44

4.2.3.1 Unidade de Atividade Enzimática (UA).....	44
4.2.3.2 Proteínas Solúveis.....	45
4.2.4 Determinação Da UA E UAE Da Enzima β -Glicosidase Nos Experimentos	45
4.2.5 Estabilidade Térmica De Isoflavonas Em Produtos Alimentícios.....	47
4.2.6 Estabilidade Térmica De Isoflavonas Em Farinha De Soja Hidratada	49
4.2.7 Concentração De Isoflavonas Utilizando Processo De Separação Com Membranas	50
4.2.7.1 Ensaio de Ultrafiltração.....	51
4.2.7.2 Ensaio de Nanofiltração	52
4.2.7.3 Ensaio de Osmose Inversa	52
4.3 Análises Estatísticas	53
5. RESULTADOS e DISCUSSÃO.....	57
5.1 Tratamento Hidrotérmico em Grãos de Soja Inteiros e Farinha de Soja em Diferentes pH.....	57
5.2 Determinação da Unidade de Atividade Enzimática (UA) e Unidade de Atividade Específica (UAE) da enzima β -glicosidase.....	61
5.3 Estabilidade Térmica das Isoflavonas em Produtos Alimentícios.	71
5.4 Concentração de Isoflavonas Através do Processo de Separação com Membranas.....	81
CONCLUSÃO GERAL	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Estrutura geral das isoflavonas encontradas na soja.....	21
Figura 02 - Estrutura geral da aglicona.....	23
Figura 03 - Espectro de separação em relação ao tamanho das partículas dos processos de microfiltração, ultrafiltração, nanofiltração, osmose inversa e troca iônica.....	33
Figura 04 - Diferença entre a filtração convencional e filtração tangencial.....	35
Figura 05 - Desenho esquemático da célula de filtração utilizada nos experimentos.....	40
Figura 06 - Fluxograma para obtenção da farinha de soja hidratada.....	42
Figura 07 - Fluxograma do processo de obtenção de extrato etanólico utilizado para a concentração com membranas.....	50
Figura 08 - UAE (UA/mg) da enzima β -glucosidase em farinha de soja hidratada (50°C/15hrs) em diferentes pH.....	64
Figura 09 – UA (UA/100g) em farinha de soja hidratada em diferentes tempos com e sem inibidor.....	67

LISTA DE TABELAS

TABELA 01 - Composição centesimal em matéria seca e constituintes fitoquímicos da soja.....	16
TABELA 02 - Radicais e massa molar das isoflavonas.....	21
TABELA 03 - Radicais e massa molar das formas de isoflavonas.....	24
TABELA 05 – Formulação de bolo com farinha de soja hidratada.....	48
TABELA 06 - Formulação de biscoito com farinha de soja hidratada...	49
TABELA 07 - Teor médio e desvio padrão de isoflavonas (mg/100g) em grãos de soja inteiros e farinha de soja hidratados a 50 °C por 15 horas em diferentes pH.....	59
TABELA 08 – Modelo estatístico para análise de teor de isoflavonas (malonil, glicosídeos e agliconas) em função do grão inteiro e farinha...	60
TABELA 09 - Teor de agliconas em grãos de soja inteiro e farinha de soja submetidos a tratamento hidrotérmico a 50°C por 15horas em diferentes pH.....	61
TABELA 10 - Modelo estatístico para análise da UAE em farinha de soja hidratada.....	62
TABELA 11 – Unidade de Atividade Enzimática (UA/100g) e Unidade de Atividade Específica (UA/Mg) da enzima β -glucosidase e farinha de soja hidratada a 50 °C/15 Horas em diferentes pH.....	63
TABELA 12 - Unidade de Atividade Enzimática (UA/100g) em farinha e soja hidratada com e sem adição de glucona- δ -lactona em Diferentes intervalos de tempo.....	66
TABELA 13 - Modelo estatístico para análise da UA em função do inibidor (com e sem).....	67
TABELA 14 - Teor de agliconas (Mg/100g) em farinha de soja com e em inibidor em função do tempo.....	69
TABELA 15 - Modelo estatístico para análise de agliconas em função do inibidor (com e sem).	70
TABELA 16 - UAE (UA/Mg) em farinha de soja hidratada com diferentes concentrações de inibidor glucona- δ -lactona em diferentes intervalos de tempo.....	71

TABELA 17 - Modelo estatístico para análise do tempo em função do inibidor.....	72
TABELA 18 - Modelo estatístico para análise de diferentes concentrações de inibidor em função do tempo.....	72
TABELA 19 – Estabilidade térmica das isoflavonas (Mg/100g) em farinha de soja antes e após o tratamento hidrotérmico, na massa de bolo e após assamento a diferentes temperaturas.....	74
TABELA 20 – Estabilidade térmica das agliconas (Mg/100g) nos bolos após assamento a diferentes temperaturas.....	75
TABELA 21 – Estabilidade térmica das isoflavonas (Mg/100g) em farinha de soja antes e após o tratamento hidrotérmico, na massa de biscoito e após assamento.....	76
TABELA 22 – Estabilidade térmica das agliconas daidzeína, gliciteína e genisteína (Mg/100g) em biscoito cru e assado a 150 °C.....	77
TABELA 23 - Estabilidade térmica das isoflavonas (Mg/100g) em farinha de soja hidratada após tratamento térmico.....	79
TABELA 24 - Teor de agliconas (Mg/100g) em farinha de soja Hidratada submetida a tratamento térmico a 140 e 180 °C.....	82
TABELA 25 – Percentual de retenção de isoflavonas na nanofiltração e osmose inversa a partir do extrato etanólico de soja.....	83
TABELA 26 - Percentual de retenção de agliconas na nanofiltração e osmose inversa a partir do extrato etanólico de soja.....	84
TABELA 27 - Teor de isoflavonas (Mg/100g) nos processos de nanofiltração e osmose inversa a partir do extrato etanólico de soja.....	85
TABELA 28 - Teor de agliconas (Mg/100g) nos processos de nanofiltração e osmose inversa a partir de extrato etanólico de soja.....	86

RESUMO

Tem aumentado nas últimas décadas o interesse por estudos envolvendo consumo de soja e derivados. Estudos epidemiológicos têm sugerido que o consumo de soja pode trazer benefícios no controle de doenças crônicas tal como câncer, diabetes, osteoporose e doenças cardiovasculares. Estes benefícios são devidos às isoflavonas presentes na soja. As isoflavonas são compostos fenólicos, presentes em maiores concentrações em leguminosas, em particular na soja. Elas se apresentam em quatro formas: glicosiladas, acetilglicosiladas, malonilglicosiladas e na forma não conjugada, aglicona. Dentre estas, a mais importante é a aglicona que, por sua vez, se encontra em três formas: daidzeína, genisteína e gliciteína. Para aumentar o teor das agliconas, foi realizado tratamento hidrotérmico a 50 °C durante 15 horas, onde grãos inteiros e farinha de soja foram hidratados em tampões com diferentes pH, os resultados mostraram que o maior teor de agliconas foi obtido em farinha de soja hidratada em pH 6,0 e 7,5. Realizaram-se, também, experimentos com adição de glucona- δ -lactona, inibidor específico da β -glicosidase, verificando-se redução na atividade da enzima em até 40 %, após 12 horas de tratamento hidrotérmico. Foram estudadas, também, as estabilidades térmicas das isoflavonas de bolos e biscoitos submetidos a assamento, preparados a partir de farinha de soja hidratada. Os resultados demonstraram pequena redução no teor de agliconas. Com a torrefação da farinha de soja hidratada, nas temperaturas de 140 °C e 180 °C, verificou-se a formação de acetil e poucas variações das agliconas. As isoflavonas foram concentradas utilizando-se a nanofiltração e osmose inversa a partir do extrato etanólico de soja enriquecido nesses compostos. Foram concentrados 76 % das isoflavonas totais pela nanofiltração e 70,61 % das agliconas pela osmose inversa.

ABSTRACT

It has increased in the last decades the interest for studies involving consumption of soy and derivatives. Studies epidemiologists have suggested that the soy consumption can bring benefits in the control of chronic illnesses such as cancer, diabetes, osteoporosis and coronary heart disease. The isoflavones present in the soy are the responsables for these benefits. Isoflavones are phenolic composites, present in bigger concentrations in vegetables, in special in the soybean. They present themselves in four forms: glucosides, acetylglucosides, malonylglucosides and in the form not conjugated, aglycones. Amongst these, aglicona is the most important, it presents in three forms; daidzein, genistein and glycitein. To increase the content of aglycones, a hydrotermic treatment was carried through 50 °C during 15 hours, where soybean and flour of soy had been hydrated in buffers with different pH, the results had shown that the biggest content of aglycones was gotten in flour of soy hydrated in pH 6,0 and 7,5. Were realized experiments using D-glucono- δ -lactone addition, specific inhibitor β -glucosidase, verifying reduction in the activity of the enzyme in up to 40 %, after 12 hours of hydrotermic treatment They had been studied, also, the thermal stabilities of isoflavones in cakes and biscuits, made with flour of hydrated soy during roasting. The results had demonstrated small reduction in the content of aglycones. With the toasting of the flour of hydrated soy, in the temperatures of 140 °C and 180 °C, it was verified formation of acetyl and few variations of aglycones. Isoflavones nanofiltration and inverse osmosis from the ethanol extract of soy enriched in these composites had been concentrated using it. A concentration of 76 % of isoflavones total for nanofiltration and 70,61 % of aglycones for the inverse osmosis was obtained.

1. INTRODUÇÃO

Dentre os produtos agrícolas de grande interesse econômico comercializados em todo o mundo, a soja vem ganhando destaque. Isto se deve às suas características nutricionais importantes e por apresentar benefícios à saúde humana através da prevenção e do tratamento de doenças. O Brasil atualmente é considerado o segundo maior produtor mundial de soja, com isto é viável que seja estimuladas pesquisas para o desenvolvimento de alimentos derivados de soja, ricos nutricionalmente, bem como para a elaboração de alimentos funcionais.

Os alimentos funcionais que mesclam conceitos de saúde e nutrição estão sendo cada vez mais consumidos pela população. Estimativas indicam que o mercado para os alimentos funcionais em 2010 serão de aproximadamente de 500 bilhões de dólares por ano nos EUA, 250 bilhões na Europa e 60 bilhões no Japão (DIAS, 2002).

As características funcionais da soja se devem principalmente à presença das isoflavonas, compostos encontrados em quatro formas químicas, malonil-glicosídica, acetil-glicosídica, glicosídica e agliconas. As de maior interesse são as agliconas, por apresentarem maior bioatividade, sendo absorvidas mais rapidamente e em maiores quantidades pelo organismo (SETCHELL et al., 2001) e por terem sido, também, associadas ao tratamento de doenças hormônio-dependentes.

A indústria de alimentos tem oferecido uma grande quantidade de produtos derivados da soja. Entretanto, faltam no mercado produtos com maiores teores de agliconas. Trabalhos têm mostrado que o tratamento

hidrotérmico de grãos de soja é eficaz em aumentar o teor de agliconas, por ação da enzima β -glicosidase. Nesse processo os grãos são macerados em banho-maria por tempo e temperatura determinados.

Dentre as técnicas empregadas para a separação ou concentração de isoflavonas, as membranas se apresentam como promissoras. A tecnologia de separação com membranas é uma técnica capaz de clarificar, purificar e concentrar esses compostos que poderão ser utilizados em muitas aplicações industriais.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Verificar o efeito do tratamento hidrotérmico no aumento do teor de aglicona em soja e sua estabilidade térmica em produtos alimentícios.

2.2 Objetivos Específicos

1. aplicar o tratamento hidrotérmico em grãos de soja inteiros e farinha de soja em diferentes pH visando o aumento de agliconas.
2. determinar a Unidade de Atividade Específica (UAE) da enzima β -glicosidase nas condições de tratamento testadas.
3. verificar a ação do inibidor glucona-lactona sobre a enzima β -glicosidase.

4. determinar a estabilidade térmica das isoflavonas em produtos preparados a partir de farinha de soja, previamente submetidos ao tratamento hidrotérmico.
5. obter o extrato etanólico enriquecido de agliconas, a partir de farinha de soja hidratada.
6. concentrar isoflavonas a partir do extrato etanólico empregando tecnologia de separação por membranas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Soja

A soja [*Glycine Max* (L.) Merrill] constitui uma das plantas mais antigas cultivadas pelo homem. Teve sua origem na China por volta do século XI a.C, sendo introduzida no Ocidente no final do século XV e início do XVI. No Brasil, a soja foi efetivamente introduzida em 1914 no Estado do Rio Grande do Sul, porém o verdadeiro impulso na produção da soja no Brasil ocorreu somente na década de 60, quando se iniciou o cultivo sucessivo trigo-soja no Rio Grande do Sul. No final dessa década e na seguinte, começaram a ser desenvolvidas, por melhoramento genético, as primeiras cultivares brasileiras de alto rendimento e adaptadas às nossas condições climáticas (MORAIS e SILVA et al., 1996).

No Brasil, a produção de soja na safra 2004/2005, conforme dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) foi da ordem de 51 mil toneladas, posicionando o Brasil em 2º lugar na produção mundial de soja, sendo superado apenas pelos Estados Unidos. Ressalte-se que a maior parte da soja produzida mundialmente é destinada a alimentação animal. A média de uso global anual de soja mostra que 84,4 % são destinados à produção de farinha e óleo, 95 % da farinha para alimentação animal, 8,6 % para produtos de soja como: tofu, extrato de soja e produtos fermentados e 5,7 % são destinados para sementes e resíduos (SOYATECH, 2004).

A aceitação limitada da soja e dos seus derivados pelo consumidor brasileiro é atribuída à falta de produtos de soja de alta qualidade. Nos últimos tempos vários estudos tecnológicos (WILKENS et al., 1967; WOLF e COWAN, 1975; NELSON et al., 1976; RACKIS et al., 1979) de melhoramento genético (DAVIES e NIELSEN, 1986), acompanhados de alternativas no preparo, estão sendo conduzidos para aumentar a aceitabilidade dos produtos de soja.

A soja é considerada uma oleaginosa muito versátil sendo comercializada na forma de grão, de farinha, texturizada, concentrados e isolados, extrato ou “leite” além de produtos fermentados como: miso, tempeh, shoyo e outros.

3.1.1 Composição do Grão de Soja

A soja é considerada um alimento de alto valor nutricional, porque contém um teor protéico de alto valor biológico, lipídeos com alta concentração de ácidos graxos poliinsaturados, teores consideráveis de vitaminas do complexo B e minerais como: ferro, potássio e magnésio (Tabela 01).

TABELA 01 - Composição centesimal em matéria seca e constituintes fitoquímicos da soja.

Composição Centesimal (%)	Fitoquímicos
Proteínas (40)	Isoflavonas
Gorduras (22)	Esteróis
Carboidratos (25)	Saponinas
Fibras (8)	Anti-oxidantes
Minerais (5)	Tocoferóis (vitamina E)
	Lecitinas

Fonte: CARRÃO-PANIZZI e MANDARINO (1998)

Dentre os componentes funcionais da soja destacam-se as proteínas e isoflavonas. Considera-se na atualidade que a soja é o único vegetal que contém uma proteína completa (MORAIS, 2000).

Os grãos de soja ainda contêm carboidratos com teor mais elevado na casca (CARRÃO PANIZZI, 1988) e oligossacarídeos (estaquiose e rafinose) que são hidrolisados pelas enzimas invertase e α -galactosidase. Esses oligossacarídeos são reduzidos com a maceração e o cozimento dos grãos (LIU e MARKAKIS, 1987) e na fabricação do tofu, são eliminados no soro (VAN DER RIET et al., 1989).

O grão de soja apresenta alguns fatores antinutricionais, onde consumidas, principalmente cruas ou inadequadamente processadas, podem provocar efeitos fisiológicos adversos ao homem ou reduzir a biodisponibilidade de determinados nutrientes. Os fatores antinutricionais são classificados em termolábeis e termoestáveis. Os termolábeis sensíveis ao calor são os inibidores de proteases, lectinas ou hemaglutininas, goitrogênicos e antivitaminicos e podem ser facilmente destruídos pelo calor; os termoestáveis são as saponinas, taninos, fitoestrógenos, fatores de flatulência, lisinoalanina, alergênicos e fitato (LIENER, 1994).

A composição do grão de soja é influenciada por uma série de fatores genéticos e ambientais, safra e localização, causando alterações principalmente na quantidade de isoflavonas. Temperatura do meio ambiente durante o desenvolvimento das sementes é um fator determinante para o conteúdo das isoflavonas nas sementes de soja, sendo que altas temperaturas diminuem essas quantidades (KITAMURA et al., 1991). Existem relatos de uma maior razão de malonil-glicosídeos em grãos de soja, entretanto as agliconas, principal isoflavona, são encontradas em maior quantidade em produtos fermentados (WANG e MARPHY, 1994).

CARRÃO PANIZZI et al. (2003) em seus estudos analisaram o desenvolvimento de sementes em três locais em temperaturas diferentes de 19,2; 23,2 e 23,7 °C. Verificaram que em temperaturas mais baixas houve um maior desenvolvimento de isoflavonas nas sementes. Em outro experimento os mesmos autores verificaram também o efeito da latitude, que causa diferenças ambientais responsáveis pelas concentrações de isoflavonas. No Brasil a soja é produzida em regiões de latitude de 33 °S até o Equador. Nesse

experimento, verificou-se que apesar de duas das três cidades estarem localizadas quase na mesma latitude (26 °S e 25 °S), as diferenças ambientais foram responsáveis pelas diferentes concentrações de isoflavonas.

3.1.2 A Soja como Alimento Funcional

Estudos epidemiológicos têm sugerido que o alto consumo de soja é relatado com menores incidências de câncer de mama e câncer de próstata na Ásia (ADLECREREUTZ et al., 1991). Existem estudos sugerindo que a soja pode reduzir riscos de osteoporose, riscos de doenças do coração, inibir atividade da tirosina e proteína quinase, além de possuir propriedades antioxidantes e antifúngicas, propriedades estrogênicas, ajudando a aliviar sintomas de menopausa. Conseqüentemente, a soja é considerada uma possível alternativa para terapia de reposição hormonal.

De acordo com estudos são descritos a seguir, alguns dos efeitos benéficos do consumo de soja no combate de algumas doenças.

Doenças do coração – Em 1999, o Food and Drugs Administration (FDA) oficializou o potencial terapêutico da soja na prevenção de doenças do coração. O FDA se baseou em estudos científicos, que demonstraram que a ingestão diária de 25 gramas de proteínas de soja reduz significativamente as taxas do colesterol sanguíneo total, do LDL-colesterol e, também, aumentam os valores de HDL presentes no sangue, reduzindo assim os riscos de doenças cardiovasculares, como o infarto, a trombose e a aterosclerose.

Osteoporose - Vários estudos sugerem que produtos ricos em isoflavonas afetam o volume do osso e reduzem a sua perda para a espinha dorsal (MESSINA et al., 2000). Estudos em animais e humanos indicam que isoflavonas podem estimular a formação e a redução do osso. Além disto, substituindo proteína animal pela proteína de soja + isoflavonas reduz substancialmente a excreção cálcica (BRESLAU et al., 1988 apud MESSINA et al., 2000). Estes prováveis efeitos são devido a menor quantidade de aminoácidos sulfurados presentes na proteína de soja.

Sintomas da menopausa – O climatério ocorre em 75 % das mulheres na menopausa e influencia na qualidade de vida. Tem aumentado nas últimas décadas o interesse pelo consumo de isoflavonas, encontradas em produtos de soja, para terapia de reposição hormonal e redução do climatério. Um estudo foi realizado durante nove semanas com mulheres na menopausa, as quais ingeriram diariamente pela manhã 40 mg de isoflavonas (extrato isoflavona aglicona) produto rico em daidzeína (70 % daidzeína, 10 % genisteína e 20 % gliciteína), sendo observados em quatro semanas uma redução na frequência e severidade de sintomas de climatério e com maior decréscimo após, oito semanas (RICCIOTTI et al., 2005).

Câncer - A menor incidência de mortes por câncer de mama na Ásia levou à especulação de que o consumo de soja poderia reduzir os riscos deste tipo de câncer. *In vitro*, genisteína inibe o crescimento de células do câncer de mama ER+ e ER-, embora sejam requeridas concentrações relativamente altas. Experimentos com animais (BAGGOTT et al., 1990; SHARMA et al., 1992) e experimentos *in vitro* (WEI et al., 1993) têm mostrado que isoflavonas podem prevenir os efeitos do desenvolvimento de câncer de

mama, intestino, fígado, bexiga, pele e estômago. Tem sido demonstrado em estudos, que a atividade de várias enzimas, principalmente a topoisomerase II e as tirosina quinases, é inibida pela genisteína e, em alguns casos, por outras isoflavonas. Outros estudos têm demonstrado propriedades anti-carcinogênicas, anti-oxidativas, efeitos anti-estrogênicos e anti-proliferativos das isoflavonas. Então, pode-se inferir que estas moléculas podem agir de maneiras diferentes, promovendo a inibição da carcinogênese (MOLTENI et al., 1995 apud ESTEVES e MONTEIRO, 2001).

3.3 Isoflavonas

As isoflavonas são consideradas uma classe de fitoestrógeno que estão presentes na soja e tem demonstrado alta atividade biológica. O grão de soja contém basicamente três tipos de isoflavonas que se apresentam normalmente em quatro diferentes formas, glicosiladas (daidzina, genistina e glicitina); formas acetilglicosiladas (acetildaidzina, acetilgenistina e acetilglicitina); formas malonilglicosiladas (malonildaidzina, malonilgenistina e malonilglicitina) e na forma estrutural não conjugada, aglicona (daidzeína, genisteína e gliciteína) (KUDOU et al., 1991; WANG e MARPHY, 1994). A estrutura geral das isoflavonas pode ser observada na Figura 01.

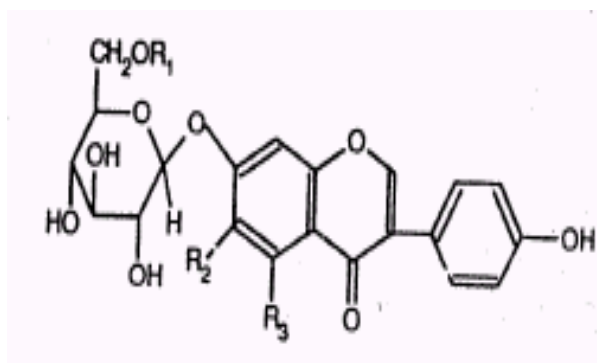


Figura 01- Estrutura geral das isoflavonas encontradas na soja (NURMI et al., 2002).

A Tabela 02 apresenta os radicais e massa molar relativos da estrutura química das isoflavonas representadas na Figura 01.

TABELA 02 - Radicais e massa molar das isoflavonas

Isoflavonas	R ₁	R ₂	R ₃	g/mol
Malonildaidzina	H	H	COCH ₂ COOH	416
Acetildaidzina	H	H	COCH ₃	502
Daidzina	H	H	OH	458
Malonilgenistina	OH	H	COCH ₂ COOH	432
Acetilgenistina	OH	H	COCH ₃	518
Genistina	OH	H	OH	474
Malonilglicitina	H	OH	COCH ₂ COOH	446
Acetilglicitina	H	OH	COCH ₃	532
Glicitina	H	OH	H	488

Fonte: NURMI et al. (2002)

Devido à natureza fenólica, as isoflavonas são susceptíveis à biotransformação rápida em grupo hidroxil pela UDP-glucoronosiltransferase e sulfotransferases na mucosa intestinal, fígado e outros órgãos. No homem, as agliconas são absorvidas mais rapidamente e em maiores quantidades que seus glicosídeos (IZUMI et al., 2000). As isoflavonas glicosídicas são mais dificilmente absorvidas pelo intestino quando comparados com as agliconas, por terem maior massa molar e alta hidrofobicidade. Estudos têm demonstrado que as funções fisiológicas variam entre as isoflavonas. Por exemplo: em relação à ação anticancerígena, a genisteína tem sido estudada principalmente por inibir o crescimento de células do câncer de próstata (ONOZAWA et al, 1998 apud LI-JUN, YIN et al., 2004).

A forma malonil tem sido descrita como a principal isoflavona constituinte das sementes de soja, embora ela seja termicamente instável e convertida em sua correspondente isoflavona glicosídica (KUDOU et al., 1991). Em geral as concentrações desses compostos diminuem com a intensidade do processamento (MURPHY, 1992).

Em soja cru as três formas de agliconas; genisteína, daidzeína e gliciteína são encontradas na razão de aproximadamente 6:3:1 respectivamente. A concentração de isoflavonas em soja não processada em média é de 1,2-4,2 mg/100g, com grande variação devido a variedade, ano de colheita e localização do plantio (WANG e MURPHY, 1994).

As agliconas são estruturalmente similares ao estrogênio e, portanto, imitam as funções do estradiol no corpo humano (SETCHELL e CASSIDY, 1999 apud TSANGALIS et al., 2004). Por estas razões as agliconas têm sido associadas com a prevenção e tratamento potencial hormônio-

dependentes. Estudos *in vitro* demonstram que as agliconas previnem as transformações de células normais em pré-malignas, torna mais lenta a proliferação celular e atenua a angiogênese (ANDERSON et al., 1999), sendo que a biodisponibilidade das agliconas é maior que dos conjugados glicosídeos (KURZER e XU, 1997). A conversão das formas glicosídicas em agliconas é realizada pela ação da enzima β -glicosidase, considerando que a disponibilidade da enzima é limitada no organismo, a ingestão de alimentos com maiores concentrações de agliconas torna o processo de absorção mais rápido. A estrutura química da agliconas está representada na Figura 02.

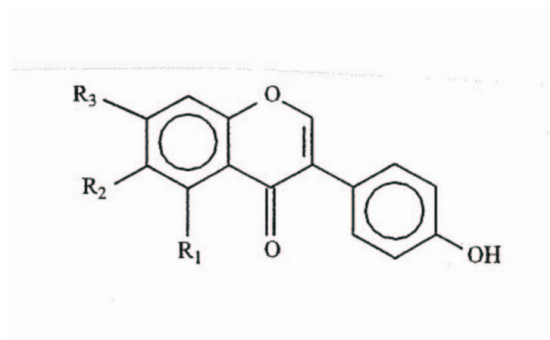


Figura 02 - Estrutura geral da aglicona (NURMI et al., 2002)

A Tabela 03 apresenta os radicais e massa molar das agliconas daidzeína, genisteína e gliciteína.

TABELA 03- Radicais e massa molar das formas de agliconas

Isoflavonas	R ₁	R ₂	R ₃	g/mol
Daidzeína	H	H	OH	254
Gliciteína	OH	H	OH	270
Genisteína	H	OCH ₃	OH	284

Fonte: NURMI et al. (2002)

3.3.1 Alterações nas isoflavonas durante o processamento

As condições de processamento da soja podem causar mudanças no conteúdo e no perfil das isoflavonas. Maceração, processamento térmico e coagulação em produtos processados de soja têm sido reportados por aumentar o conteúdo de isoflavonas (WANG e MARPHY, 1996), porém são observadas, importantes perdas de isoflavonas, entre outros compostos, como é o caso do processamento do tofu, onde parte das isoflavonas são descartadas no soro. A estocagem é também conhecida por alterar o perfil de isoflavonas em produtos de soja (KIM et al., 2005).

Estes estudos sugerem que diferenças no processamento afetam a funcionalidade de produtos de soja. Conjugados glicosídeos de isoflavonas foram convertidos para isoflavonas agliconas durante o processamento através da enzima β -glicosidase (TODA et al., 2001; ARAÚJO, 1997).

KAO et al., (2004) estudando a estabilidade de isoflavonas glicosídicas durante o processamento do leite de soja e tofu observaram uma

maior formação de genisteína durante a maceração, seguida de daidzeína e gliciteína. O conteúdo total de isoflavonas pode ser alterado com o emprego de altas temperaturas através da conversão das derivadas. Das quatro formas de isoflavonas, somente as agliconas mostraram uma tendência ao aumento durante a maceração com o tempo e temperatura. Isto é devido à hidrólise dos glicosídeos realizada pela β -glicosidase em soja durante a maceração (WANG e MARPHY, 1996 apud KAO et al., 2004). Verificou-se em estudos, que o maior rendimento de agliconas ocorreu durante a maceração a 45 °C do que 25 e 35 °C, podendo ser devido à enzima β -glicosidase possuir maior atividade, próxima de 50 °C, e os níveis de agliconas aumentarem ao máximo nesta temperatura pela hidrólise dos glicosídeos.

O aquecimento causa uma mudança no perfil de conjugados de isoflavonas em produtos de soja. COWARD et al. (1998), relataram que o cozimento e fritura de proteína isolada de soja e proteína vegetal texturizada não alteram o conteúdo total de isoflavonas, mas muda o perfil individual de isoflavonas devido a conversão de conjugados malonil. A conversão para agliconas e o decréscimo em isoflavonas totais foram observados somente quando os alimentos foram aquecidos excessivamente. Similarmente, MAHUNGU et al., (1999), observaram que o calor seco durante a extrusão em produtos de soja aumentou os conjugados acetil e diminuiu os conjugados malonil. No entanto, eles também observaram um decréscimo no conteúdo total de isoflavonas devido ao processamento por extrusão. Embora as isoflavonas sejam geralmente estáveis ao calor, FRANKE et al., (1999), verificaram um decréscimo de 13 % no tofu cozido em relação ao tofu cru o que foi atribuído à lixiviação de isoflavonas para água.

3.3.2 Tratamento Hidrotérmico e pH

O tratamento hidrotérmico é capaz de aumentar o teor de isoflavonas agliconas presentes na soja através da conversão de isoflavonas glicosídicas pela ação da enzima β -glicosidase. O efeito do pH do meio de hidratação é também um fator de grande importância para que ocorra o aumento na concentração de agliconas.

Embora limitados, são encontrados na literatura recente, trabalhos que mostram o efeito do tratamento hidrotérmico sobre as isoflavonas presentes na soja (GÓES-FAVONI, 2002; CARRÃO-PANIZZI et al., 2003). GÓES-FAVONI (2002) com o objetivo de aumentar o teor de genisteína em farinha de soja realizou tratamento hidrotérmico em grãos de soja inteiros a 50⁰C por 1, 4, 8, 12, 16, 20 e 24 horas. O teor de agliconas aumentou concomitante ao aumento do tempo de hidratação, sendo que após 24 horas o teor de genisteína passou de 1,0 % para 33,0 % do teor total de isoflavonas. Após 12 horas de hidratação, os teores de genisteína sofreram poucas alterações, e levando-se em conta os custos numa escala industrial, foi considerado o tratamento hidrotérmico a 50 ⁰C por 12 horas o tratamento ideal na elaboração de farinha de soja com maior teor da isoflavona genisteína (GÓES-FAVONI, 2002).

Em estudos realizados por CARRÃO-PANIZZI et al. (2003), utilizando tratamento hidrotérmico a temperaturas de 40, 50, 60 °C em grãos de soja cultivados em locais diferentes, durante diferentes tempos de imersão 12 e 18 horas relata-se que grãos secos que não sofreram tratamento hidrotérmico apresentaram concentrações totais de agliconas muito reduzidos.

Após o tratamento hidrotérmico as concentrações de agliconas nos grãos aumentaram oito vezes. A 50 °C houve um maior desenvolvimento de isoflavonas agliconas. A 60 °C a redução no teor de agliconas pode ser decorrente a inativação das β -glicosidases. As concentrações totais de isoflavonas diminuíram após tratamentos hidrotérmicos dos grãos por 18 horas. As maiores concentrações de daidzeína e genisteína foram observadas nos tratamentos a 50 °C por 12 horas e a 40 °C por 18 horas. A hidrólise é tempo-dependente e as β -glicosidases gradualmente perdem atividade. Sendo assim, o tratamento hidrotérmico a 50 °C por 12 horas é o mais eficiente no desenvolvimento de isoflavonas agliconas.

UNGAR et al. (2003), analisando a estabilidade térmica da genisteína e daidzeína e seus efeitos na atividade antioxidante verificaram o efeito do pH alcalino (pH 9,0) e pH neutro (pH 7,0) em temperatura de 120 °C. Em solução alcalina a concentração de genisteína foi reduzida para 60 % uma vez que a daidzeína foi menos afetada pelo tratamento térmico e uma menor redução foi observada. Diferentemente em pH neutro, a daidzeína foi menos estável do que a genisteína, e a concentração diminuiu para 40 % comparando-se com 22 % para a genisteína. Neste mesmo estudo observou-se que a perda de daidzeína e seus conjugados (44 %) foram maior que para a genisteína (33 %). A razão de degradação da daidzeína, para ambos os valores de pH, foi mais elevada do que a genisteína. Aparentemente, a daidzeína é mais termosensível do que a genisteína em altas temperaturas.

BARBOSA et al. (2006), realizaram estudos verificando a influência do pH na solubilidade das isoflavonas. Observaram que as isoflavonas mostraram maior solubilidade em solução aquosa em pH na faixa

de 2-10 (73-93 % da quantidade solubilizada em etanol). Uma menor solubilidade de isoflavonas foi observada em pH entre 4 e 6. Para $\text{pH} \geq 8$, a reação de malonilação parece ser mais favorecida. Malonil- β -glicosídeo diminuiu em torno de 50 % (pH 8,0) e para 36 % (pH 10), enquanto que β -glicosidase aumentou proporcionalmente de 43 % (pH 8,0) para 57 % (pH 10) nas isoformas totais. As formas acetil- β -glicosidase e agliconas mostraram pequena variação.

3.2 Enzima β -glicosidase

As β -glicosidases compreendem um grupo heterogêneo de enzimas que são capazes de quebrar as ligações de di e/ou oligossacarídeos, ou outros conjugados de glicose. Participam de processos biológicos como: degradação de biomassa celulósica, hidrólise de glicolipídeos, cianogenese e modificação de metabólitos secundários (ESEN, 1993). Em plantas, a atividade da enzima β -glicosidase envolve processos de compartimentalização e atividade de fitohormônios (KLECZKOWSKI e SCHELL, 1995), mecanismos de defesa contra micróbios, insetos ou plantas parasíticas (BELL, 1981; POULTON, 1990; PHILLIPS e STREIT, 1996), desenvolvimento floral e pigmentação (HARBORNE e MABRY, 1992; KOES et al., 1994), possuem também função de lignificação e decomposição da parede celular (HOSEL et al. 1978; LEAH et al., 1995). Várias β -glicosidases originárias de plantas

possuem especificidade pelo substrato, tendo seletividade específica para com saponina (INOUE e EBIZUKA, 1996), hidrojuglone (DUROUX et al., 1998), cinamilalcool (DHARMAWARDHANA et al., 1995), glicosídeos cianogênicos (CONN, 1993), flavonas (MAIER et al., 1993) e isoflavonas (HOSEL e BARZ, 1975). A enzima tem alta atividade específica com genisteína/daidzeína 7-O-glucosil 6"-O-malonato (MGD e MGG), com baixos valores de k_m e alta k_{cat} . (MING-CHING e TERRENCE, 2001).

Foi encontrado um aumento de daidzeína e genisteína pela ação da β -glicosidase durante o processamento do leite de soja. A forma aglicona possui sabor mais intenso e desagradável que a forma glicosídica (ARAI et al., 1966, OKUBO e TAKAHASHI, 1983 apud ARAÚJO et al., 1997). Extratos da parede celular do grão de soja contêm pelo menos duas enzimas com atividade de β -glicosidase (CLINE e ALBERSHEIM, 1981 apud ARAÚJO et al., 1997). Uma delas possui somente atividade de β -glicosidase e a outra, além desta, possui a de β -glucanase. Essa última é responsável por 35 % da atividade total de β -glicosidase, sendo denominada β -glucosilase (ARAÚJO et al., 1997).

A β -glicosidase encontrada em tecidos celulares da soja tem massa molar de 45.000 g/mol, faixa de pH entre 5,2-6,0 e PI= 4,2-4,4, sendo 50 °C sua temperatura ótima de hidrólise (HOSEL e TODENHAGEM, 1980 apud ARAÚJO et al., 1997).

A formação de isoflavonas agliconas pode ser reduzida pela utilização de inibidores no controle da atividade de β -glicosidase, esperando-se, conseqüentemente, que o sabor amargo e adstringente nos produtos derivados da soja seja menos intenso. O inibidor competitivo mais potente de

β -glicosidase é a d-glicona-1,5-lactona, ou δ -lactona (TAKAHASHI e MATSUMOTO, 1963 apud ARAÚJO et al., 1997). Em meio aquoso, 1,5-lactona é convertida em ácido glucônico e 1,4-lactona, sendo esta conversão dependente do pH, da temperatura e do tempo de estocagem da solução (HEIYWORTH e WALKER, 1962, REESE e PARRISH, 1971 apud ARAÚJO et al., 1997).

ARAÚJO et al., (1997) verificaram em seus experimentos a ação da β -glicosidase sobre o p-NPG (p-nitrofenil) durante a imersão da soja em água, medindo o p-nitrofenol liberado. Com os resultados obtidos concluíram que a daidzeína e genisteína foram formadas a partir da hidrólise das isoflavonas glicosídicas pelas β -glicosidase durante a imersão dos grãos em água. Para controlar a hidrólise das isoflavonas glicosídicas durante a imersão, foi adicionado o inibidor competitivo de β -glicosidase, a glicona- δ -lactona. A formação de daidzeína e genisteína, que aumentaram durante a imersão em água, foi inibida pela adição de glicona- δ -lactona.

MATSUURA e OBATA (1993) em seus estudos caracterizaram a enzima β -glicosidase e a relacionaram com a hidrólise das isoflavonas glicosídicas, daidzina e genistina, durante o processamento de soja. Purificaram a enzima a partir de material cru de soja, contendo cerca de 83 % do total de β -glicosidase ativa. A recuperação foi de 65 % da enzima. O efeito do pH na atividade da enzima foi investigado também utilizando p-NPG e tampão citrato-fosfato de pH 3,5 a 8,0. O pH ótimo encontrado foi de 5,5 e o pH de atividade de 4,3-7,0. A estabilidade térmica da enzima também foi medida para pH 5,5 durante 5 minutos em várias temperaturas. A perda de atividade da

enzima foi gradual, 80 % da atividade permaneceu a 55 °C e inativada a 60 °C. A atividade da enzima foi inibida pela D-glucona- δ -lactona que é conhecida como o inibidor mais competitivo da β -glicosidase.

LI-JUN et al. (2004) verificaram a mudança da atividade da enzima β -glicosidase durante a fabricação do sufu (tofu fermentado), observando uma menor atividade da enzima no tofu, que é significativamente aumentada durante a fermentação. Embora a hidrólise das isoflavonas glicosídicas para agliconas fossem causadas pela β -glicosidase em soja, muitas das enzimas tinham sido presumidamente inativadas pelo tratamento térmico durante o preparo do tofu. A conversão dos glicosídeos em agliconas deveu-se à hidrólise pelas β -glicosidases durante a fermentação do tofu. Uma menor atividade da enzima no tofu foi detectada neste estudo. O conteúdo de NaCl no tofu também influencia a atividade da enzima. Quanto maior a concentração de NaCl a atividade da β -glicosidase tende a diminuir, impedindo a ação da enzima e, conseqüentemente, reduzindo a conversão das isoflavonas glicosídicas em agliconas.

3.4 Processo de Separação com Membranas

Os processos de separação com membranas envolvem a utilização de membranas sintéticas porosas. A principal função da membrana é atuar como barreira seletiva, permitindo a passagem de certos componentes de

uma mistura e retendo outros. Sua seletividade está relacionada com as dimensões das moléculas ou partículas de interesse de separação, ao tamanho do poro, à difusividade do soluto na membrana e às cargas elétricas associadas (CHERYAN, 1998 apud METHA e ZIDNEY, 2005). Os principais processos de separação com membranas são representados pela microfiltração, ultrafiltração, nanofiltração, osmose inversa e eletrodialise.

Com relação ao tamanho dos poros, as membranas de osmose inversa são as mais restritivas, enquanto as de microfiltração são as menos restritivas. A osmose inversa é utilizada na retenção de íons metálicos, sais em solução e açúcares de baixa massa molar, enquanto a microfiltração é normalmente utilizada para remover partículas em suspensão e células em processos fermentativos e na clarificação de líquidos. A ultrafiltração é utilizada atualmente para a concentração de uma série de produtos protéicos, incluindo terapêuticos recombinantes, enzimas industriais e para clarificação de uma variedade de bebidas (VAN REIS e ZYDNEY, 1999; WANG, 2001 apud MEHTA e ZIDNEY, 2005).

A nanofiltração vem sendo muito utilizada, principalmente na última década, na concentração de compostos de baixa massa molar ao redor de 100 a 1000 g/mol, como sais orgânicos/inorgânicos (XU e LEBRUN, 1999; VAN DER BRUGGEN et al., 2000), aminoácidos e peptídeos (MARTIN-ORUE et al., 1998), tintas (JIRARATANANON et al., 2000) e compostos orgânicos voláteis (DUCOM e CABASSUD, 1999; WANG et al., 2002). Essas membranas recebem esse nome devido ao baixo ponto de corte, sendo de um nanômetro de diâmetro (ERIKSSON, 1988). A diferença entre os processos em relação ao

tamanho das partículas pode ser verificada no espectro de separação apresentado na Figura 03.

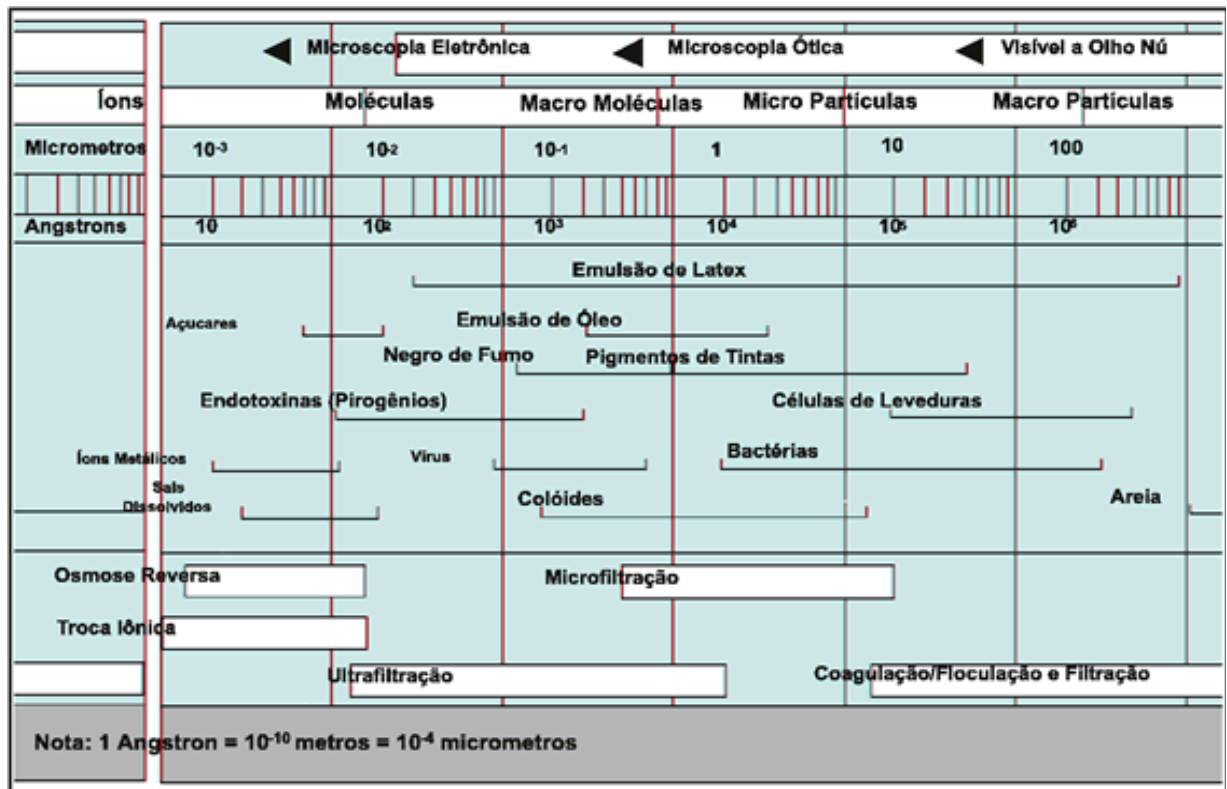


Figura 03 - Espectro de separação em relação ao tamanho das partículas dos processos de microfiltração, ultrafiltração, nanofiltração, osmose inversa e troca iônica (MIERZWA e HESPANHOL, 2005)

À primeira vista, os processos de separação com membranas poderiam ser comparados com os processos de filtração convencional, contudo, várias características fazem com que estes processos sejam distintos, devendo se destacar os seguintes:

- fluxo da solução à tratar é paralelo às membranas, ou seja, não é necessário que todo o efluente a ser tratado passe através da membrana;

- além de serem separadas partículas sólidas de pequenas dimensões, compostos orgânicos e inorgânicos dissolvidos também podem ser separados;
- a pressão de operação dos sistemas de separação por membranas é significativamente maior que nos processos de filtração convencional.

Devido ao fato dos processos de separação com membranas operarem com um fluxo paralelo às membranas, a operação de sistemas de tratamento que usam esta tecnologia irão produzir duas correntes distintas: a que passou através da membrana, da qual foram removidos os contaminantes ou compostos de interesse, chamada de permeado e a corrente que contém o material concentrado, que é denominado de retentado. No sistema de filtração convencional, o escoamento do fluido (líquido ou gasoso) é perpendicular à superfície da membrana. Isso provoca o depósito dos solutos sobre a mesma, sendo necessário a interrupção do processo para limpeza ou substituição do filtro. Devido à alta velocidade ocorre o arraste dos solutos que tendem a acumular na superfície, o que torna esse processo mais eficiente (PAULSON et al., 1984 apud RIBEIRO et al. 2005). A Figura 04 mostra a comparação entre os dois sistemas de filtração.

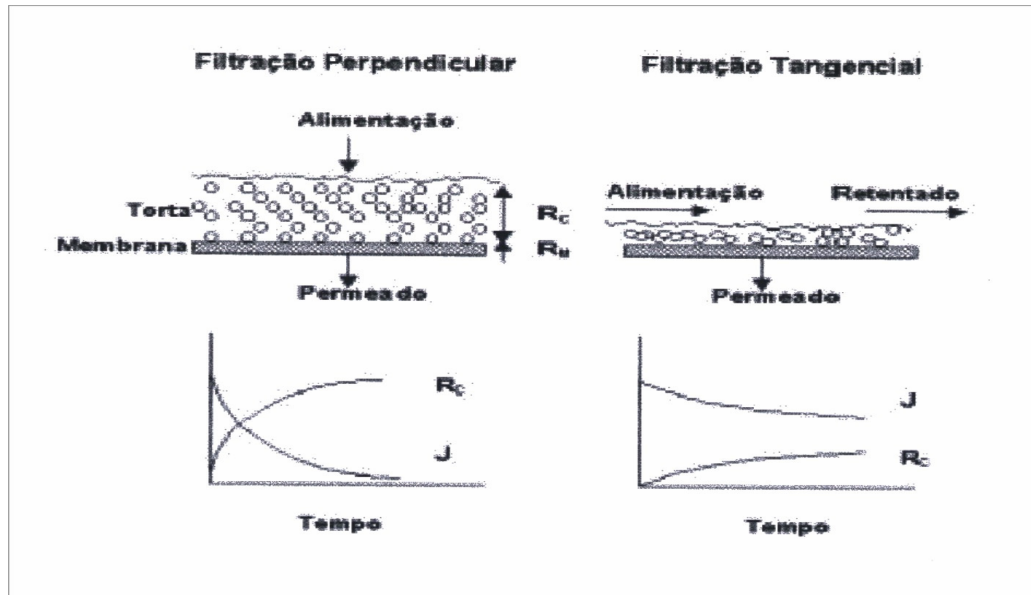


Figura 04 - Diferença entre a filtração convencional e filtração tangencial (CHERYAN, 1998)

Algumas das aplicações comerciais utilizando o método de separação com membranas podem ter aplicações em processos como: produção de nitrogênio; tratamento de água residuária; recuperação de água de lavagem, proteínas de sementes de oleaginosas; clarificação de sucos e bebidas; concentrações de leite, soros e ovos; indústria têxtil; indústria mecânica.

Recentemente, a tecnologia de separação com membranas tem sido empregada com considerável interesse no processamento de produtos de soja. A concentração ou fracionamento de proteínas de soja são exemplos de aplicação destes processos com vantagens em relação aos métodos tradicionais. A principal vantagem é a não necessidade de se utilizar produtos químicos e no caso da produção do tofu a proteína do soro agora, ser parte do produto final, resultando em um maior rendimento e propriedades funcionais superiores do produto ultrafiltrado de soja. No entanto, um sério problema durante o processo é o “fouling” da membrana, especialmente no

processamento de líquidos que contenham proteínas. (KUBERKAR e DAVIS, 2001; NOORDMAN et al., 1999 apud NOORDMAN et al., 2003). Existem poucos artigos publicados que discutem os aspectos da engenharia de processo nesta aplicação.

NOORDMAN et al. (2003), utilizaram membranas tubulares de polisulfona para ultrafiltração, com o objetivo de concentrar extrato aquoso a partir de farinha de soja desengordurada. Tanto proteínas quanto partículas insolúveis foram concentradas. Verificou-se, também, que partículas sólidas têm um efeito positivo no fluxo permeado. Com isso uma maior concentração pode ser alcançada de extrato com partículas suspensas comparada com extrato livre de partículas. As partículas são capazes de limpar as membranas podendo ter um efeito positivo na reversibilidade do fouling.

KIM et al. (2003) investigaram, sob várias condições, a otimização da extração de oligossacarídeos de farinha de soja desengordurada utilizando processo de ultrafiltração, sendo verificado que são obtidas maiores concentrações de oligossacarídeos através da eliminação de proteínas do extrato de farinha de soja desengordurada removidos através do processo de ultrafiltração. O sistema de ultrafiltração mostrou-se eficaz no pré-tratamento antes da concentração e purificação do extrato de farinha de soja desengordurada.

No caso das isoflavonas da soja, o processo de separação com membranas foi utilizado no trabalho de XU et al. (2004), o qual teve como objetivo recuperar as isoflavonas da água de descarte do processamento de extrato hidrossolúvel de soja. Uma combinação de diafiltração com ultrafiltração foi utilizada para separar as isoflavonas das proteínas e outros

componentes. Foi utilizado inicialmente diafiltração do extrato desengordurado, em seguida o permeado foi ultrafiltrado e, logo após, concentrado o permeado da ultrafiltração por osmose inversa. Como resultado foi obtido um rendimento de aproximadamente 50 % da quantidade total de isoflavonas, que poderia ser desidratada e adicionada em produtos à base de isoflavonas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Soja

Nos experimentos foi utilizado o cultivar de soja IAC-18, produzido na região de Erechin, RS, na safra de 2003 e gentilmente cedido pela EMBRAPA-SOJA (Londrina- PR).

4.1.2 Reagentes

Os reagentes utilizados na preparação dos tampões foram:

- Ácido cítrico monohidratado - Synth PM:210,14
Fosfato de sódio
Caal PM:137,99
- Carbonato de sódio - Caal PM:105,99
- ρ -nitrofenil (ρ -NPG) - Sigma
- Padrão albumina de soro bovino (BSA) - Sigma
- Hidróxido de sódio – Dinâmica
- Sulfato de cobre pentahidratado - Mallinckrodt PM:249,68
- Tartarato de sódio - Synth PM:230,08
- Reativo Folin-Ciocalteu - Dinâmica

- Etanol - Mallinckrodt
- Ácido acético - Nuclear
- Hexano – Nuclear

4.1.3 Membranas Comerciais

Membranas comerciais de nanofiltração (FILMTEC™ NF90-400) foram preparadas a partir de poliamida e acetato celulósico e (FILMTEC™ NF) a partir de polipiperazina. As membranas de nanofiltração possuem ponto de corte de 200 a 600 g/mol. A membrana de ultrafiltração foi preparada no LABSEM (Laboratório de Processos de Separação com Membranas), a partir de PVDF com ponto de corte da ordem de 40.000 g/mol (retenção de 90 % de BSA). A membrana de osmose inversa (FILMTEC™) foi preparada a partir de poliamida com rejeição de 99% a NaCl.

4.1.4 Equipamentos e Dispositivos Utilizados nos Experimentos

4.1.4.1 Célula de Filtração

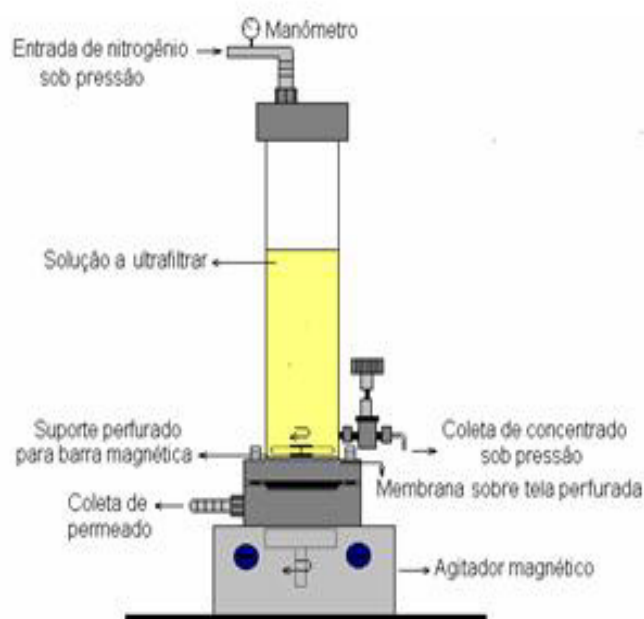


Figura 05 – Desenho esquemático da célula de filtração utilizada nos experimentos

4.1.4.2 Equipamentos Utilizados nos Experimentos

- Banho termostático - Nova Técnica modelo Banho Dubnoff
- Cilindro de nitrogênio – White Martins
- Moinho - Toastmaster
- Estufa de ar ventilada - Fanem modelo 320-SE
- Balança analítica – Scientech modelo SA 210

- Forno industrial - Dako
- Forno mufla – EDG equipamentos modelo FI -15
- Liquidificador – Arno
- Batedeira planetária – Arno
- pHmetro – Digimed modelo DM 20
- Peneiras – Bertel modelo USS 35 - ABERT.EM mm 0,50-Tyler 32
- Espectrofotômetro – Cecil modelo 3000 Series
- Cromatógrafo – Waters
- Câmara fria - T ($\pm 20^{\circ}\text{C}$)
- Centrífuga - Centrifuge 5417R

4.2 Métodos

4.2.1 Tratamento Hidrotérmico

Baseando-se no trabalho desenvolvido por GÓES-FAVONI (2002), porém testando outras condições de tratamento, grãos de soja inteiros e farinha de soja foram submetidos a tratamento hidrotérmico por 15 horas a 50°C em diferentes pH: 3,5, 4,5, 5,5, 6,0, 6,5 e 7,5, no intuito de verificar a influência do pH na formação de agliconas. Esta temperatura é considerada

ideal para a atividade da enzima β -glicosidase, que é responsável pela conversão dos glicosídeos em agliconas.

Para cada pH, utilizaram-se 100 gramas de soja e 300 mL de tampão, tanto para o grão inteiro como para a farinha, que foram mantidos em banho-maria na temperatura e tempo de processo. Após o tratamento hidrotérmico, as amostras foram transferidas para uma estufa com circulação de ar à temperatura de 45 °C por 24 horas. O fluxograma de processo de obtenção da farinha hidratada pode ser observado na figura 06.

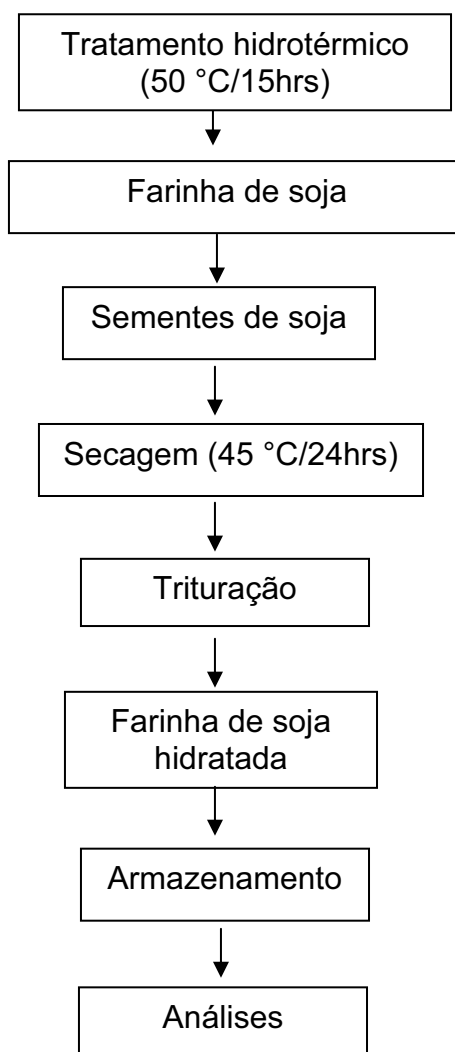


Figura 06 - Fluxograma para obtenção da farinha de soja hidratada

4.2.2 Determinação do Teor de Isoflavonas

O teor de isoflavonas foi determinado conforme procedimento descrito por KUDOU et al. (1991) e KITAMURA et al. (1991). Utilizou-se uma coluna de fase reversa (YMC- Pack ODS- AM, diâmetro 250x 4,6 mm, S-5 μ m, 120A) no módulo de separação Waters 2690, com injetor automático de amostras. A eluição de cada amostra foi realizada por 40 minutos sendo a fase móvel formada por um gradiente de acetonitrila com 0,1 % de ácido (solvente A) e água com 0,1 % de ácido acético (solvente B). Para detecção das isoflavonas foi utilizado detector de Arranjo de Diiodo Waters 996, ajustado para comprimento de onda de 260 nm.

A solução padrão utilizada na análise foi formada pela mistura dos padrões de daidzina, daidzeína, genistina e genisteína (®Fujicco). Esta solução foi preparada com etanol 70 % contendo 0,1 % de ácido acético e 0,0125 mg/mL de cada padrão. As formas malonil são estimadas através de cálculo disponíveis no próprio software do equipamento.

As análises para pesquisa de isoflavonas foram determinadas para: a- farinha e grãos inteiros hidratados em diferentes pH (3,5; 4,5; 5,5; 6,0; 6,5; 7,5); b- na farinha hidratada com e sem a presença de inibidor glucona- δ -lactona; c- após tratamento térmico de bolos e biscoitos d- na torrefação de farinha de soja hidratada em pH 6,0 (determinou-se este pH de hidratação da farinha de soja devido ao maior teor de agliconas formado) e no permeado da nanofiltração e osmose inversa. Todas as amostras foram desengorduradas antes das análises para determinação do teor de isoflavonas.

4.2.3 Unidade De Atividade Específica (UAE) Da Enzima β -Glicosidase

Para obtenção do valor da unidade de atividade específica (UAE) previamente determinou-se a unidade de atividade enzimática e o teor de proteínas solúveis das amostras, para posterior cálculo realizado através da Equação 01.

$$\text{UAE} = \text{UA/mg de proteínas}$$

Equação 01

4.2.3.1 Unidade de Atividade Enzimática (UA)

Para a determinação da atividade da enzima β -glicosidase, utilizou-se a metodologia de MATSUURA & OBATA (1993). Esta técnica baseia-se na medição da absorvância do para-nitrofenol (p -NP) liberado pela ação da enzima a partir do para-nitrofenil β -D-glicopiranosídeo.

Inicialmente, extraiu-se a enzima com tampão citrato 0,05M (pH 4,5) contendo NaCl 0,1 M. A extração da enzima foi realizada por 1 hora a temperatura ambiente. Como substrato da enzima β -glicosidase utilizou-se (p -NPG) em tampão fosfato-citrato 0,1 M (pH 5,0).

Utilizaram-se 2 mL do substrato após incubação em banho-maria por 10 minutos a 30 °C. Acrescentou-se 0,5 mL da enzima extraída e mantida em banho-maria a 30 °C por 30 minutos. Após, a reação foi interrompida adicionando 2,5 mL de carbonato de sódio 0,5 M. Imediatamente fez-se a leitura espectrofotométrica à 420 nm. A curva de calibração foi preparada a partir do p -NPG em concentrações de 5 a 300 μ M.

As concentrações da enzima em cada amostra foram expressas em μM . Após graficar os dados, determinou-se a atividade enzimática a partir da equação da reta, substituindo o valor de y pelo valor da absorbância da amostra.

4.2.3.2 Proteínas Solúveis

O teor de proteínas solúveis foi determinado pelo método de Lowry et al. (1951). Inicialmente, extraiu-se a enzima e, em seguida, adicionaram-se 5 mL da mistura reativa (Reativo A– Carbonato de Sódio 2 % e Hidróxido de Sódio 0,4 %, Reativo B- Sulfato de Cobre pentahidratado 2 % e Reativo C- Tartarato de Sódio 4 %). Todos os reativos foram preparados em água destilada. Após a adição da mistura deixou-se em repouso por 10 minutos e em seguida adicionou-se 0,6 mL de reativo Folin-Ciocalteu, deixando em repouso por 30 minutos e fazendo a leitura espectrofotométrica a 660 nm.

A curva de calibração foi feita a partir de Padrão albumina de soro bovino (BSA), água destilada, Mistura Reativa e Folin-Ciocalteu.

4.2.4 Determinação Da UA E UAE Da Enzima β -Glicosidase Nos Experimentos

A Unidade de Atividade Enzimática (UA) é definida como a quantidade de enzima que libera 1 umol de substrato por minuto. A Unidade de Atividade Específica (UAE) é definida como a quantidade de atividade enzimática por miligrama de proteína ($\text{UAE}=\text{UA}/\text{mg}$).

Determinou-se a unidade de atividade enzimática (UA) e a unidade de atividade específica (UAE) nas amostras de farinha de soja obtida de grãos de soja triturados hidratados em tampão citrato-fosfato nos pH: 3,5; 4,5; 5,5; 6,0; 6,5; 7,5.

A ação da enzima β -glicosidase na presença ou ausência de inibidor glucona- δ -lactona foi verificada na farinha de soja hidratada em pH 6,0. Este inibidor foi selecionado por ser considerado o mais potente inibidor da enzima β -glicosidase (TAKAHASHI e MATSUMOTO, 1963).

No primeiro experimento, sem adição de inibidor, utilizaram-se 100 gramas de farinha de soja com 300 mL de tampão citrato-fosfato em pH 6,0 que foram mantidos em banho-maria a 50 °C e retiradas amostras, de aproximadamente 12 gramas, nos intervalos de tempo de 15, 30, 120, 240, 480, 720 minutos. As amostras foram levadas à estufa de ar à 45 °C por 24 horas.

No segundo experimento, utilizou-se o mesmo procedimento, adicionando-se na amostra 100 mg do inibidor glucona- δ -lactona antes do tratamento hidrotérmico e retirando as amostras nos mesmos intervalos de tempo do experimento sem inibidor. Determinaram-se a unidade de atividade enzimática (UA) e o teor de proteínas solúveis, para cálculo da unidade de atividade específica (UAE) das amostras nos dois experimentos.

Após determinação da ação da enzima β -glicosidase na presença e ausência de inibidor glucona- δ -lactona, utilizaram-se 20 gramas de farinha hidratada com 60 mL de tampão 6,0, adicionando-se maiores quantidades de inibidor para cada experimento: 100, 400, 1600, 2800 mg. As

amostras foram mantidas em banho-maria a 50 °C nos seguintes intervalos de tempo: 120, 240, 480 e 720 minutos. Em seguida, foram levados à estufa de circulação de ar a 45 °C por 24 horas e trituradas.

Em todos os experimentos citados foram determinados a unidade de atividade enzimática (UA) e o teor de proteínas solúveis para cálculo da unidade de atividade específica (UAE).

4.2.5 Estabilidade Térmica De Isoflavonas Em Produtos Alimentícios.

Decidiu-se por utilizar nos experimentos farinha de soja hidratada com maior teor de agliconas, obtida em pH 6,0. Serão empregadas na determinação da estabilidade dos produtos: bolo (assado a temperaturas de 175 e 210 °C) e biscoitos (assados a temperatura de 150 °C).

Os ovos, o óleo, o suco de laranja e o açúcar foram homogeneizados em liquidificador por 3 minutos em velocidade média. Logo após a mistura, a massa foi colocada num recipiente e adicionada de farinha de trigo e farinha de soja previamente peneiradas e misturadas com auxílio de uma espátula. Adicionou-se o fermento e prosseguiu-se com a mistura até completa homogeneização da massa. Em seguida, foi acondicionada em forma e levada ao forno pré-aquecido por 15 minutos a 180 °C e assada por 35 minutos (MANDARINO et al., 2003). A formulação do processo de preparo do bolo com farinha de soja hidratada pode ser vista na Tabela 05.

TABELA 05 – Formulação de bolo com farinha de soja hidratada

Bolo de laranja com farinha de soja hidratada		
Ingredientes	g	%
Farinha de trigo	300	22,14
Farinha de soja hidratada	140	10,33
Açúcar refinado	420	31,00
Suco de laranja	225	16,60
Óleo de soja	105	7,75
Ovos	150	11,07
Fermento biológico	15	1,11
Total	1.355	100

Fonte: MANDARINO et al. (2003)

Para o preparo do biscoito foram adicionados aos ingredientes, farinha de soja hidratada com maior teor de agliconas (pH 6,0). Para análise do teor de isoflavonas, foram utilizadas amostras do biscoito cru e assados à temperatura de 150°C.

Na batedeira foram adicionados os ingredientes (ovos, açúcar e margarina), seguidos de farinha de soja hidratada, o polvilho e o coco ralado e misturados até homogeneização. A massa foi aberta sobre uma superfície lisa e cortada com o auxílio de um molde circular. As peças foram dispostas sobre uma assadeira e levadas ao forno à temperatura de 150°C por 10 minutos

(MANDARINO et al., 2003). A formulação utilizada para a preparação do biscoito é mostrada na Tabela 06.

TABELA 06 - Formulação de biscoito com farinha de soja hidratada

Biscoito com farinha de soja hidratada		
Ingredientes	g	%
Polvilho doce	395	33,33
Farinha de soja hidratada	190	16,03
Açúcar refinado	295	24,89
Coco ralado	100	8,43
Margarina	100	8,43
Ovos	105	8,86
Total	1185	100

Fonte: MANDARINO et al. (2003)

4.2.6 Estabilidade Térmica De Isoflavonas Em Farinha De Soja Hidratada

Foram determinadas também as alterações sofridas pelas isoflavonas em farinha de soja hidratada submetida a torrefação. Utilizaram-se 135 gramas de farinha de soja com maior teor de agliconas (pH 6,0), sendo distribuídas em amostras de 15 gramas para cada intervalo de tempo e temperatura. As temperaturas testadas foram de 140 e 180 °C e tempos de 10, 30 e 50 minutos. As temperaturas e tempos de processo foram escolhidos aleatoriamente.

No aquecimento a 140 °C as amostras foram mantidas em estufa durante os intervalos de tempo de 10, 30 e 50 minutos. Para as temperaturas de 180 °C o experimento foi realizado em forno mufla nos mesmos intervalos de tempo citados para a temperatura de 140 °C. Após os tratamentos térmicos as amostras sofreram choque térmico em banho de gelo. A farinha de soja hidratada submetida a torrefação foi desengordurada para posterior análise de determinação do teor de isoflavonas.

4.2.7 Concentração De Isoflavonas Utilizando Processo De Separação Com Membranas

As filtrações com membranas foram realizadas com extrato etanólico obtido a partir da farinha de soja hidratada conforme mostrado na Figura 07.

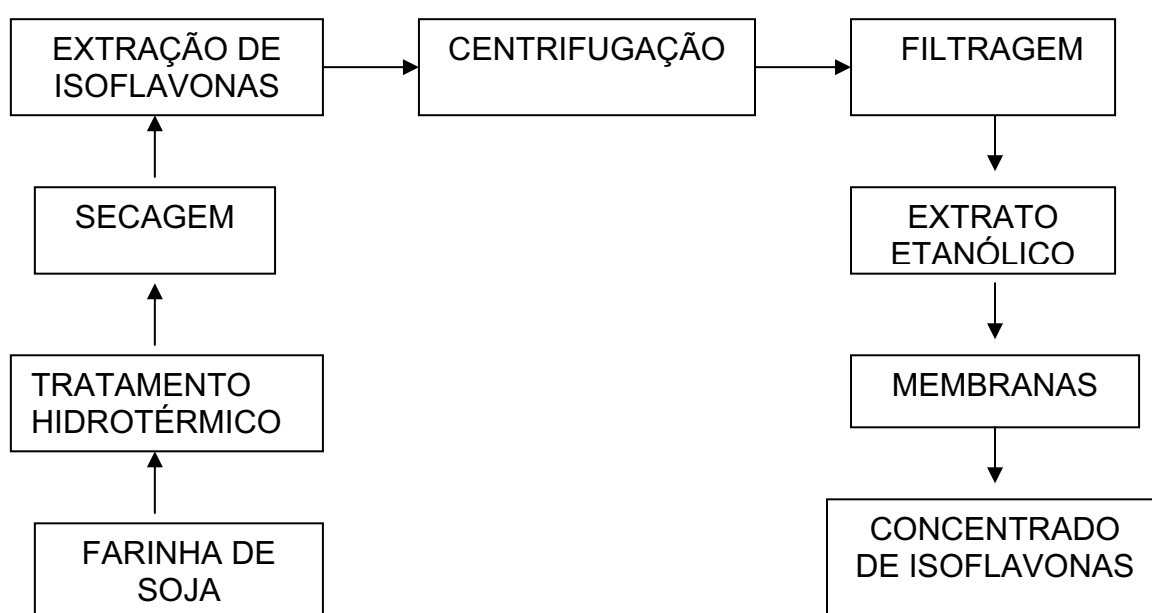


Figura 07 - Fluxograma do processo de obtenção de extrato etanólico utilizado para a concentração com membranas

A clarificação e concentração das isoflavonas do extrato etanólico, obtido a partir de farinha de soja hidratada em pH 6,0, considerada com maior teor de agliconas, foram realizadas por ultrafiltração, nanofiltração e osmose inversa. Foram utilizados três tipos diferentes de membranas de nanofiltração, NF-UFSC, NF e NF-90 e um tipo de membrana de ultrafiltração e osmose inversa, diferindo o ponto de corte da membrana.

O extrato foi obtido a partir de 250 g de farinha de soja hidratada em pH 6,0 adicionado de 1000 mL da mistura (70 % etanol + 0,01 % de ácido acético). Após agitação, a solução permaneceu em repouso por aproximadamente 15 horas. O sobrenadante, com volume aproximado de 900 mL foi utilizado para a concentração com membranas.

4.2.7.1 Ensaio de Ultrafiltração

Foram ultrafiltrados 100 mL de extrato etanólico, contendo as isoflavonas, obtidas a partir da farinha de soja hidratada. A membrana utilizada foi preparada no LABSEM (Laboratório de Processos de Separação com Membranas), a partir de PVDF com ponto de corte da ordem de 40.000 g/mol (retenção de 90 % de BSA). A ultrafiltração foi conduzida à pressão de 1 bar e temperatura ambiente (20 – 22°C). O permeado da ultrafiltração foi reservado para posterior nanofiltração.

4.2.7.2 Ensaio de Nanofiltração

Foram nanofiltrados 40 mL do permeado obtido da ultrafiltração. Este permeado foi somente nanofiltrado na membrana NF-UFSC. A nanofiltração foi conduzida à pressão de 5 (\pm 0,5) bar e temperatura ambiente (20 – 22 °C).

Um volume de 40 mL do extrato etanólico bruto, não ultrafiltrado, foi nanofiltrado utilizando-se a membrana NF, de material polipiperazina com ponto de corte de 200 a 600 g/mol. A nanofiltração foi conduzida à pressão inicial de 5 bar e elevada para 6 bar ao final do processo, à temperatura ambiente (20 – 22 °C).

Finalmente um volume de 20 mL de extrato etanólico bruto, não ultrafiltrado, foi nanofiltrado utilizando-se a membrana NF-90 obtida a partir de poliamida e acetato celulósico com ponto de corte de 200 a 600 g/mol. A nanofiltração foi conduzida à pressão de 7 bar e à temperatura ambiente (20 – 22 °C).

4.2.7.3 Ensaio de Osmose Inversa

Foi testada apenas uma membrana no processo de osmose inversa obtida a partir de poliamida, com rejeição a NaCl de 99 %. O volume utilizado para a filtração foi de 20 mL de extrato bruto etanólico. O processo foi conduzido à pressão de 7 bar e à temperatura ambiente (20 – 22 °C).

As amostras brutas, bem como os retentados da nanofiltração e osmose inversa foram analisados para determinação do teor de isoflavonas.

4.3 Análises Estatísticas

Os experimentos com membranas foram realizados no LABSEM e os demais na EMBRAPA-SOJA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) em Londrina-PR.

Realizou-se uma análise exploratória dos dados de todos os experimentos, a fim de avaliar a qualidade dos dados, do ponto de vista do delineamento adotado em cada caso. Foram realizadas análises de variância (ANAVA) assim como a análise da distribuição de seus resíduos, através do método gráfico e pelo teste de Shapiro & Wilk (1965) para verificar, respectivamente, sua aleatoriedade e a normalidade de sua distribuição. Os testes de Burr & Foster (1972) e Tukey (1949) foram usados para testar a homogeneidade das variâncias dos tratamentos e a aditividade dos efeitos de cada modelo, respectivamente.

4.3.1 Teor de isoflavonas

Diferentes pH de tratamento hidrotérmico.

Este experimento foi conduzido e analisado seguindo-se o esquema fatorial, com fatores: grão inteiro e farinha, pH (3,5; 4,5; 5,5; 6,0; 6,5; 7,5), num delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. Quando a ANAVA indicou interação entre os efeitos tipo de preparo de grão e pH, o desdobramento da interação foi realizado e a curva de regressão entre pH e isoflavonas foram obtidos em cada nível do fator (grão inteiro e farinha), isto é,

foi construída uma curva de regressão para o pH e os teores de isoflavonas medida no grão inteiro e farinha. Para cada modelo de regressão apresentou-se o respectivo coeficiente de determinação (R^2), que é um indicador da qualidade do modelo. A interpretação do R^2 permite saber qual o percentual da variação no pH. Em situações onde todos os fatores que interferem nas quantidades de isoflavonas fossem devidamente controlados e o modelo escolhido é o mais adequado, espera-se valores de R^2 próximos de 100%. Contudo, pode ocorrer que R^2 não seja muito elevado, mesmo o modelo estando adequado, visto que é difícil controlar todas as interferências externas e além disto poderia haver outros fatores que atuaram nas quantidades encontradas e que não foram considerados.

Farinha hidratada com e sem a presença de inibidor glucona- δ -lactona

Para análise deste experimento utilizou-se esquema fatorial com os fatores: inibidor (com e sem) e tempo (0, 120, 240, 720 e 960 min) num delineamento inteiramente casualizado com três repetições. O teste de análise de variância indicou interação entre os efeitos (inibidor e tempo). Com isto, realizou-se o desdobramento desta interação e a curva de regressão para tempo e teor de agliconas foram obtidos para com e sem inibidor. Foi construída uma curva de regressão para o tempo e os teores de agliconans medido nas condições (com e sem) inibidor.

Tratamento térmico de bolos e biscoitos

Para analisar este experimento utilizou-se experimento em blocos casualizados com duas repetições. O teste de contraste indicou que não há diferenças significativas entre os efeitos bolos e biscoitos em todas as condições testadas.

4.3.2 Unidade de Atividade Específica (UAE)

Diferentes pH de tratamento hidrotérmico

A análise estatística da UAE em diferentes pH de hidratação foi conduzida num delineamento inteiramente casualizado, com duas repetições. A ANAVA determinou interação entre os pH. O desdobramento da interação foi realizado e a curva de regressão foi obtida em cada nível do fator pH, isto é, foi construída uma curva de regressão para o pH e a UAE medida na farinha submetida a tratamento hidrotérmico.

Farinha de soja submetida a tratamento hidrotérmico em diferentes intervalos de tempo com e sem a presença de inibidor glucona- δ -lactona.

Para a análise estatística da UAE da enzima β -glicosidase na presença ou ausência de inibidor glucona- δ -lactona utilizou-se um esquema fatorial com os fatores: inibidor e tempo num delineamento inteiramente casualizado com três repetições. A ANAVA determinou que não houve interação entre inibidor e tempo.

Farinha de soja submetida a tratamento hidrotérmico em diferentes concentrações de inibidor glucona- δ -lactona.

Para a análise estatística neste experimento utilizou-se esquema fatorial com os fatores: concentrações de inibidor e tempo num delineamento inteiramente casualizado com duas repetições. A ANAVA indicou interação entre os efeitos concentração de inibidor e tempo. O desdobramento da interação foi realizado e a curva de regressão entre concentração de inibidor e UAE foram obtidos em cada nível do fator (concentração de inibidor e tempo), isto é, foi construída uma curva de regressão para concentrações de inibidor e tempo medida na farinha submetida a tratamento hidrotérmico.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Tratamento Hidrotérmico em Grãos de Soja Inteiros e Farinha de Soja em Diferentes pH.

Observa-se na Tabela 07, os teores dos conjugados malonil, glicosídeos e aglicona, tanto nos grãos inteiros, como na farinha, sofreram alterações em relação ao grão cru para todos os pH de tratamento. O teor dos conjugados malonil diminuiu após o tratamento hidrotérmico, tanto nos grãos inteiros como na farinha de soja. Segundo LI-JUN et al. (2004), MATSUURA e OBATA (1989) as formas malonil são termicamente instáveis e pela ação do calor podem dar origem às formas glicosídicas. Os conjugados glicosídeos também sofreram redução após o tratamento hidrotérmico em todos os pH testados.

Conforme ARAÚJO et al., (1997), a enzima β -glicosidase, sob condições ideais, pode atuar sobre os glicosídeos, hidrolizando-os e dando origem às respectivas formas agliconas. A atividade ótima da enzima β -glicosidase capaz de hidrolisar glicosídeos em agliconas está entre os pH de 4,3 e 7,0 e temperatura de 45 °C (MATSUURA et al., 1993).

Após tratamento hidrotérmico a 50 °C por 15 horas verificou-se aumento no teor das agliconas em todos os pH, através da ação da enzima β -glicosidase na hidrólise de glicosídeos em agliconas. O maior teor de agliconas para o grão inteiro após tratamento hidrotérmico foi observado no pH 6,0,

aumentando de 1,15 mg/100g no grão cru para 40,47 mg/100g nos grãos inteiros hidratados. Em relação à farinha de soja, o teor de agliconas foi muito próximo nos pH 6,0 e 7,5, aumentando de 1,5 mg/100g para 52,60 mg/100 na farinha hidratada, no pH 6,0 e de 1,5 mg/100g para 53,06 mg/100g na farinha hidratada no pH 7,5 (Tabela 07).

TABELA 07 – Teor médio e desvio padrão de isoflavonas (mg/100g) em grãos de soja inteiros e farinha de soja hidratados a 50 °C por 15 horas em diferentes pH.

pH	Grão inteiro ¹				Farinha de soja ¹			
	Malonil	Glicosídeos	Aglicona	Total	Malonil	Glicosídeos	Aglicona	Total
3,5	42,75 ±2,31	11,96 ±0,81	30,42 ±1,73	85,13 ±4,65	47,99 ±2,19	16,13 ±3,36	30,86 ±0,53	94,98 ±1,17
4,5	33,79 ±2,80	10,18 ±0,93	34,01 ±0,1	77,98 ±6,37	41,47 ±0,46	12,77 ±0,39	36,21 ±0,48	90,45 ±1,29
5,5	31,44 ±4,0	9,46 ±0,35	35,09 ±4,0	76,00 ±5,98	40,53 ±2,06	17,91 ±0,76	45,92 ±1,21	104,46 ±4,07
6,0	23,75 ±1,05	21,04 ±0,78	40,47 ±1,67	85,26 ±3,50	44,40 ±2,53	23,69 ±2,03	52,60 ±1,93	120,69 ±6,64
6,5	39,39 ±1,40	18,49 ±1,59	38,05 ±1,78	95,93 ±1,90	32,06 ±1,84	19,72 ±0,96	49,08 ±1,61	101,49 ±4,03
7,5	35,91 ±0,57	18,31 ±2,04	34,48 ±1,04	88,7 ±1,57	34,04 ±1,71	24,16 ±3,99	53,06 ±1,21	111,26 ±6,45
Grão cru	62,62 ±5,04	41,47 ±2,97	1,15 ±0,04	105,24 ±7,68				

¹ Média de três repetições em base úmida

* C.V: Malonil = 5,72%, Glicosídeo = 7,02%, Aglicona = 4,04%

As análises de variância de malonil, glicosídeo e aglicona indicaram interação altamente significativa entre tipo de preparo do grão (inteiro ou farinha de soja) e pH ($p < 0,01$). As curvas de regressão de cada forma de isoflavona em função do pH foram construídas conforme a Tabela 08.

TABELA 08 – Modelo estatístico para análise de teor de isoflavonas (malonil, glicosídeos e agliconas) em função do grão inteiro e farinha.

Isoflavona	Modelo					
	Grão inteiro	p	R ² (%)	Farinha	p	R ² (%)
Malonil	Quadrático	0,00001	0,5033	Linear	0,00001	0,6570
Glicosídeo	Linear	0,00001	0,4629	Linear	0,00001	0,4632
Aglicona	Quadrático	0,00008	0,7601	Linear	0,00001	0,8865

Verificaram-se maiores formações de daidzeína e genisteína através da ação enzima β -glicosidase para o grão inteiro no pH 6,0 e farinha nos pH 6,0 e 7,5. O teor de genisteína no pH 6,0 aumentou de 0,42 nos grãos de soja cru para 17,57 mg/100g nos grãos de soja hidratados e de 0,42 para 24,89 mg/100g em farinha de soja hidratada. Dentre as agliconas, a genisteína é considerada a forma que apresenta maior atividade biológica (SETCHELL et al., 2001). Os teores de agliconas daidzeína, genisteína e gliciteína podem ser observados na Tabela 09.

TABELA 09 - Teor de agliconas em grãos de soja inteiro e farinha de soja submetidos a tratamento hidrotérmico a 50°C por 15 horas em diferentes pH.

pH	Grão de soja inteiro ¹				Farinha de soja ¹			
	Daidzeína	Genisteína	Gliciteína	Total	Daidzeína	Genisteína	Gliciteína	Total
Grão cru	0,73 ±0,01	0,42 ± 0,01	0	1,15 ±0,04				
3,5	13,40 ±0,77	13,61 ±0,77	3,40 ±0,22	30,42 ±1,73	13,67 ±0,22	15,08 ±0,19	2,09 ±0,12	30,86 ±0,53
4,5	15,19 ±1,20	14,71 ±1,08	4,10 ±0,36	34,01 ±0,1	16,04 ±0,20	17,68 ±0,24	2,48 ±0,03	36,21 ±0,48
5,5	15,76 ±0,86	15,37 ±0,93	3,95 ±0,35	35,09 ±4,0	20,68 ±0,54	22,25 ±0,59	2,80 ±0,27	45,92 ±1,21
6,0	19,20 ±0,78	17,57 ±0,58	3,36 ±0,50	40,47 ±1,67	24,27 ±0,93	24,89 ±0,23	3,43 ±0,10	52,60 ±1,93
6,5	17,69 ±0,52	16,54 ±0,58	3,81 ±0,68	38,05 ±1,78	23,24 ±0,09	23,46 ±0,74	3,00 ±0,09	49,08 ±1,61
7,5	16,12 ±0,11	15,36 ±0,30	3,00 ±0,63	34,48 ±1,04	24,82 ±0,55	25,53 ±0,53	2,70 ±0,12	53,06 ±1,21

¹ Média de três repetições em base úmida

* C.V : Daidzeína = 3,81%, Gliciteína = 10,35%, Genisteína = 3,66%

5.2 Determinação da Unidade de Atividade Enzimática (UA) e Unidade de Atividade Específica (UAE) da enzima β -glicosidase.

Para avaliar a ação da enzima β -glicosidase sobre as isoflavonas, determinou-se a UAE da enzima em farinha de soja submetida a tratamento hidrotérmico a 50 °C por 15 horas em diferentes pH.

As análises de variância de UAE indicaram interação altamente significativa entre tipo de preparo do grão (inteiro ou farinha de soja) e UAE ($p < 0,01$). As curvas de regressão de UAE em função do pH foram construídas conforme a Tabela 10.

TABELA 10 – Modelo estatístico para análise da UAE em farinha de soja hidratada.

UAE	Modelo		
	Farinha	p	R ² (%)
	Linear	0,00275	0,8359

A Tabela 11 demonstra os valores de UA e UAE da enzima β -glicosidase em relação aos pH de tratamento. Conforme verificou-se, a UAE foi maior nos pH 6,0 e 7,5 o que corresponde também ao maior teor de agliconas (Tabela 07). MATSUURA et al. (1989), verificaram a ação da enzima β -glicosidase através de experimento adicionando substrato específico para-

nitrofenol (P-NP) em diferentes pH e temperaturas. A ação da enzima foi medida através do para-nitrofenil (P-NPG) liberado na água de maceração. As melhores condições de ação da enzima β -glicosidase na hidrólise dos glicosídeos foram observadas em pH 6,0 e temperatura de 50 °C. Para melhor visualização, os dados da Tabela 11 relativos a UAE nos diferentes pH estão apresentados na Figura 08.

TABELA 11 – Unidade de Atividade enzimática (UA/100g) e Unidade de atividade específica (UA/mg) da enzima β -glucosidase e farinha de soja hidratada a 50°C/15 horas em diferentes pH.

pH	UA ¹	UAE ¹
3,5	159,17 ±0,41	5,02 ± 0,01
4,5	164,49 ±4,85	6,25 ± 0,33
5,5	160,88 ±1,99	7,72 ±1,54
6,0	158,74 ±2,36	8,36 ±0,35
6,5	159,97 ±1,54	7,61 ±1,12
7,5	162,22 ±1,78	8,46 ±0,95

¹ Média de duas repetições

* Diferença entre as médias significativas utilizando o método de regressão. C.V. 10,58 %

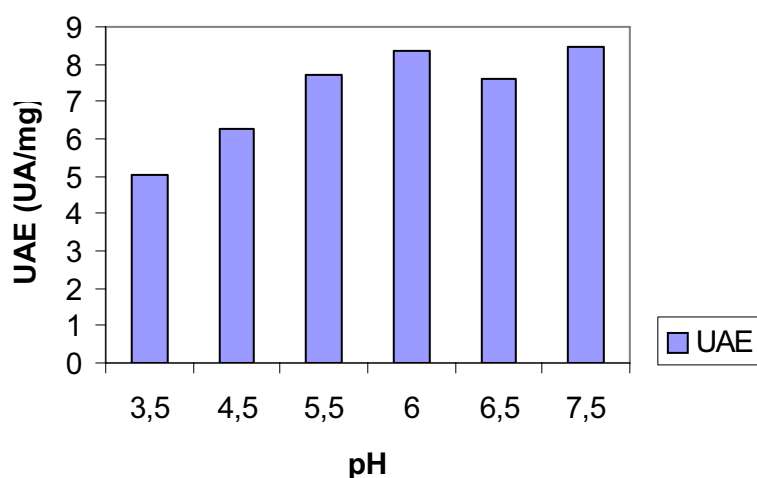


Figura 08 – Unidade de Atividade Específica (UAE) da enzima β -glucosidase em farinha de soja hidratada (50 °C/15h) em diferentes pH.

Para comprovação da ação da enzima β -glucosidase na hidrólise de glicosídeos em agliconas, foi realizado experimento com farinha de soja hidratada em pH 6,0 por tempos diferentes, na presença do inibidor competitivo glucona- δ -lactona, na concentração de 100 mg/100g de farinha de soja hidratada. A concentração do inibidor foi estabelecida em função de estudos realizados por ARAÚJO et al. (1997) e MATSUURA e OBATA (1993) que observaram que a glucona- δ -lactona foi o mais potente inibidor capaz de controlar a ação da enzima β -glucosidase. Após o tratamento, as amostras foram secas em estufa a 45 °C, e em seguida, a atividade da enzima β -glucosidase e o teor de isoflavonas foram determinados.

Como pode ser observado na Tabela 12, houve uma acentuada redução na UA da β -glucosidase em função do tempo e do inibidor glucona- δ -lactona. Esta redução da atividade ao longo do tempo de hidratação pode ter

ocorrido em função da passagem da enzima para a água de hidratação. Segundo GÓES-FAVONI et al., (2004) a β -glicosidase constitui uma enzima solúvel, que em condições ideais pode atuar sobre os glicosídeos transformando-os em agliconas e em paralelo sofrer lixiviação para a água de hidratação e inativação. Embora a água de hidratação não tenha sido descartada neste experimento, a enzima provavelmente foi inativada ainda durante o tratamento hidrotérmico e início da etapa de secagem da farinha hidratada.

Verificou-se na Tabela 12 uma maior UA até o tempo de 120 minutos para o tratamento sem inibidor em relação ao tratamento com inibidor. Com 240 minutos, a UA nos dois tratamentos praticamente se manteve constante. Esse resultado já era esperado, pois se presume que com a adição da glucona- δ -lactona, ocorra uma diminuição na atividade da enzima β -glicosidase, porém verificou-se a maior ação do inibidor até o tempo de 240 minutos, após, as duas atividades da enzima, tanto para as amostras com inibidor quanto para as amostra sem inibidor praticamente se igualam.

TABELA 12 - Unidade de atividade enzimática (UA/100g) em farinha e soja hidratada com e sem adição de glucona- δ -lactona em diferentes intervalos de tempo.

Tempo	UA	
	Sem inibidor	Com inibidor
0	297,21	234,36
15	318,5	255,14
30	288,51	232,07
120	185,39	187,09
240	171,99	175,27
480	157,29	160,25
720	156,0	152,96

¹ Média de duas repetições

* Diferença entre as médias significativas utilizando o método de regressão. C.V. 7,75%

Pelo método estatístico de análise de regressão, verificaram-se diferenças significativas entre as UA nas amostras com e sem inibidor, além da UA estar fortemente relacionada com o tempo ($p < 0,05$). As análises de variância de UA indicaram interação altamente significativa entre inibidor (com e sem) e UA ($p < 0,01$). As curvas de regressão de UA em função do inibidor construídas conforme a Tabela 13.

TABELA 13 – Modelo estatístico para análise da UA em função do inibidor (com e sem).

UA	Modelo					
	Com inibidor	p	R ² (%)	Sem inibidor	p	R ² (%)
	Quadrática	0,02679	0,2073	Quadrática	0,02147	0,1331

Uma melhor visualização da redução na taxa de UA com e sem o inibidor glucona- δ -lactona, pode ser vista na Figura 09.

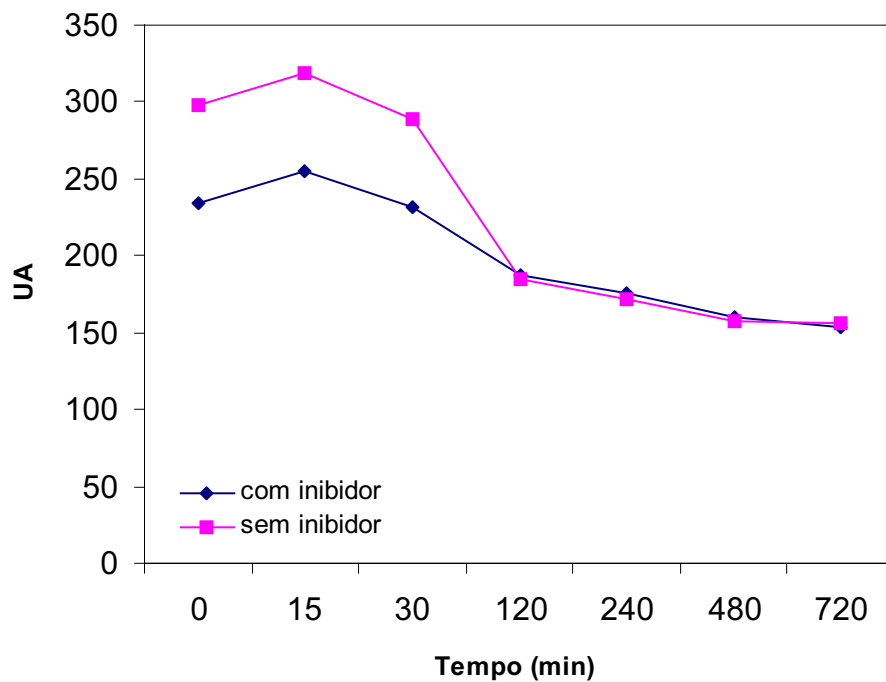


Figura 09 – Unidade da Atividade enzimática (UA/100g) em farinha de soja hidratada em diferentes tempos com e sem inibidor glucona- δ -lactona.

Pode-se dizer que a atividade da enzima β -glicosidase está diretamente ligada ao aumento no teor de agliconas durante o tratamento hidrotérmico. Utilizando-se as mesmas amostras do experimento anterior, determinou-se o teor de agliconas em relação à inibição da enzima β -glicosidase, com e sem inibidor glucona- δ -lactona.

Na Tabela 14 observa-se que o teor de agliconas nas amostras sem glucona- δ -lactona foi maior do que aquele encontrado quando se utilizou o inibidor, para todos os tempos de tratamento hidrotérmico. Nas amostras sem glucona- δ -lactona o teor de agliconas, após 960 minutos, foi 55,7 % superior ao teor de agliconas quando se utilizou o inibidor no tratamento hidrotérmico. Valores semelhantes foram encontrados por ARAÚJO et al., (1997) utilizando grãos inteiros de soja de duas variedades diferentes (Paraná e UFV-5) e o mesmo inibidor e concentração utilizada nesse estudo. O experimento realizado por ARAÚJO et al. (1997) foi dividido em três tratamentos: soja com adição de água, soja com adição de água e inibidor e soja sem adição de água e inibidor sendo macerados por 12 horas. Com a adição de glucona- δ -lactona, verificou-se uma redução de isoflavonas agliconas de 33 e 23 % para as cultivares Paraná e UFV-5, respectivamente.

No presente trabalho, verificou-se que os teores de daidzeína e genisteína nas amostras com inibidor foram de 53,5 e 57,3 %, respectivamente, superiores aos encontrados no experimento sem glucona- δ -lactona. Os valores encontrados por ARAÚJO et al., (1997), para essas mesmas agliconas foram diferentes dos valores encontrados neste trabalho. Atribui-se estas diferenças

as variedades de soja utilizados nos experimentos, além da variação nas condições de processo.

TABELA 14 - Teor de agliconas (mg/100g) em farinha de soja com e sem inibidor em função do tempo.

Tempo (min)	Sem inibidor ¹				Com inibidor ²			
	Daidzeína	Genisteína	Gliciteína	Total	Daidzeína	Genisteína	Gliciteína	Total
0	12,75 ±0,20	10,92 ±0,42	2,03 ±0,03	25,70 ±0,62	10,10 ±1,77	9,24 ±1,68	1,62 ±0,49	20,96 ±3,94
120	11,10 ±0,57	10,05 ±0,62	1,74 ±0,13	22,89 ±1,30	10,50 ±0,74	10,15 ±0,87	1,85 ±0,11	22,55 ±1,72
240	11,04 ±1,02	10,28 ±1,04	1,91 ±0,16	23,23 ±2,23	10,27 ±2,10	9,51 ±1,71	1,83 ±0,22	21,62 ±4,05
720	16,16 ±0,39	14,00 ±0,47	1,98 ±0,18	32,14 ±0,70	15,69 ±2,20	14,42 ±2,08	1,97 ±0,28	32,08 ±4,55
960	25,11 ±1,13	24,14 ±0,85	5,02 ±0,23	54,27 ±2,21	18,65 ±4,15	17,47 ±3,91	3,50 ±0,81	39,62 ±8,88

¹ Média de três repetições em base úmida

² Média de duas repetições em base úmida

*Diferença entre as médias significativas utilizando o método de regressão. C.V = 14,05 %

Utilizou-se a análise de regressão para realização da análise estatística dos resultados do teor de agliconas, na presença ou ausência de inibidor glucona- δ -lactona em diferentes tempos de tratamento hidrotérmico. As análises de variância do teor de agliconas indicaram interação altamente significativa entre inibidor (com e sem) e agliconas ($p < 0,01$). As curvas de

regressão do teor de agliconas em função do inibidor (com e sem) foram construídas conforme a Tabela 15.

TABELA 15 – Modelo estatístico para análise de agliconas em função do inibidor (com e sem).

Agliconas	Modelo					
	Com inibidor	p	R ² (%)	Sem inibidor	p	R ² (%)
	Linear	0,00001	0,9031	Linear	0,00001	0,7419

Verificou-se ainda, em relação à ação do inibidor sobre a enzima β -glicosidase, se o aumento das concentrações de glucona- δ -lactona, poderia influenciar a atividade da enzima em função do tempo de tratamento hidrotérmico. Observa-se pela Tabela 16, que os valores da UAE foram mais influenciados pelo tempo de contato com o inibidor do que com a sua concentração, pelo menos nas concentrações de inibidor utilizadas. A UAE nas concentrações de inibidor de 100 mg e 2800 mg foram muito próximas nos tempos de 240 e 480 minutos. A maior inibição da UAE observada foi da ordem de 38 %.

TABELA 16 - UAE (UA/mg) em farinha de soja hidratada com diferentes concentrações de inibidor glucona- δ -lactona em diferentes intervalos de tempo.

UAE			
Tempos (min)	Concentrações de inibidor (mg)		
	100	400	2800
0	15,05 $\pm 0,17$	13,34 $\pm 0,21$	12,22 $\pm 0,29$
120	12,983 $\pm 1,89$	12,33 $\pm 0,10$	10,190 $\pm 0,11$
240	9,45 $\pm 0,01$	10,92 $\pm 0,22$	9,97 $\pm 0,04$
480	9,68 $\pm 0,03$	10,10 $\pm 0,33$	9,85 $\pm 0,32$

¹ Média de duas repetições

* Não há diferença entre as médias significativas utilizando o método de regressão C.V. 5,19 %

As análises de variância da UAE indicaram interação altamente significativa entre os tempos (0 e 480 min) e concentração de inibidor ($p < 0,01$) e interação não significativa nos tempos (120 e 240 min). As curvas de regressão da concentração do inibidor em função do tempo e do tempo em função da concentração do inibidor foram construídas conforme as Tabelas 17 e 18.

TABELA 17 – Modelo estatístico para análise do tempo em função do inibidor.

Tempo (min)	Modelo		
	Inibidor	p	R ² (%)
0	Quadratica	0,00001	0,8248
120	Quadratica	0,02051	0,5356
240	Quadratica	0,11518	0,2463
480	Linear	0,00001	0,9056

TABELA 18 - Modelo estatístico para análise de diferentes concentrações de inibidor em função do tempo.

Inibidor (mg)	Modelo		
	Tempo	p	R ² (%)
100	Quadratica	0,00001	0,6985
400	Linear	0,00003	0,6531
2800	Linear	0,00001	0,4599

5.3 Estabilidade Térmica das Isoflavonas em Produtos Alimentícios.

Foram estudadas as estabilidades térmicas de bolos e biscoitos com adição de farinha de soja hidratada, além de avaliar também o efeito da torrefação da farinha utilizada nos experimentos. Verificou-se na Tabela 19 que os teores de isoflavonas nas duas formas: malonil e glicosídica sofreram pouca variação nas temperaturas de assamento do bolo. O método estatístico de Teste de Contrastos demonstrou que não há diferenças significativas ($p \leq 0,05$), entre as médias de malonil, glicosídeos em relação às temperaturas de 175 °C e 210 °C, ou seja, os teores de isoflavonas nas duas formas não diferiram significativamente nas duas temperaturas testadas.

TABELA 19 – Estabilidade térmica das isoflavonas (mg/100g) em farinha de soja antes e após o tratamento hidrotérmico, na massa de bolo e após assamento a diferentes temperaturas.

Produtos	Isoflavonas			
	Malonil	Glicosídeos	Agliconas	Total
Grãos de soja cru	62,62 ±5,04	41,47 ±2,97	1,80 ±0,32	105,90 ±7,68
Grãos de soja triturados após tratamento hidrotérmico em pH 6,0	44,40 ±2,53	23,69 ±2,03	52,60 ±1,93	120,69 ±6,64
* Massa de bolo sem assamento ²	7,10	3,8	8,0	19,4
* Bolo assado a 175°C	4,61 ±0,46	1,28 ±0,01	10,20 ±0,65	16,16 ±1,13
* Bolo assado a 210°C	3,31 ±2,02	1,17 ±0,29	7,47 ±1,88	11,98 ±4,20

* Estes baixos teores para as isoflavonas são resultado da diluição da grãos de soja triturados com outros ingredientes da formulação conforme indicado anteriormente. Considerou-se também nos cálculos, a perda de umidade durante o assamento dos bolos (10 %).

Os valores obtidos neste trabalho também estão de acordo com resultados obtidos por MAHUNGU et al. (1999), onde foi verificado que nas temperaturas de 110, 130 e 150°C, ocorreram alterações no teor de isoflavonas totais, quando presentes em proteínas isoladas de soja e em misturas com milho.

Resultados obtidos por XU et. al (2002), trabalhando com isoflavonas extraídas em solução metanólica, mostraram que ocorre diminuição

da forma glicosídica em temperaturas superiores a 185 °C e degradação da forma aglicona em temperaturas superiores a 200 °C.

Observa-se, também que aumentando a temperatura de assamento do bolo de 175 °C para 210 °C, ocorreu uma redução nos teores de agliconas em aproximadamente 27 %, conforme mostrado na Tabela 20. Não foi verificadas diferenças significativas ($p \leq 0,05$) nas médias de daidzeína, gliciteína e genisteína, com o aumento da temperatura de 175 °C para 210 °C.

TABELA 20 – Estabilidade térmica das agliconas (mg/100g) nos bolos após assamento a diferentes temperaturas

Agliconas				
Produtos	Daidzeína	Gliciteína	Genisteína	Total
Bolo assado a 175°C	4,81 ±0,26	2,04 ±0,23	3,35 ±0,15	10,20 ±0,65
*Bolo assado a 210°C	3,64 ±0,69	1,20 ±0,65	2,63 ±0,54	7,47 ±1,88

*Considerou-se nos cálculos, a perda de umidade durante o assamento dos bolos (10 %).

Os resultados obtidos para agliconas estão de acordo com UNGAR et al. (2003) que verificaram em seus estudos que a genisteína é considerada a mais estável entre as três formas de agliconas enquanto a daidzeína é a mais termolábil. De uma forma geral, as agliconas, bem como outras formas de isoflavonas são degradadas em altas temperaturas.

Em relação à estabilidade térmica das isoflavonas do biscoito antes e após o assamento, verificou-se que como a temperatura empregada para assamento normalmente é inferior àquela utilizada para bolos, os resultados obtidos neste experimento diferem do anterior. Observa-se a ação do calor que converteu as formas malonil em glicosídica, e esta, sob ação da β -glicosidase, foram convertidas para as formas agliconas. Após o assamento, verificou-se redução das formas malonil e glicosídica e um aumento das agliconas em 46,1 % (Tabela 21), principalmente da gliciteína.

Avaliando as médias das formas malonil e glicosídica verificou-se que não há diferenças significativas nas duas médias antes e após o assamento a 150 °C ($p \leq 0,05$).

TABELA 21 – Estabilidade térmica das isoflavonas (mg/100g) em farinha de soja antes e após o tratamento hidrotérmico, na massa de biscoito e após assamento.

Isoflavonas				
Produtos	Malonil	Glicosídeos	Agliconas	Total
Grãos de soja cru	62,62 ±5,04	41,47 ±2,97	1,80 ±0,32	105,90 ±7,68
Grãos de soja triturados após tratamento hidrotérmico em pH 6,0	44,40 ±2,53	23,69 ±2,03	52,60 ±1,93	120,69 ±6,64
*Massa de biscoito sem assamento	3,01 ±0,19	1,06 ±0,01	8,35 ±0,01	12,42 ±0,21
*Biscoito assado a 150 °C	2,24 ±0,67	0,79 ±0,04	9,85 ±2,35	12,88 ±1,62

*Estes baixos teores para as isoflavonas são resultado da diluição da grãos de soja triturados com outros ingredientes da formulação conforme indicado anteriormente. Considerou-se também nos cálculos, a perda de umidade durante o assamento dos biscoitos

O aumento do teor de agliconas pode ser justificado pela hidrólise dos glicosídeos, sob ação da enzima β -glicosidase (MATSUURA et al., 1989) nos primeiros minutos de assamento até a temperatura de 60 °C, onde ocorre desnaturação da enzima.

Não foi verificada diferenças significativas ($p \leq 0,05$) nas médias de daidzeína e genisteína antes e após o assamento de biscoitos a 150 °C em relação as médias de gliciteína, verificou-se diferenças significativas ($Pr > 0,05$) após o assamento a 150 °C. Em relação ao teor total de agliconas não há diferenças significativas entre as médias ($p \leq 0,05$).

TABELA 22 – Estabilidade térmica das agliconas daidzeína, gliciteína e genisteína (mg/100g) em biscoito cru e assado a 150 °C.

Produtos	Agliconas			Total
	Daidzeína	Gliciteína	Genisteína	
Biscoito cru	3,59 ±0,01	0,81 ±0,06	3,95 ±0,03	8,35 ±0,01
*Biscoito (150°C)	4,46 ±1,20	2,04 ±0,41	3,35 ±0,73	9,85 ±2,35

Considerou-se nos cálculos, a perda de umidade durante o assamento dos biscoitos

Verificou-se de uma forma geral, redução nos teores de isoflavonas totais nas diferentes temperaturas e tempos de processo, conforme mostrado na Tabela 23. Esta redução pode ser atribuída à degradação térmica das diferentes formas de isoflavonas. Entretanto, nos primeiros minutos de processo, ocorreu um ligeiro aumento nos teores de algumas formas de isoflavonas por ação do calor. Por outro lado, com o aumento do tempo de exposição ao calor ocorreu uma redução nestes teores. Indicando, partir daí, numa degradação térmica destes compostos. XU et al. (2002) verificaram redução nos teores de glicosídeos e formação de agliconas e acetilglicosídeos em temperatura de 135 °C. Na temperatura de 185 °C os teores de glicosídeos foram reduzidos drasticamente. Após, 60 minutos de aquecimento a 200 °C, as agliconas gliciteína e genisteína foram degradadas enquanto que a daidzeína foi estável até 90 minutos.

TABELA 23 - Estabilidade térmica das isoflavonas (mg/100g) em farinha de soja hidratada após tratamento térmico.

Tratamento Térmico	Isoflavonas				
	Malonil	Acetil	Glicosídeo	Agliconas	Total
S/Tratamento térmico	21,5	0,00	29,27	55,61	106,43
10'/140°C	ND	17,01	15,49	48,43	80,93
30'/140°C	ND	12,47	16,09	54,34	82,9
50'/140°C	ND	10,08	10,68	45,93	66,69
10'/180°C	ND	13,68	21,58	58,71	93,97
30'/180°C	ND	12,72	18,09	58,03	88,84
50'/180°C	ND	8,33	9,02	46,74	64,19

ND = não detectado

Os resultados deste estudo demonstram a presença da forma malonil e ausência da forma acetil na farinha de soja sem tratamento térmico. Após, iniciado este tratamento, ocorreu conversão total de malonil em acetil, para ambas as temperaturas, seguidas de uma degradação térmica destas duas formas em função do tempo de tratamento. A ausência da forma malonil pode ser atribuída à descarboxilação através do aquecimento a altas temperaturas, originando a forma acetil e por de-esterificação originar as formas glicosídicas (COWARD et al.; 1998; BARNES et al.; 1994). Apesar de

ocorrer conversão da forma acetil em glicosídica, houve uma redução desta última por degradação térmica. Ou seja, a taxa de degradação da forma glicosídica foi superior à taxa de conversão da forma acetil em glicosídica.

No experimento a 180 °C utilizou-se a mesma farinha hidratada que foi utilizada no experimento a 140 °C. Observando novamente a Tabela 23, verificou-se um aumento do teor de isoflavonas totais nos tempos de 10 e 30 minutos na temperatura de 180 °C em relação à temperatura de 140 °C. Ao contrário do experimento realizado a 140 °C, no tempo de 10 minutos verificou-se uma maior formação de glicosídeos que acetil. O aumento da temperatura pode ter induzido a maior conversão das formas malonil em glicosídicas como também das formas acetil em glicosídeos. Após 50 minutos de aquecimento os teores de glicosídeos reduziram pela metade, as formas acetil e agliconas reduziram em 34 e 19 % respectivamente.

Na Tabela 24 verifica-se que o teor de agliconas totais nas duas temperaturas não sofreu grandes alterações em relação à farinha de soja hidratada não submetida a posterior tratamento térmico. Isto pode ser, devido à inativação da enzima β -glicosidase ocorrer em 60 °C, já que nesse experimento foram utilizadas temperaturas de 140 e 180 °C, o que resultou em teores de agliconas próximos aos da farinha de soja hidratada não submetida a tratamento térmico. No tempo de 10 minutos a 140 °C as agliconas totais sofreram redução de aproximadamente 13 % em relação as agliconas sem tratamento térmico. Durante o aquecimento por 30 minutos houve formação de daidzeína de aproximadamente 44 %, esses aumentos podem ter sido gerados devido a ação da enzima β -glicosidase, até atingir a temperatura de 60 °C, onde é inativada. Com o aumento do tempo de aquecimento para 50 minutos

houve redução nos teores de daidzeína e genisteína respectivamente de 15 e 17 %, causada provavelmente pela desnaturação dessas agliconas.

Considerou-se na temperatura de 180 °C, que não ocorreu alteração no teor de agliconas totais nos tempos de 10 e 30 minutos. Com o aumento do tempo de aquecimento para 50 minutos, no caso da temperatura de 180 °C ocorreram reduções das formas, conseqüente da desnaturação das agliconas.

TABELA 24 - Teor de agliconas (mg/100g) em farinha de soja hidratada submetida a tratamento térmico a 140 e 180°C.

Agliconas				
Tratamento Térmico	Daidzeína	Gliciteína	Genisteína	Total
S/Tratamento térmico	25,33	5,45	24,83	55,61
10'/140 °C	20,24	5,14	23,05	48,43
30'/140 °C	29,16	4,78	20,40	54,34
50'/140 °C	24,61	4,40	16,92	45,93
10'/180 °C	29,85	5,78	23,08	58,71
30'/180 °C	31,34	6,01	20,68	58,03
50'/180 °C	25,28	5,22	16,24	46,74

5.4 Concentração de Isoflavonas Através do Processo de Separação com Membranas.

Observa-se pela Tabela 25, que a retenção de isoflavonas totais e em cada forma (malonil, glicosídica e agliconas) apresentaram valores distintos mesmo utilizando o mesmo processo de separação (nanofiltração).

Provavelmente, esta variação deve estar relacionada aos diferentes pontos de corte destas membranas e/ou maior ou menor afinidade físico-química entre as isoflavonas e as membranas. As maiores concentrações de isoflavonas foram obtidas utilizando as membranas NF-90 e osmose inversa, as concentrações foram respectivamente de 76 e 74,8 %. Entre as formas de isoflavonas, a maior concentração obtida foi de 89 % para a forma glicosídica.

TABELA 25 – Percentual de retenção de isoflavonas na nanofiltração e osmose inversa a partir do extrato etanólico de soja.

Retenção de isoflavonas (%)				
Processos	Malonil	Glicosídeos	Agliconas	Total
Nanofiltração - UFSC	6,10	4,3	6,0	1,3
Nanofiltração – NF - Osmonics	49,4	52,8	16,0	35,55
Nanofiltração – NF - 90	83,6	89,0	63,4	76,00
Osmose Inversa - Osmonics	77,7	78,6	70,6	74,8
Isoflavonas no extrato etanólico antes das filtrações (mg/mL)	13,26	7,65	15,89	36,8

Na Tabela 26 estão apresentados os percentuais de retenção de cada forma de aglicona, após a nanofiltração e osmose inversa. Através da osmose inversa, obteve-se a maior concentração de genisteína (72,4 %), uma das agliconas mais bioativas.

TABELA 26 - Percentual de retenção de agliconas na nanofiltração e osmose inversa a partir do extrato etanólico de soja

Retenção de agliconas (%)				
Processos	Daidzeína	Gliciteína	Genisteína	Total
Nanofiltração - UFSC	6,0	22,0	11,48	5,97
Nanofiltração – NF - Osmonics	15,4	2,83	19,32	16,0
Nanofiltração – NF - 90	61,8	63,12	65,12	63,43
Osmose Inversa - Osmonics	69,7	65,95	72,40	70,61
Isoflavonas no extrato etanólico antes das filtrações	7,34	1,41	7,14	15,89

Os resultados dos teores de isoflavonas (mg/mL) nos permeados da nanofiltração e osmose inversa estão apresentados na Tabela 27.

TABELA 27 - Teor de isoflavonas (mg/100g) nos processos de nanofiltração e osmose inversa a partir do extrato etanólico de soja.

Isoflavonas¹				
Processos	Malonil	Glicosídeos	Agliconas	Total
Permeado NF-UFSC	14,07 a	7,32 a	14,94 a	36,33 a
Permeado NF	6,71 b	3,61 b	13,34 b	23,66 b
Permeado NF-90	2,17 d	0,85 c	5,81 c	8,83 c
Osmose Inversa- Osmonics	2,96 c	1,64 c	4,67d	9,27 d
Isoflavonas no extrato etanólico antes das filtrações	13,26	7,65	15,89	36,8

¹Média de três repetições

Média seguida pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$); C.V. Malonil = 2,87 %, Glicosídeos = 11,88 %, Agliconas = 1,26 %.

As médias dos teores de daidzeína, gliciteína e genisteína (mg/mL) no permeado dos processos de nanofiltração e osmose inversa estão apresentadas na Tabela 28.

TABELA 28 - Teor de agliconas (mg/100g) nos processos de nanofiltração e osmose inversa a partir de extrato etanólico de soja.

Agliconas¹				
Processos	Daidzeína	Gliciteína	Genisteína	Total
Permeado NF- UFSC	6,90 a	1,72 a	6,32 a	14,94 a
Permeado NF - Osmonics	6,21 b	1,37 b	5,76 b	13,34 b
Permeado NF - 90	2,80 c	0,52 c	2,49 c	5,81 c
Osmose Inversa - Osmonics	2,22 d	0,48 c	1,97 d	4,67 d
Isoflavonas no extrato etanólico antes das filtrações	7,34	1,41	7,14	15,89

¹ Média de três repetições

Média seguida pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$); C.V. Daidzeína=1,25 %, Gliciteína=2,85 %, Genisteína= 0,98 %.

SUMÁRIO DOS RESULTADOS E CONCLUSÃO

- Maiores conversões da forma glicosídica em agliconas foram obtidas quando o tratamento hidrotérmico foi aplicado à farinha de soja nos pH 6,0 e 7,5. Estes valores de agliconas foram 31 % superiores aqueles obtidos com os grãos inteiros.
- O tratamento hidrotérmico aumentou o teor de agliconas em até 53 vezes na farinha de soja, em relação ao grão inteiro sem tratamento.
- O teor de genisteína, considerada a forma mais bioativa entre as isoflavonas, aumentou em 24 vezes em relação ao grão inteiro sem tratamento hidrotérmico.
- As maiores atividades da enzima β -glicosidase foram verificadas em pH 7,5 e 6,0, correspondendo ao mesmo pH de maior formação de agliconas.
- A enzima β -glicosidase presente na farinha de soja foi inibida em até 40 % quando se utilizou o inibidor glucona- δ -

lactona na concentração 100mg/100g, após 12 horas de tratamento hidrotérmico.

- Verificou-se que a unidade de atividade específica (UAE), em diferentes concentrações de inibidor foi considerada praticamente constante nos tempos de 2, 4 e 8 horas de tratamento hidrotérmico a 50 °C.
- O teor de agliconas reduziu em 27 % no bolo assado a 210 °C, em relação à temperatura de 175 °C.
- O teor de agliconas em biscoitos não sofreu alteração depois de assados a temperatura de 150 °C.
- O teor de isoflavonas totais na farinha de soja hidratada, sofreu redução de 37,33 %, após torrefação por 50 minutos a 140 °C.
- Houve uma redução de 39,5 % no teor de isoflavonas totais após 50 minutos de aquecimento a 180 °C.

- 76 % das isoflavonas, presentes no extrato etanólico foram concentradas por nanofiltração e 70 % por osmose inversa.

CONCLUSÃO GERAL

Conclui-se que o tratamento hidrotérmico deva ser aplicado aos grãos inteiros e à farinha de soja, para que se tenha uma maior formação de agliconas. Esta formação é fortemente influenciada pelo pH e temperatura que, por sua vez, agem sobre a enzima B-glicosidase. Pode-se, também, utilizar o assamento de produtos à base de farinha de soja hidratada, sem ocorrer perda importante em isoflavonas, pelo menos nas temperaturas normalmente utilizadas para este fim. Os processos com membranas, como a nanofiltração e osmose inversa são promissores para a concentração de isoflavonas, principalmente as agliconas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLECREREUTZ, H., HONJO, H., HIGASHI, A.; FOTSIS, T.; NAMALAINEN, E., HOSEGAWA, T. & OKADA, H. Urinary excretion of lignans and isoflavonoid phytoestrogens in Japanese diet. *American Journal Clinical Nutrition*. V. 54, p.1093-1100, 1991.

ANDERSON, J. W.; SMITH, B. M.; WASHNOCK, C. S. Cardiovascular and renal benefits of dry bean and soybean intake. *The American Journal of Clinical Nutrition*. V.70, n.3, p. 464 - 474, 1999.

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

BAGGOTT, J. E., HA, T., VAUGHN, W. H., JULIANA, M. M. HARDIN, J. M. & GRUBBS, C.J. Effect of miso (Japanese soybean paste) and NaCl on DMBA-induced rat mammary tumors. *Nutrition and Cancer*. V. 14, p.103-109, 1990.

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

BELL, E. A. The physiological role (s) of secondary (natural) products. In: Stumpf, P. K., Conn, E. E. (Eds). *The Biochemistry of Plants, Secondary Plant Products*. Vol. 7, p. 1-19, 1981.

BIRT, D. F; HENDRICH, S.; WANG, W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. Pharmacology and Therapeutics. In CHIEN, J. T.; HSIEH, T. H.; KAO, T. H.; CHEN, B. H. Kinetic model for studying the conversion and degradation of isoflavones during heating. *Food Chemistry*, p. 425-434, 2005, .

CAMACHO, J. L.; BOURGEUS, R.; MORALES, J.; BANAFUNZI, N. Direct consumption of the soybean. *Journal of American Oil Chemistry Society*, Chanpaing, p. 362-366, Mar, 1981

CARRÃO-PANIZZI, M. C. Valor nutritivo da soja e potencial de utilização na dieta brasileira. *Londrina: EMBRAPA-CNPSO (EMBRAPA-CNPSO. Documentos, 29)*, p. 13, 1988.

CARRÃO-PANIZZI, M.C.; SIMÃO, A. S.; KIKUCHI, A. Efeitos de genótipos, ambientes e de tratamentos hidrotérmicos na concentração de isoflavonas agliconas em grãos de soja. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. V.8, n.8, p. 897-902, 2003.

COWARD, L.; BARNES, N. C.; SETCHELL, K. D. R.; BARNES, S. Genistein, daidzein, and their β -glycoside conjugates: Antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets. *Journal. Food Chemistry*. V. 41, p. 1961-1967, 1993.

CONN, E. E., β -Glucosidases in plants. In: Esen, A., β -Glucosidases: Biochemistry and Molecular Biology. *American Chemical Society*, p. 14-26, 1993.

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

CROUSE, III JR; MORGAN, T; TERRY J. G; ELLIS, J. VITOLINS, M.; VITOLINS, M.; BURQUE, J. L. A randomized trial comparing the effect of casein with that of soy protein containing varying amounts of isoflavones on plasma concentrations of lipids and lipoproteins. *Arch International Medicine*. V. 159, p. 2070 – 2076, 1999.

DAVIES, C. S.; NIELSEN, N. C. Genetic analysis of a null-allele for lipoxygenase- 2 in soybeans. *Crop Science*. V. 26, p. 460-463, 1986.

DHARMAWARDHANA, D. P., ELLIS, B. E., CARLSON, J. E. A β -Glucosidases from lodgepole pine xylem specific for the lignin precursor coniferinin. *Plant Physiological*. V. 107, p. 331-339, 1995.

DIAS, J. C. S. Alimentos Funcionais e Nutraceuticos: Oportunidades de Desenvolvimento e Cooperação. Encontro Franco Brasileiro de Biociência e Biotecnologia – Alimentos Funcionais e Nutracêuticos. *EMBRAPA-CNPSO. Documentos 85*, 2002.

DUROX, L., DELMOTTE, F. M., LANCELIN, J. M., KÉRAVIS, G., JAY-ALLEMAND, C. Insight into naphthoquinone metabolism: β -glycosidase-catalysed hydrolysis of hydrojuglone β -D-glucopyranoside. In MING-CHING, H., TERRENCE, G. L. Partial purification and characterization of a soybean β -glucosidase with high specific activity towards isoflavone conjugates. *Journal Biochemical*. V. 333, p. 275-283, 1998.

ERIKSSON, P. Nanofiltration extends the range of membrane ultrafiltration. *Environment. Program.* V. 7, p. 58-62, 1988.

ESEN, A. β -glucosidase, overview. In: Esen, A. (Ed), β -glucosidase: Biochemistry and Molecular Biology. *American Chemical Society*, p. 1-13. 1993

ESTEVEZ, E. A; MONTEIRO, J. B. R. Efeitos benéficos das isoflavonas de soja em doenças crônicas. *Revista de Nutrição.* V. 14, p.43 a 52, 2001.

FRANKE, A. A.; HANKIN, J. H.; YU, M. C.; MASKARINEC, G.; LOW, S. H.; CUSTER, L. J. Isoflavone levels in soy foods consumed by multiethnic populations in Singapore and Hawaii. *Journal. Agriculture. Food. Chemistry.* V. 47, p. 977-986, 1999.

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

HARBORNE, J. B., MABRY, T. J. The flavonoids: Advances in Research. In MING-CHING, H., TERRENCE, G. L. Partial purification and characterization of a soybean β -glucosidase with high specific activity towards isoflavone conjugates. *Chapman and Hall*, 1982.

HOSEL, W., SURHOLT, E., BORGMANN, E. Characterization of β -glucosidase isoenzymes possibly involved in lignification from chickpea (*Cicer arietinum* L.) cell suspension cultures. In MING-CHING, H., TERRENCE, G. L. Partial purification and characterization of a soybean β -glucosidase with high specific activity towards isoflavone conjugates. *Journal European Biochemical.* V. 84, p. 487-492. 1978.

HOSEL, W., BARZ, W., β -glucosidase from *Cicer arietinum* L.: purification and properties of isoflavone-7-O-glucoside-specific- β -glucosidase. In MING-CHING, H., TERRENCE, G. L. Partial purification and characterization of a soybean β -glucosidase with high specific activity towards isoflavone conjugates. *European Journal Biochemistry.* V. 57, p. 607-616. 1975

INOUE, K., EBIZUKA, Y. Purification and characterization of furostanol glycoside 26-O- β -glucosidase from *Costus speciosus rhizomes*. In MING-CHING, H., TERRENCE, G. L. Partial purification and characterization of a soybean β -glucosidase with high specific activity towards isoflavone conjugates. *FEBS lett.* V. 378, p. 157-160. 1996

IZUMI, T.; PIKULA, 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 amount than their glucosides in humans. *Journal of Nutrition*. V.130, p.1695-1699, 2000.

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

KIM, S.; KIM, W.; HWANG, K. Optimization of the extraction and purification of oligosaccharides from defatted soybean meal. *International Journal of Food Science and Technology*. V. 38, p. 337-342, 2003.

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

KITAMURA, K.; IGITA, K.; KIKUCHI, K.; KUDOU, S.; OKUBO, K. Low isoflavone content in early maturing cultivars, so called summer-type soybeans (*Glycine max* (L) Merrill). *Japanese Journal of Breeding*. V. 41, p. 651-654, 1991.

KLECZKOWSKI, K., SCHELL, J. Phytohormone conjugates: nature and function. In MING-CHING, H., TERRENCE, G. L. Partial purification and characterization of a soybean β -glucosidase with high specific activity towards isoflavone conjugates. *Crit. Rev. Plant. Science*. V. 94, p. 283-298, 1995.

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

KURZER, M. S.; XU, X. Dietary phytoestrogens. *Revista de Nutrição*. V. 17, p. 353-381, 1997.

LI-JUN, Y.; LI-TE, L.; ZAI-GUI, L.; TATSUMI, E.; SAITO, M. Changes in isoflavone contents and composition of sufu (fermented tofu) during manufacturing. *Food Chemistry*. V. 87, p. 587-592, 2004.

LIENER, I. E. Implications of antinutritional components in soybean foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Boca Raton. V. 34, n.1, p. 31-67, Jan. 1994

LIU, K.; MARKAKIS, P. Effect of maturity and processing on the trypsin inhibitor and oligosaccharides of soybeans. *Journal of Food Science*, Chicago .V. 52, n.1, p. 222-225, Jan/Feb. 1987.

LEAH, R., KIGEL, J., SVENDSEN, I., MUNDY, J. Biochemical and molecular characterization of a barley seed β -glucosidase. In MING-CHING, H., TERRENCE, G. L Partial purification and characterization of a soybean β -glucosidase with high specific activity towards isoflavone conjugates. *Journal Biological Chemistry*. V. 270, p. 15789-15797. 1995.

LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A. L., RANDALL, R. F. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal Biological Chemical*. 1951.

MAHUNGU, S. M.; DIAZ-MERCADO, S.; LI, J.; SCWENK, M.; SINGLETARY, K.; FALLER. J. Stability of isoflavones during extrusion processing of corn/soy mixture. *Journal. Agriculture. Food Chemistry*. V. 47, p. 279-284, 1999.

MAIER, R., CARLE, R., KREIS, W., REINHARD, E. Purification and characterization of a flavone 7-O-glucoside-specific glucosidase from ligulate florets of chamomilla recutita. In MING-CHING, H., TERRENCE, G. L Partial purification and characterization of a soybean β -glucosidase with high specific activity towards isoflavone conjugates. *Planta Med*. V. 59, p. 436-441, 1993.

MATSUURA, M. & OBATA, A. β -glucosidase from soybeans hydrolyze daidzin and genistin. *Journal of Food Science*. V. 58, p. 144-147, 1993.

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

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

METHA, A. e ZYDNEY, A. L. Permeability and selectivity analysis for ultrafiltration membranes. *Journal of Membrane Science*. V. 249, p. 245-249, 2005.

MIERZWA, C., HESPANHOL, I. Processo de separação por membranas. *Revista Gerenciamento Ambiental*. V. 15. 2005.

MING-CHING, H. e TERRENCE, G. T. Partial purification and characterization

of a soybean β -glucosidase with high specific activity towards isoflavone. *Phytochemistry*. V.58, p. 995-1005, 2001.

MORAIS, A. A. C.; SILVA, A. L. *Soja: Suas aplicações*. 1. Ed. Medsi: Rio de Janeiro, Cap.1, p. 1-8, 1996.

MORAIS, A. A. C. Valor nutritivo e funcional da soja. *Revista Brasileira Nutrição clínica*. V. 15, n.2, p. 306-315, 2000.

MURPHY, P. A. Phytoestrogen content of processed soybean products. *Food Technology*. V.36, p. 60-64, 1992.

NELSON, A. I.; STEINBERG, M. P.; WEI, S. L. Illinois process for preparation of soymilk. *Journal of Food Science*. V. 41, p. 57-61, 1976.

NOORDMAN, R. T.; KOOIKER, K.; BEL, W.; DEKKER, M.; WESSELINGH, A. J. Concentration of aqueous extracts of defatted soy flour by ultrafiltration: Effect of suspended particles on the filtration flux. *Journal of Food Engineering*. V. 58, p. 135-141, 2003.

PHILLIPS, D. A., STREIT, W. Legume signals to rhizobial symbionts: a new approach for defining rhizosphere colonization. In: STACEY, G., KEEN, N. (Eds), *Plant-Microbe Interactions*. V. 1, p. 236-271, 1996.

POULTON, J. E. Cyanogenesis in plants. In MING-CHING, H. e TERRENCE, G. T. Partial purification and characterization of a soybean β -glucosidase with high specific activity towards isoflavone. *Plant Physiological*. V. 94, p. 401-405, 1990.

RACKIS, J.J.; SESSA, D.J.; HONIG, D. H. Flavor problems of vegetable food proteins. *Journal of the American Oil Chemistry Society*, San Diego. V. 56, n. 6, p. 262-271, 1979.

RAO, C.V., WANG, C.X., SIMI, B. Enhancement of experimental colon cancer by genistein. *Cancer Research, Baltimore*. V.57, p.3717-3722, 1997.

RIBEIRO, A. P. B; SOARES, M. S; MOURA, J. M. L. N; CÁCERES, M. C; GONÇALVES, L. A. G. Aplicação de tecnologia de membranas no processamento de óleos vegetais. *B. CEPPA*. V. 23, p. 1-22, 2005.

RICCIOTTI, H. A.; KHAODHIAR, L.; BLACKBURN, G. L. Daidzein-rich isoflavone-aglicones for menopausal symptoms. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*. V.89, p. 65-66, 2005.

SAS INSTITUTE. SAS proprietary software release 6.09. Cary: SAS Institute, 1995

SETCHELL, K. D. R.; BROWN, N. M.; DESAI, P.; ZIMMER-NECHEMIAS, L.; WOLFE, B. E.; BRASHEAR, W. T.; KIRSCHNER, A. S.; CASSIDY, A.; HEUBI, J. E. Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. *The Journal of Nutrition*. V. 131, p. 1362S-1375S, 2001.

SOYATECH. Soyfoods 2004 & Beyond: Global & U.S. Perspectives. 2004.

SHARMA, O.P.; ADLRCREUTZ, H.; STRANDBERG, J.D.; ZIRKIN, B. R.; COFFEY, D. S. & EWING, L. L. Soy of dietary source plays a preventive role against the pathogenesis of prostatitis in rats. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. V. 43, p. 557-564, 1992

TODA, T.; SAKAMOTO, A.; TAKAYANAGI, T. & YOKOTSUKA, K. Changes in isoflavone compositions of soybean during soaking process. *Food Science and Technology Research*. V. 6, p. 314-319, 2001.

TSANGALIS, D.; ASHTON, J. F.; STOJANOVSKA, L.; WILCOX, G.; SHAH, N. P. Development of an isoflavone aglycone-enriched soymilk using soy germ, soy protein isolate and bifidobacteria. *Food Research International*. V. 37, p. 301-312, 2004.

UNGAR, Y.; OSUNDAHUNSI, F. ; SHIMONI, E. Thermal Stability of Genistein and Daidzein and Its Effects on Their Antioxidant Activity. *Agricultural and Food Chemistry*. V. 51, p. 4394- 4399, 2003.

VAN DER RIET, W.B.; WIGHT, A. W.; CILLIERS, J. J. L.; DATEL, J. M. Food chemical investigation of tofu and its by product okara. *Food Chemistry*. V. 34, n.3, p. 193-202, Oxford, 1989.

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

XU, Z.; WU, Q.; GODBER, S. J. Stabilities of Daidzin, Glycitin, Genistin, and Generation of Derivatives during Heating. *Agriculture and Food Chemistry*. V. 50, p. 7402-7406, 2002.

XU, L.; LAMB, K.; LAYTON, L.; KUMAR, A. A membrane-based process for recovering isoflavones from a waste stream of soy processing. *Food Research International*. V. 37, p. 867-874, 2004.

WANG, H. J & MURPHY, P. A. Isoflavone content in commercial soybean foods. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. V. 42, p. 1666-1673, 1994

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

WANG, X. L.; ZHANG, C.; OUAYANG. P. The possibility of separation saccharides from a NaCl solution by using nanofiltration in diafiltration mode. *Journal of Membrane Science*. V. 204, p. 271-281, 2002

WEI, H., WEI, L., FRENKEL, K., BROWEN, R. & BARNES, S. Inhibition of tumor promoter-induced hydrogen peroxide formation in vitro and in vivo by genistein. *Nutrition and Cancer*. V. 20, p. 1-12, 1993.

WILKENS, W. F. MATTICK, L. R. HAND, D. B. Effect of processing method on oxidative off-flavors of soybean milk. *Food Technology*. V. 21, p. 1630-1633, 1967.

WOLF, W. J., COWAN, J. C. *Soybean as a food source*. Cleveland: CRC press, 1975.