



LÍVIA DIAS DE QUEIRÓS

**BIOTRANSFORMAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS
DO EXTRATO DE SOJA PARA OBTENÇÃO DE
PRODUTO RICO EM COMPOSTOS BIOATIVOS**

**CAMPINAS
2014**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

LÍVIA DIAS DE QUEIRÓS

**BIOTRANSFORMAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DO EXTRATO DE
SOJA PARA OBTENÇÃO DE PRODUTO RICO EM COMPOSTOS BIOATIVOS**

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Engenharia de Alimentos da Universidade
Estadual de Campinas como parte dos requisitos
exigidos para obtenção do título de Mestra em
Ciência de Alimentos.**

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Gabriela Alves Macedo

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação
defendida pela aluna Lívia Dias de Queirós e orientada
pela Prof.^a Dr.^a Gabriela Alves Macedo.

Assinatura do orientador(a)

**CAMPINAS
2014**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano de Souza – CRB 8/5816

Queirós, Livia Dias, 1988-
Q32b Biotransformação de compostos fenólicos do extrato de soja para obtenção
de produto rico em compostos bioativos / Livia Dias de Queirós. – Campinas, SP :
[s.n.], 2014.

Orientador: Gabriela Alves Macedo.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de
Engenharia de Alimentos.

1. Isoflavonas. 2. Equol. 3. Biotransformação. 4. Tanase. 5. Extrato de soja. I.
Macedo, Gabriela Alves. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Biotransformation of phenolic compounds form soymilk to obtain
enriched product in bioactive compounds

Palavras-chave em inglês:

Isoflavones

Equol

Biotransformation

Tannase

Soy extract

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Mestra em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Gabriela Alves Macedo [Orientador]

Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz

Severino Matias de Alencar

Data da defesa: 06-06-2014

Programa de Pós Graduação: Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

PROF.^a DR.^a GABRIELA ALVES MACEDO
FEA/UNICAMP
(ORIENTADORA)

DR.^a ANA LÚCIA TASCA GOIS RUIZ
CPQBA/UNICAMP
(MEMBRO TITULAR)

PROF. DR. SEVERINO MATIAS DE ALENCAR
ESALQ/USP
(MEMBRO TITULAR)

DR.^a JOELISE DE ALENCAR FIGUEIRA ANGELOTTI
FEA/UNICAMP
(MEMBRO SUPLENTE)

PROF.^a DR.^a VÂNIA BATTESTIN
INSTITUTO FEDERAL DE SÃO PAULO (IFSP)
(MEMBRO SUPLENTE)

RESUMO

A soja atrai considerável atenção no atual cenário econômico mundial devido ao seu elevado potencial nutritivo e efeitos potencialmente benéficos à saúde humana, que são atribuídos principalmente às isoflavonas. Esta classe de fenóis heterocíclicos é conhecida por suas atividades biológicas, tais como as atividades estrogênica, antioxidante e antitumoral, sendo as formas agliconas mais ativas do que as glicosiladas. Contudo, estudos têm mostrado que a eficácia clínica das isoflavonas está relacionada com a capacidade de produção de equol, um metabólito da daidzeína que, segundo a literatura vigente, é produzido exclusivamente pela ação da microbiota intestinal. No entanto, há evidências de que nem todos os indivíduos são capazes de metabolizar as isoflavonas a equol, sendo essa variabilidade atribuída às diferenças na composição da microflora intestinal, hábitos alimentares, fatores genéticos, dentre outros. Neste contexto, os produtos à base de soja são uma forma de incluir as isoflavonas na dieta, sendo que o extrato hidrossolúvel de soja (EHS) é um substrato que tem se apresentado com potencial para produção de novos alimentos com apelo saudável. Desse modo, com o propósito de aumentar o conteúdo de isoflavonas bioativas e avaliar a viabilidade de um processo biotecnológico para produção de equol *in vitro*, neste projeto foi investigada a aplicação de culturas starters e bactérias lácticas probióticas na fermentação do EHS, aliado à ação do extrato bruto de tanase obtido a partir de *Paecilomyces variotii*. Além disso, também foi avaliada a biotransformação dos compostos fenólicos e atividade antioxidante do produto obtido. A ação do extrato semipurificado de tanase de *P. variotii* frente aos padrões comerciais de isoflavonas foi avaliada por CLAE-DAD. O teor de fenóis totais dos extratos, antes e depois dos processos de bioransformação, foi avaliado pelo método de Folin-Ciocalteu, a atividade antioxidante pelos métodos *in vitro* ORAC e de sequestro de radicais DPPH e o perfil químico por CLAE-DAD. Após o processo fermentativo e/ou tratamento enzimático do EHS, houve um significativo aumento no teor de fenólicos totais e capacidade antioxidante, evidenciada por ambos os métodos empregados (ORAC e DPPH), quando comparados com o controle do EHS sem tratamento. Além disso, foi verificada uma modificação no perfil polifenólico das amostras do EHS biotransformadas evidenciado por CLAE-DAD, resultando em um aumento na concentração das formas agliconas em relação às glicosiladas, bem como o

aumento da concentração de equol após os processos de biotransformação propostos. Os resultados obtidos por CLAE-DAD confirmaram que o extrato de tanase de *P. variotii* foi capaz de biotransformar as formas glicosiladas (daidzina e genistina) das isoflavonas em suas respectivas formas agliconas (daidzeína e genisteína), indicando uma atividade diglicosídica do extrato semipurificado de tanase. Pelo que se tem conhecimento, a hidrólise de isoflavonoides glicosilados por tanase, bem como a formação de equol, é um relato inédito na literatura demonstrando que é possível desenvolver um processo *in vitro* para a obtenção deste composto bioativo, sem a presença de bactérias intestinais, utilizando apenas uma biotransformação enzimática.

Palavras-chave: Isoflavonas, equol, fermentação, tanase, biotransformação, extrato hidrossolúvel de soja.

ABSTRACT

Soy is attracting a considerable amount of attention in the current global economic scenario due to its high nutritional capability and potentially beneficial effects of human health, which are mainly attributed to isoflavones. This class of heterocyclic phenols is known for its biological activities, such as estrogenic, antioxidant and antitumor activities, and the aglycone forms are more active than glycosides. However, studies have shown that the clinical efficacy of isoflavones is related to the capacity to produce equol, a metabolite of daidzein, which according to current literature is exclusively produced by the action of the gut flora. Thus, there is evidence that not all individuals are able to metabolize isoflavones to equol, and this variability is attributed to differences in the composition of gut flora, diet, genetic factors, among others. In this context, soy-based products are a way to include isoflavones in the diet, and soymilk is a substrate that has shown the potential to produce new food substances with healthy appeal. Hence, in order to increase the content of bioactive isoflavones and assess the viability of a biotechnological process for in vitro production of equol, this project investigated the application of starters and probiotic lactic bacteria strains in the fermentation of soymilk, combined with the action of the crude extract of tannase obtained from *Paecilomyces variotii*. Furthermore, the biotransformation of phenolic compounds and antioxidant activity of the obtained product was assessed. The action of the semi-purified extract tannase in relation to commercial standards of isoflavones was evaluated by HPLC-DAD. The total phenolic content of the extracts, before and after the biotransformation processes, was evaluated by the Folin-Ciocalteu method; the antioxidant activity was tested by in vitro DPPH and ORAC assays, and the chemical profile was evaluated by HPLC-DAD. After the fermentation process and/or enzymatic treatment of the soymilk, there was a significant increase the total phenolic content and antioxidant capacity, as evidenced by both methods employed (ORAC and DPPH), compared with the untreated soymilk. Additionally, a change was observed in the polyphenolic profile of biotransformed soymilk samples, proven by HPLC-DAD, resulting in an increase in the concentration of aglycones in relation to glycosides forms, as well as a significant increase in the concentration of equol after the biotransformation processes proposed. The results obtained by HPLC-DAD confirmed that the extract of tannase from

P. variotii was able to biotransform the glycoside forms (daidzin and genistin) into their aglycone forms (daidzein and genistein), indicating a diglycosidase activity of the crude extract of tannase. From what is known, the hydrolysis of glycosides isoflavone by tannase, in addition to the formation of equol, is an unpublished report in literature demonstrating that it is possible to develop an in vitro method for obtaining this bioactive compound, without the presence of an intestinal bacteria process using only an enzymatic biotransformation.

Keywords: Isoflavones, equol, fermentation, tannase, biotransformation, soymilk.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	4

CAPÍTULO I

EQUOL: A CHAVE PARA A EFETIVIDADE DAS ISOFLAVONAS DE SOJA?

RESUMO	6
ABSTRACT	7
1 INTRODUÇÃO.....	8
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
2.1 Isoflavonas.....	9
2.2 Equol.....	12
2.3 Metabolismo das isoflavonas e biossíntese do equol	14
2.4 Produção de equol em humanos e implicações clínicas	19
3 CONCLUSÕES	23
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24

CAPÍTULO II

ENRICHMENT OF EQUOL AND BIOACTIVE ISOFLAVONES IN SOYMILK BY BIOTRANSFORMATION USING LACTIC ACID BACTERIA AND TANNASE

ABSTRACT	32
1 INTRODUCTION	33
2 MATERIALS AND METHODS	34
2.1 Materials	34
2.2 Soymilk preparation	36
2.3 Enzyme obtention and assay.....	36
2.4 Enzymatic biotransformation of isoflavonoids	37
2.5 Soymilk biotransformation processes.....	38

2.5.1	Process I – Microbial biotransformation	38
2.5.2	Process II – Microbial followed by enzymatic biotransformation	38
2.5.3	Process III – Enzymatic biotransformation	39
2.6	Chemical profile evaluation.....	39
2.6.1	Total phenolic content	39
2.6.2	HPLC analysis of isoflavones	40
2.7	Antioxidant activity of biotransformed soymilk polyphenols	41
2.7.1	ORAC antioxidant assay	41
2.7.2	DPPH antioxidant assay	42
2.8	Calculations and statistics.....	42
3	RESULTS AND DISCUSSION.....	43
3.1	Bioprocess effect on total phenolic content and antioxidant activity of soymilk samples	43
3.2	Isoflavones profile	47
4	CONCLUSION	55
	REFERENCES	56
	CONCLUSÃO GERAL	63
	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	64
	ANEXOS	65

Dedico este trabalho aos meus amados pais, Manoel e Daizi,
e aos meus queridos irmãos, Thaís e Vítor,
com todo amor e carinho!

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a Dr.^a Gabriela Alves Macedo pela oportunidade, carinho, dedicação, apoio, paciência e ensinamentos. Meu respeito e admiração.

À Prof.^a Dr.^a Juliana Alves Macedo pelas contribuições, ensinamentos, dedicação e carinho.

Aos Professores da banca examinadora pelas valiosas contribuições e sugestões dadas para o aprimoramento do meu trabalho.

Aos colegas do laboratório de Bioquímica de Alimentos, André, Ana Darif, Bia, Bruna, Camilo, Cíntia, Dani, Débora, Elaine, Érica, Fabiano, Fabíola, Fernanda, Giba, Giulia, Haroldo, Isabela, Jessika, Joelise, José Valdo, Laís, Leonardo, Lívia Rosas, Liege, Marcela, Paula Barbosa, Paula Speranza, Ricardo, Ruann, Tati, Thiago, Val e Vivi pelo carinho, companheirismo, momentos de descontração e ajuda nas atividades do laboratório. Em especial agradeço à Bruna, Fabíola, Isabela, José Valdo, Livia Rosas e Ruann, que tanto me auxiliaram nos experimentos, pela dedicação, ensinamentos, paciência e por estarem sempre dispostos a ajudar.

À todas as pessoas com quem tive o prazer de conviver na Faculdade de Engenharia de Alimentos, incluindo professores, funcionários e alunos pela atenção e auxílios prestados durante esta jornada.

Aos meus amados pais, Manoel e Daizi, por sempre me apoiarem nunca medindo esforços para que eu alcance meus objetivos, e por todo amor e apoio emocional. Aos meus queridos irmãos, Thaís e Vítor, pelo carinho, cumplicidade e companheirismo.

À todos meus familiares pelo apoio e carinho.

Ao José Humberto e Larissa Froede pelas primeiras oportunidades, incentivos, ensinamentos e grande amizade. Minha eterna gratidão e amizade.

Às queridas amigas de república Camila, Helô e Mari, e às amadas amigas Bruna, Carol, Giulia e Isabela pelo imenso carinho, companhia, compreensão, ajuda constante, palavras de incentivo e por serem meu porto seguro em Campinas.

Aos amigos da Pró Vida pelos ensinamentos, atenção, carinho, bondade, harmonia e por me proporcionarem momentos memoráveis.

À CAPES pela bolsa de estudos concedida.

À todos aqueles que, apesar de não serem citados, contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

À Deus por me abençoar sempre e colocar todos no meu caminho.

*“A vida tem sua própria sabedoria.
Quem tenta ajudar uma borboleta a sair do casulo a mata.
Quem tenta ajudar o broto a sair da semente o destrói.
Há certas coisas que tem que acontecer de dentro pra fora.
Tudo tem sua hora.”*

Rubem Alves

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I

Figura 1: Estrutura da isoflavona e 17 β -estradiol	9
Figura 2: Estrutura química das isoflavonas glicosiladas e agliconas.	10
Figura 3: Hidrólise das formas glicosídicas em agliconas.	11
Figura 4: Estrutura química do equol.....	12
Figura 5: Metabolização da daidzeína para síntese do equol	14

CAPÍTULO II

Figure 1: HPLC-DAD chromatograms of the tannase reaction at 30 min at 40 °C of: (A) daidzin and (B) genistin.....	50
Figure 2: HPLC-DAD chromatograms of the: (A) raw soymilk, (B) fermented soymilk, (C) fermented soymilk reacted with 1.8 U of tannase and (D) raw soymilk reacted with 1.8 U of tannase at 30 min at 40 °C.....	53

ANEXOS

Figura 1: Cromatograma obtidos por CLAE-DAD da tanase de <i>Paecilomyces variotii</i> no tempo de 30 minutos de reação a 40 °C em tampão fosfato 75 mmol.L ⁻¹ pH 7,4 processado a 254 nm..	66
Figura 2: Cromatograma obtido por CLAE-DAD com tempo de retenção dos padrões de isoflavonoides (A) daidzina, genistina, daidzeína, genisteína e (B) equol em tampão fosfato 75 mmol.L ⁻¹	67

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1: Lista de bactérias intestinais que, cultivadas <i>in vitro</i> , foram capazes de biotransformar daidzeína em equol	16
--	----

CAPÍTULO II

Table 1: Total phenolics content and antioxidant activities from ORAC and DPPH assays of soymilk before and after the biotransformations process.....	43
Table 2: Concentration of isoflavone isomers and equol ($\mu\text{g mL}^{-1}$) in soymilk before (standard) and after the biotransformations process.....	47

ANEXOS

Tabela 1: Medida da atividade enzimática específica de tanase do extrato enzimático semipurificado de <i>Paecilomyces variotii</i>	65
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAPH	2,2'-azinobis(2-amidinopropano) dihidrocloreto
AUC	Área sob a curva de decaimento da fluorescência
CAE	Catequina
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos
DAD	Detector de arranjo de diodos
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EC	Enzyme Commission Numbers
EHS	Extrato hidrossolúvel de soja
Eq	Equivalentes
ER α	Receptor estrogênico α
ER β	Receptor estrogênico β
FAO	Food and Agriculture Organization
FL	Fluoresceína
HPLC	High performance liquid chromatography
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
NBR	Norma brasileira
ORAC	Capacidade de absorção do radical oxigênio
TPC	Conteúdo de fenólicos totais
p/p	Relação peso/peso
v/v	Relação volume/volume
w/v	Relação massa/volume
w/w	Relação massa/massa

INTRODUÇÃO GERAL

À medida que diversos estudos têm mostrado a relação direta entre a dieta e a saúde e observa-se um crescente interesse da população em uma alimentação saudável, a pesquisa de novos componentes naturais e o desenvolvimento de novos ingredientes possibilita a inovação em produtos alimentícios visando atender à demanda por produtos que são vistos como um veículo de promoção do bem-estar e saúde (KOMATSU; BURITI; SAAD, 2008).

Utilizada como alimento básico na dieta dos países orientais e como ingrediente em produtos industrializados no ocidente, a soja e seus produtos vêm obtendo êxito no mercado uma vez que o seu consumo tem sido associado a vários efeitos benéficos à saúde (BEHRENS; SILVA, 2004). Esta leguminosa possui elevada importância no cenário econômico mundial devido ao seu elevado potencial nutritivo, composição química e características agrônomicas favoráveis (FAO, 1992). Porém no Brasil o consumo humano ainda é pouco expressivo em relação ao consumo nos países orientais, sendo a maior parte da produção destinada ao óleo e à proteína para alimentação animal (LAZZAROTTO; HIRAKURI, 2011).

Dentre os produtos derivados da soja, destaca-se o extrato hidrossolúvel de soja (EHS), conhecido popularmente como “leite de soja”, alvo de grande atenção por parte de pesquisadores e industriais, devido às suas qualidades nutricionais e às suas atrativas possibilidades, que se devem ao baixo custo de produção (BEHRENS; SILVA, 2004). Além disso, também constitui boa fonte de isoflavonas, grupos de fenóis heterocíclicos, que apresentam atividades biológicas ditas promotoras da saúde, tais como as atividades estrogênica, hipocolesterolêmica, anti-carcinogênica e antioxidante (ABELUSCU; POPOVICI, 2007; BARNES, 2010; PAN; LAI; HO, 2010). No entanto, pesquisas têm revelado que os efeitos benéficos das isoflavonas estão relacionados à capacidade de produção de equol, um metabólito da daizeína, produzido exclusivamente pela ação da microflora intestinal (SETCHEL; BROWN, LYDEKING-OLSEN, 2002; YUAN; WANG; LIU, 2007; CAVALLINI; ROSSI, 2009; SETCHELL; CLERICI, 2010).

Um fator importante a ser considerado é a absorção e biodisponibilidade das isoflavonas uma vez que as formas glicosiladas não são absorvidas diretamente, sendo necessária a biotransformação para as suas formas bioativas, as agliconas (IZUMI et al., 2000; SETCHEL; BROWN, LYDEKING-OLSEN, 2002). Sendo assim, a hidrólise desses compostos fenólicos conjugados pode ser uma alternativa para aumentar a concentração de polifenóis livres e bioatividade dos produtos à base de soja (GEORGETTI et al., 2009).

Vários estudos mostram que diferentes processamentos promovem modificações químicas nas isoflavonas da soja podendo alterar suas taxas de absorção e metabolismo como, por exemplo, o processo fermentativo que pode alterar os níveis e formas das isoflavonas, promovendo um aumento nas formas agliconas (FUKUTAKE; TAKAHSHI; ISHIDA, 1996; WANG; MURPHY, 1994; GEORGETTI et al., 2009). Além disso, processos enzimáticos também são capazes de causar a biotransformação destes compostos trazendo diversos efeitos benéficos para a saúde, como demonstrado por Park et al. (2001) que relataram o uso de β -glicosidase para hidrólise das isoflavonas glicosiladas a fim de aumentar a concentração das respectivas agliconas em extrato de farinha de soja.

O fungo *Paecilomyces variotii*, utilizado no presente trabalho, foi isolado e selecionado por Macedo, Matsuda e Battestin (2005) dentre 400 linhagens fúngicas pertencentes ao laboratório de Bioquímica de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp como sendo o micro-organismo que apresentou melhor capacidade de síntese da enzima tanase. Desde então, este fungo vem sendo empregado por nosso grupo de pesquisa em estudos tanto de produção como de aplicação da tanase em matrizes alimentares (MADEIRA, MACEDO, MACEDO, 2012; MACEDO et al., 2011; SCHONS et al. 2011; FERREIRA et al., 2013).

Em estudo desenvolvido por FERREIRA et al. (2013), foi avaliada a especificidade do extrato semipurificado de tanase de *P. variotii* frente a diferentes padrões comerciais de polifenóis na proporção 1:1 (p/p) de enzima:padrão. Os resultados obtidos por estes autores demonstraram que esta enzima foi capaz hidrolisar rutina, naringina e hesperidina, demonstrando que além das atividades esterásicas e depsídicas já descritas na literatura para tanase, o extrato enzimático atuou na ligação entre a aglicona e o dissacarídeo dos flavonoides estudados, indicando uma atividade de diglicosidase. Baseado

nas observações de modo de ação da tanase de *P. variotii* comparado à outras tanases e β -glicosidases (BATTESTIN, MACEDO, 2007; BATTESTIN, MACEDO; FREITAS; 2008), foi que propôs-se este trabalho.

Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar três processos de biotransformação do extrato hidrossolúvel de soja e evidenciar o efeito destes processos na composição, química quantitativa e qualitativamente, das isoflavonas e na obtenção do equol, bem como avaliar as alterações nos parâmetros de fenólicos totais e capacidade antioxidante das amostras biotransformadas. Para isso, os três processos de biotransformação propostos consistiram na aplicação de cepas de bactérias lácticas e probióticas comerciais e/ou reação com a enzima tanase de *Paecilomyces variotti*.

O presente trabalho será apresentado na forma de artigos científicos e, portanto, será dividido em dois capítulos. O primeiro capítulo consiste de uma revisão bibliográfica que aborda teoricamente aspectos relacionados ao metabolismo, diferenças na produção, atividade biológica e às implicações clínicas do equol. O segundo capítulo trata da aplicação de três processos de biotransformação dos polifenóis do extrato hidrossolúvel de soja e na avaliação de alterações dos compostos fenólicos, propriedades antioxidantes e perfil das isflavonas das amostras biotransformadas.

*REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBULESCU, M.; POPOVICI, M. Isoflavones – biochemistry, pharmacology and therapeutic use. **Revue Roumaine de Chimie**, v. 52, n. 6, p. 537-550, 2007.

BARNES, S. The biochemistry, chemistry and physiology of the isoflavones in soybeans and their food products. **Lymphatic Research and Biology**, v. 1, n. 8, p. 89-98, 2010.

BATTESTIN, V.; MACEDO, G.A. Tannase production by *Paecilomyces variotii*. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 9, p. 1832-1837, 2007.

BATTESTIN, V.; PINTO, G.A.S.; MACEDO, G.A. Biochemical characterization of tannases from *Paecilomyces variotii* and *Aspergillus niger*. **Food Science and Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 243-248, 2007.

BATTESTIN, V.; MACEDO, G.A.; FREITAS, V.A.P. Hydrolysis of epigallocatechin gallate using a tannase from *Paecilomyces variotii*. **Food Chemistry**, v. 108, n. 1, p. 228-233, 2008.

BEHRENS, J.H.; SILVA, M.A.A.P. Atitude do consumidor em relação à soja e produtos derivados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.24, n. 3, p.431-439, 2004.

CAVALLINI; D.C.U.; ROSSI, E.A. Equol: efeitos biológicos e importância clínica de um metabólito das isoflavonas. **Alimentos e Nutrição**, v. 20, n. 4, p. 677-684, 2009.

FAO (Food and Agriculture Organization Of The United Nations). Soymilk and related products. In: **FAO Agricultural Services Bulletin**, n. 97. Technology of production of edible flours and protein products from soybeans. Rome, Italy, 1992. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/t0532e/t0532e09.htm>>. Acesso em: 10 dez. 2013.

FERREIRA, L.R.; MACEDO, J.A.; RIBEIRO, M.L.; MACEDO, G.A. Improving the chemopreventive potential of orange juice by enzymatic biotransformation. **Journal of Food Research International**, v. 51, n. 2, p. 526-535, 2013.

FUKUTAKE, M.; TAKAHSHI, M.; ISHIDA, K. Quantification of genistein and genistin in soybeans and soybean products. **Food Chemistry Toxicology**, v. 34, n. 5, p. 457–461, 1996.

GEORGETTI, S.R. et al. Enhanced *in vitro* and *in vivo* antioxidant activity and mobilization of free phenolic compounds of soybean flour fermented with different β -glucosidase-producing fungi. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, n. 2, p. 459-466, 2009.

* Baseadas na norma NBR 6023, de 2002, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

IZUMI, T. et al. Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in human. **Journal of Nutrition**, v. 130, n. 7, p. 1695–1699, 2000.

KOMATSU, T.R.; BURITI, F.C.A.; SAAD, S.M.I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 3, p. 329-347, 2008.

LAZZAROTTO, J.J.; HIRAKURI, M.H. Evolução e perspectivas de desempenho econômico associadas com a produção de soja nos contextos mundial brasileiro. **Embrapa Soja**, 3. ed., doc. 319, p. 33, 2011.

MACEDO, G.A; MATSUDA, L.K.; BATTESTIN, V. Seleção de fungos produtores de tanase em resíduos vegetais ricos em taninos. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 4, p. 833-838, 2005.

MACEDO, J.A. et al. Increasing the antioxidant power of tea extracts by biotransformation of polyphenols. **Food Chemistry**, v. 126, n. 2, p. 491-497, 2011.

MADEIRA Jr.J.V.; MACEDO, J.A.; MACEDO, G.A. A new process for simultaneous production of tanase and phytase by *Paecilomyces variotii* in solid-state fermentation of orange pomace. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 35, n. 3, p. 477-482, 2012.

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

PARK Y. K. et al. Enrichment of isoflavone aglycones in extracted soybean isoflavones by heat and fungal β -glucosidase. **Food Science-South Korea**, v. 34, p. 14-19, 2001.

SCHONS, P.F. et al. Immobilization of *Paecilomyces variotii* tannase and properties of the immobilized enzyme. **Journal of Microencapsulation**, v. 28, n. 3, p. 211-219, 2011.

SETCHELL. K.D.R.; BROWN, N.M.; LYDEKING-OLSEN, E. The clinical importance of the metabolite equol - A clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. **Journal of Nutrition**, v. 132, n. 12, p. 3577–84, 2002. SETCHELL, K.D.R.; CLERICI, C. Equol: history, chemistry and formation. **Journal of Nutrition**, v. 140, n. 7, p. 1355-1362, 2010.

WANG, H.; MURPHY, P. A. Isoflavone content in commercial soybean foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 8, p. 1666–1673, 1994.

YUAN, J. P., WANG, J. H.; LIU, X. Metabolism of dietary soy isoflavones to equol by human intestinal microflora–implications for health. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 51, n. 7, p. 765– 781, 2007.

CAPÍTULO I

EQUOL: A CHAVE PARA A EFETIVIDADE DAS ISOFLAVONAS DE SOJA?

L.D. Queiros, G.A. Macedo

Formatado segundo as normas da revista “Química Nova”

RESUMO

As isoflavonas, classe importante de fitoestrógenos, são encontradas em níveis elevados na soja e tem sido extensivamente estudadas devido aos seus efeitos benéficos na prevenção e/ou tratamento de muitas doenças hormônio-dependentes, incluindo câncer, sintomas da menopausa, doenças cardiovasculares e osteoporose. No entanto, pesquisas têm revelado que a eficácia clínica destes compostos fenólicos está relacionada à capacidade do indivíduo em biotransformar as isoflavonas a equol, um metabólito da daidzeína produzido exclusivamente pela microbiota intestinal. A eficiência biológica deste composto está relacionada aos seus efeitos anticarcinogênicos, propriedades anti-inflamatórias, maior afinidade por receptores estrogênicos e atividade antioxidante superior às demais isoflavonas. Sabe-se que existem diferenças interindividuais na capacidade de produzir equol, sendo que tal variabilidade pode ser decorrente de fatores genéticos, composição da microflora intestinal, bem como a idade e hábitos alimentares. Portanto sugere-se que a eficácia dos alimentos à base soja difere dependendo da capacidade do indivíduo produzir ou não o equol. Na tentativa de elucidar a importância do principal metabólito da daidzeína, este artigo aborda teoricamente aspectos relacionados ao metabolismo das isoflavonas, atividade biológica, bem como as evidências, clínicas e não clínicas, sobre os fatores que interferem na capacidade de produzir o equol.

Palavras-chave: Isoflavonas, equol, biotransformação, microbiota intestinal.

ABSTRACT

Isoflavones, an important class of phytoestrogens, are found in high levels of soybean and have been extensively studied because of their beneficial effects in the prevention and/or treatment of many hormone-dependent diseases including: cancer, menopausal symptoms, osteoporosis, and cardiovascular diseases. However, studies have shown that the clinical efficacy of these phenolic compounds is related to the consumer's ability to biotransform isoflavones to equol, a metabolite of daidzein exclusively produced by the intestinal microbiota. The biological efficiency of this substance is related to its anticarcinogenic effects, anti-inflammatory properties, greater affinity of estrogen receptors, and antioxidant activity superior to all other isoflavones. Interindividual differences exist in the ability to produce equol, and such variability may be due to genetic factors, the composition of intestinal microflora as well as one's age and eating habits. Therefore, it is suggested that the efficacy of soy-based foods differs depending on the individual's ability to produce equol. In an attempt to elucidate the importance of the major metabolite of daidzein, this review theoretically discusses aspects related to the metabolism of isoflavones, biological activity along with the evidences, both clinical and non-clinical, of the factors that interfere with the ability to produce equol.

Keywords: Isoflavones, equol, biotransformation, intestinal microbiota.

1 INTRODUÇÃO

As isoflavonas, grupo de flavonoides presentes em quantidades relevantes na soja, são uma classe de fenóis heterocíclicos naturais que atuam como fitoestrógenos devido à sua estrutura química muito semelhante ao 17β -estradiol.^{1,2} Nos alimentos, as isoflavonas encontram-se predominantemente na forma de glicosídeos (daidzina, genistina e gliciteína). Porém, diversos estudos apontam que as agliconas (daidzeína, genisteína e gliciteína) são absorvidas mais efetivamente pelo organismo humano sugerindo que as formas glicosídicas precisam ser hidrolisadas para tornarem-se biodisponíveis.^{3,4}

Devido aos seus efeitos potencialmente benéficos para a saúde humana, as isoflavonas têm sido de grande interesse em vários estudos. Pesquisas têm mostrado que indivíduos que ingerem uma dieta rica em isoflavonas possuem ocorrências significativamente mais baixas de doenças cardiovasculares, osteoporose e alguns tipos de câncer.⁵⁻⁸ No entanto, os efeitos benéficos das isoflavonas têm sido atribuídos à capacidade do indivíduo sintetizar o equol.⁹⁻¹¹

Produzido exclusivamente pela ação da microflora intestinal,¹² o equol é um metabólito da daidzeína que tem despertado grande interesse da comunidade científica uma vez que apresenta alta afinidade por receptores estrogênicos, propriedades anti-inflamatórias, exerce efeitos anticarcinogênicos e possui elevada atividade antioxidante.^{8,13-15} No entanto nem todos os indivíduos, mesmo em populações que fazem uso do mesmo tipo de dieta contendo isoflavonas, são capazes de converter a daidzeína a equol, o que levou a classificação de ser um "equol-produtor" ou um "não equol-produtor".^{16,17} Tal variabilidade sugere que a eficácia dos alimentos à base soja difere dependendo da capacidade do indivíduo produzir ou não o equol.

Esta revisão bibliográfica aborda aspectos relacionados ao metabolismo das isoflavonas, diferenças na produção, propriedades biológicas e implicações clínicas do equol.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ISOFLAVONAS

As isoflavonas, compostos químicos fenólicos também chamados de isoflavonoides, têm distribuição limitada na natureza. Embora poucas plantas sintetizem isoflavonas, a sua forma bioativa está contida em poucos vegetais de consumo humano, sendo a soja a maior fonte destes compostos.^{1,2}

Provenientes do metabolismo secundário de plantas, as isoflavonas possuem estrutura básica fenólica muito semelhante à do estrógeno 17 β -estradiol (Figura 1). Esta semelhança estrutural permite a interação com os receptores estrogênicos (ER) no organismo, resultando em efeitos estrogênicos e antiestrogênicos, dependendo do nível de hormônios sexuais endógenos e do receptor (ER α ou ER β).^{18,19}

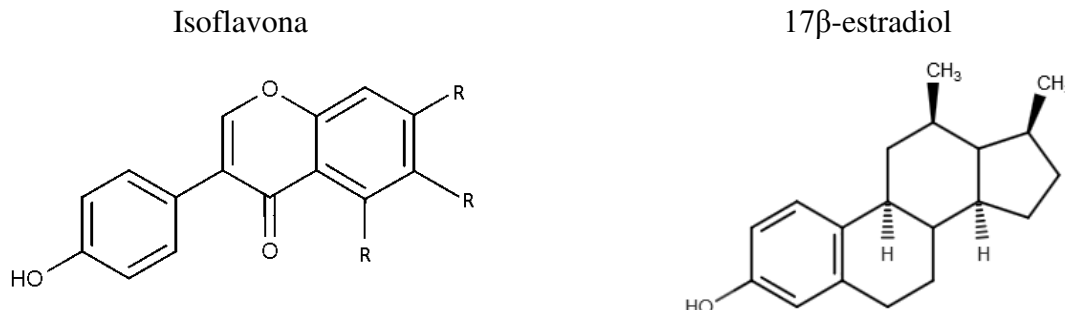
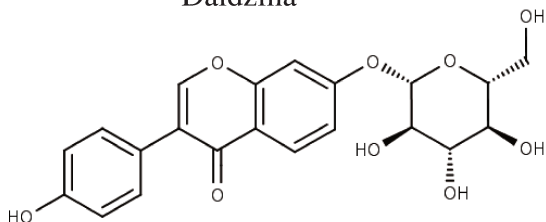


Figura 1. Estrutura da isoflavona e 17 β -estradiol.

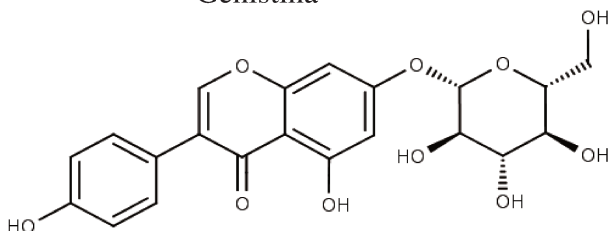
A soja contém três tipos de isoflavonas que se apresentam em quatro diferentes formas: os β -glicosídeos daidzina, genistina e glicitina; as agliconas daidzeína, genisteína e gliciteína; os derivados acetilados, a 6''-O-acetildaidzina, 6''-O-acetilgenistina e 6''-O-acetilglicitina; e os derivados malonilados 6''-O-malonildaidzina, 6''-O-malonilgenistina, 6''-O-malonilglicitina.²⁰⁻²³ As estruturas dos β -glicosídeos e agliconas estão representadas na figura 2.

β -glicosídeos

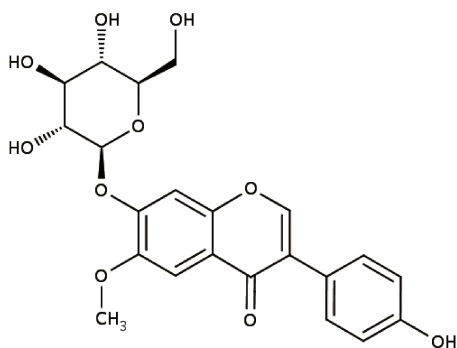
Daidzina



Genistina

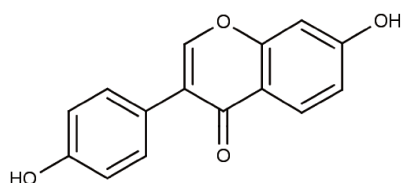


Glicitina

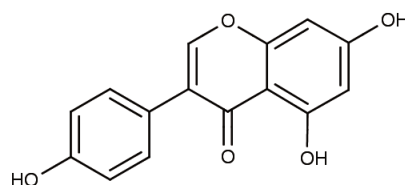


Agliconas

Daidzeína



Genisteína



Gliciteína

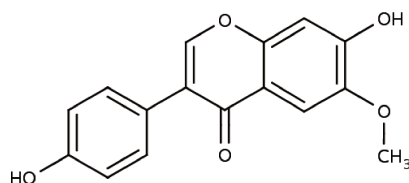


Figura 2. Estrutura química das isoflavonas glicosiladas e agliconas.

Fonte: Adaptado de Lampe (2009)¹⁷

Nos alimentos, as isoflavonas encontram-se, predominantemente, na forma conjugada com açúcares, sendo que a absorção de tais formas glicosídicas não é eficiente pelo organismo humano devido ao seu alto peso molecular e por serem bastante

hidrofílicas.⁴ Somente as isoflavonas livres da molécula de açúcar, as agliconas, são capazes de atravessar a membrana plasmática,³ portanto, as formas glicosídicas necessitam de hidrólise para tornarem-se biodisponíveis (Figura 3). Além de serem mais facilmente absorvidas do que as formas conjugadas, as agliconas mostram uma maior afinidade para os receptores de estrogênio.^{24,25}

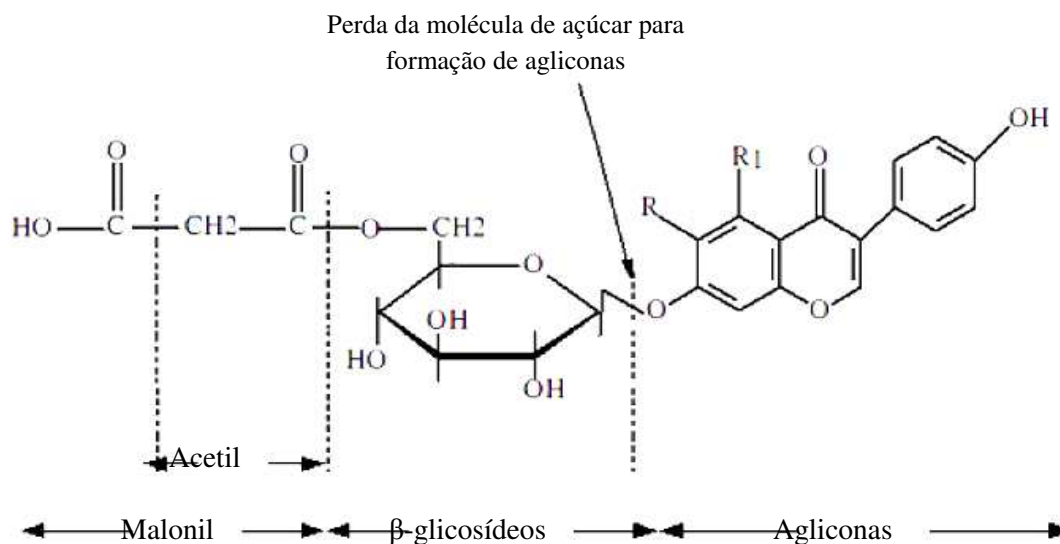


Figura 3. Hidrólise das formas glicosídicas em agliconas.

Fonte: Adaptado de Setchell, Brown, Lydeking-Olsen (2002).⁹

Estudos recentes vêm demonstrando que as isoflavonas podem trazer efeitos benéficos para a saúde, tais como redução do risco de câncer de mama, cólon e próstata, prevenção da osteoporose e de doenças cardiovasculares, ação hipolipemiante e diminuição de alguns sintomas associados à menopausa.⁵⁻⁸ No entanto, pesquisas têm revelado que há uma maior complexidade no paradigma de que a soja da dieta protege contra tais doenças, sendo que os efeitos mencionados acima estão relacionados, em sua maioria, à capacidade de produção de equol no organismo.⁹⁻¹¹

2.2 EQUOL

O equol, assim denominado devido à sua origem equina, foi isolado pela primeira vez em 1932 por Marrian e Haslewood a partir da urina de éguas grávidas. Curiosamente, os pesquisadores observaram que o equol estava presente em grandes quantidades na urina de equinos durante os meses de verão, mas os níveis diminuía no outono e inverno,²⁶ de acordo com o que hoje conhecemos como variação sazonal das isoflavonas nos vegetais.⁵

Posteriormente, poucas informações sobre o equol foram encontradas na literatura científica até que na década de 40 este composto foi associado com uma grave doença reprodutiva em ovelhas, conhecida como “doença do trevo”, devido a presença de isoflavonas estrogênicas em espécies do trevo *Trifolium*.²⁷ Por volta da década de 70, vários trabalhos foram realizados definindo o metabolismo das isoflavonas e ações biológicas do equol.^{28,29} Somente no início dos anos 80, sua estrutura foi completamente elucidada por espectrometria de massa e espectroscopia de ressonância magnética nuclear³⁰ (Figura 4).

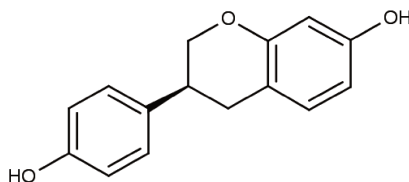


Figura 4. Estrutura química do equol.

O primeiro estudo mostrando que o equol é derivado das isoflavonas de soja da dieta foi relatado por Axelson et al, em 1984.³¹ Estes investigadores mediram o equol na urina de adultos saudáveis após a adição de vários componentes alimentares em uma dieta semissintética. Dentre os alimentos testados, incluindo trigo, centeio, aveia, milho, cevada, alfafa, farinha de soja e feijão branco e marrom, apenas a farinha de soja gerou equol. A partir de então, o equol foi identificado na urina de humanos adultos que consumiam produtos à base de soja e, desde então, foi isolado a partir de um número de fluidos biológicos, incluindo tecido humano da mama, soro, urina e fezes.^{32,33}

O equol [7-hidroxi-3-(4-hidroxifenil)-cromano] é um estrogênio não esteroide da classe das isoflavonas.³⁴ Sua composição molecular é C₁₅H₁₄O₃, e seu peso molecular é de 242.27 daltons. Sua estrutura heterocíclica contém dois grupos hidroxil reativos e um de oxigênio relativamente inerte e não reativo no anel furano central. Físico-quimicamente o equol é uma molécula apolar e pouco solúvel em solução aquosa, o que deve ser considerado na realização de experimentos *in vitro* que o utilizem em altas concentrações.³⁵

Por ser uma isoflavonona, o equol possui um átomo de carbono quiral na posição C-3 podendo ocorrer em duas formas enantioméricas, o R-(+)equol e S-(-)equol que diferem significativamente na estrutura conformacional e apresentam atividades biológicas diferentes.^{12,36}

Estudo realizado por Setchell et al. (2005)¹² demonstrou pela primeira vez que o S-(-)equol é o único enantiômero encontrado no plasma e urina de humanos e que esta exclusividade não é devido a diferenças na biodisponibilidade ou metabolismo do S- e R-equol, mas sim devido ao fato de que as bactérias intestinais são enantioseletivas uma vez que, quando incubadas *in vitro* com isoflavonas de soja ou com daidzeína pura, sintetizam exclusivamente o S-(-)equol.

Além disso, as formas enantioméricas do equol apresentam diferentes comportamentos em relação a afinidade por receptores estrogênicos. A forma S-(-)equol apresenta maior afinidade pelo receptor estrogênico β (ER β) e a forma R-(+)equol exibe preferência pela ligação ao receptor estrogênico α (ER α),³⁷ sendo que ambos os isômeros de equol apresentam maior afinidade para ambos receptores quando comparados com seu precursor, a daidzeína.¹²

Quando sintetizado quimicamente, pode-se obter uma mistura racêmica ($\pm$)equol, sendo esta a forma comercialmente disponível e mais utilizada em estudos para avaliação das propriedades farmacológicas, o que pode sub ou super estimar os efeitos do equol *in vivo*.^{12,38} Portanto, estabelecer o estereoisomerismo da produção equol é importante tanto em vista das possíveis diferenças de ações biológicas dos enantiômeros quanto no auxílio do desenvolvimento de estratégias do uso farmacológico deste isoflavonoide.¹²

2.3 METABOLISMO DAS ISOFLAVONAS E BIOSSÍNTESE DO EQUOL

Enzimas hidrolíticas de bactérias intestinais são responsáveis pela hidrólise das isoflavonas conjugadas,³⁻⁵ liberando as formas biologicamente ativas, ou seja, as agliconas genisteína, daidzeína e, em menor proporção, a gliciteína (Figura 2).³ Após a conversão, cerca de 1/3 das agliconas são absorvidas como isoflavonas livres, sendo o restante fermentado por bactérias do lúmen intestinal resultando em novos metabólitos que são posteriormente absorvidos. Por exemplo, a genisteína é convertida no composto *p*-etilfenol, enquanto a daidzeína pode ser convertida em dihidrodaidzeína, *O*-desmetilangolensina (*O*-DMA) e equol.⁹

Estudo realizado por Setchell et al. (2003), em que mulheres saudáveis no período de pré-menopausa que receberam doses orais de 0.4 e 0.8 mg/Kg de peso de [¹³C] daidzeína e [¹³C] genisteína, mostrou de forma conclusiva que o equol é formado a partir daidzeína e não da genisteína, sendo que as reações de conversão da daidzeína a equol são lentas e a taxa de formação de equol é proporcional às doses de daidzeína administradas.³⁹

A produção de equol requer três passos principais (Figura 5). A daidzina é primeiramente submetida a uma hidrólise para retirar a porção glicosídica e liberar a forma biodisponível, a daidzeína. Esta hidrólise é extremamente eficaz e inicia-se na porção proximal do intestino delgado pela ação tanto da membrana da “borda em escova” quanto pelas β -glicosidases bacterianas.⁴⁰ Após esta metabolização inicial, as isoflavonas agliconas são diretamente absorvidas através do epitélio intestinal ou submetidas à nova metabolização pela ação de bactérias presentes no cólon.^{41,42}

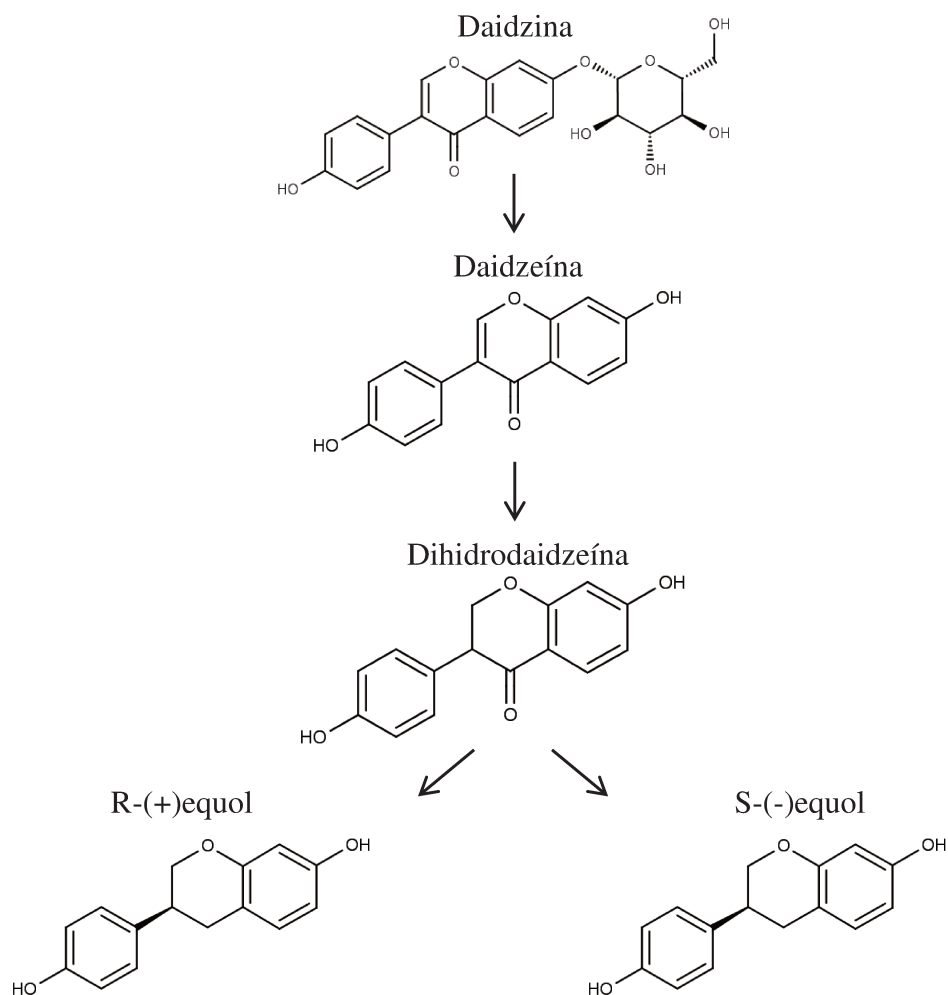


Figura 5. Metabolização da daidzeína para síntese de equol.

Fonte: Adaptado de Rüfer, Kulling (2006).¹⁴

Após a hidrólise, a porção não absorvida é hidrogenada dando origem à diidrodaidzeína (DHD) e esta é então transformada em *O*-desmetilangolensina (*O*-DMA) ou em equol. No entanto, o metabólito *O*-DMA parece ser de pouco interesse na medida em que não apresenta atividade biológica conhecida.⁴³⁻⁴⁵

A biotransformação da daidzeína a equol (Figura 5) é realizada exclusivamente por bactérias intestinais e, provavelmente, pela ação conjunta de várias bactérias.^{9,12,30,46} Vários estudos confirmam o papel crucial da microflora intestinal para a formação do equol.^{41,43} Ratos, nascidos livres de germes, alimentados com uma dieta à base de soja (221 mg de isoflavonas agliconas/Kg peso), não excretam equol na urina,⁴⁷ e falta de equol no

plasma e urina de crianças saudáveis com idade de 4-6 meses, alimentadas exclusivamente com fórmula infantil à base de soja, corrobora com a necessidade de uma microflora ativa para a formação de equol.⁴⁸ Além disso, a incubação de proteína texturizada de soja ou daidzeína com bactérias fecais humanas de adultos, as quais são capazes de sintetizar o equol em condições anaeróbias, confirmou o papel crucial das bactérias intestinais na biotransformação da daidzeína em equol.^{21,49}

Em vários estudos já foram isoladas e identificadas bactérias de origem animal e humana capazes de converter a daidzeína em equol (Tabela 1). No entanto, a eficácia da biotransformação microbiana e a identificação das espécies bacterianas envolvidas na conversão das isoflavonas em formas bioativas é um grande desafio dado a grande diversidade da microbiota intestinal humana.¹²

Tabela 1 - Lista de bactérias intestinais que, cultivadas *in vitro*, foram capazes de biotransformar daidzeína em equol.*

Referência	Cepa bacteriana	Fonte
Tsangalis et al., 2002 ⁵⁰	<i>Bifidobacterium</i>	Humanos
Tsangalis et al., 2002 ⁵⁰	<i>Bifidobacterium animalis</i>	Culturas puras
Ueno; Uchiyama, 2002 ⁵¹	<i>Bacteroides ovatus</i>	Humanos
Rafii et al., 2004 ⁵²	Bactérias fecais	Macacos Rhesus
Decroos et al., 2005 ⁴¹	<i>Finegoldia magna</i>	Humanos
Minamida et al., 2006 ⁵³	<i>Asaccharobacter celatus</i> do 03	Ratos
Wang et al., 2007 ⁵⁴	<i>Lactobacillus</i> sp. Niu-O16	Humanos
Ishimi et al., 2008 ⁵⁵	<i>Lactococcus garvieae</i> (Lc 20-92)	Humanos
Minamida et al., 2008 ⁵⁶	<i>Asaccharobacter celatus</i> 03	Ratos
Matthies et al., 2008 ⁵⁷	<i>Coriobacteriaceae</i> strain Mt1B8	Ratos
Yokoyama; Suzuki, 2008 ⁵⁸	<i>Eggerthella</i> sp. YY7918	Humanos
Yu et al., 2008 ⁵⁹	<i>Eubacterium</i> sp. D1 and D2	Porcos
Matthies et al., 2009 ⁶⁰	<i>Slackia</i> sp. HE8	Humanos
Tsuji et al. 2010 ⁶¹	<i>Slackia</i> sp. strain NATTS	Humanos

*Na maioria dos casos, a estrutura definitiva do produto equol não foi determinada, mas pode-se supor que, em todos os casos, o produto foi o enantiômero S-(-)equol.

O metabolismo das isoflavonas parece variar significativamente entre os indivíduos, uma vez que existe uma variabilidade considerável na biotransformação destes compostos através da ação da microflora intestinal. Embora a presença de bactérias intestinais capazes de converter a dadizeína a equol seja um fator primordial para a produção deste metabólito, componentes dietéticos, como as fibras e prebióticos, fermentação e tempo de trânsito intestinal também desempenham um papel importante na formação do equol, influenciando na absorção e biodisponibilidade deste composto.⁶²⁻⁶⁶

Ohta et al. (2002)⁶⁷ observaram que camundongos alimentados com ração contendo uma mistura de isoflavonas e frutooligossacarídeos (ração controle adicionada de 5% de frutooligossacarídeos e 0,2% de isoflavonas) apresentaram elevação significativa nos níveis plasmáticos de equol ($p < 0,05$), em relação ao grupo que recebeu apenas a dieta com isoflavonas. Tais resultados evidenciam que os prebióticos podem aumentar a biodisponibilidade das isoflavonas e alterar a produção de equol uma vez que estimulam o crescimento e/ou a atividade da microbiota intestinal.⁶⁸

As principais fontes de precursores de equol, por serem alimentos ricos em isoflavonas, são a soja e seus derivados, o trevo vermelho e o kudzu (*Pueraria lobata*), uma espécie nativa do Japão.⁶⁹ No entanto, alimentos de origem vegetal e animal também podem conter equol.⁷⁰⁻⁷⁵

Em estudo realizado por Hounsoume et al. (2009),⁷⁰ em que foram avaliadas mudanças na composição química de repolhos brancos armazenados sob refrigeração durante seis meses de inverno, o equol foi identificado em níveis semelhantes a outros compostos fenólicos e permaneceu estável durante todo o período de armazenamento. Além disso, o equol também foi identificado em alfaces, ervilhas e feijão,⁷¹ mostrando a existência deste isoflavonoide em produtos de origem vegetal.

Dentre os alimentos de origem animal, o leite de vaca e seus derivados são os que podem conter quantidades significativas de equol,⁷²⁻⁷⁵ sendo que o conteúdo deste composto bioativo no leite depende de diversos fatores, tais como a composição e sazonalidade dos constituintes da ração animal. Um total de 26 amostras de leite bovino comercializadas na França foram avaliadas por Antignac et al. (2004)⁷³ quanto ao conteúdo

de equol e apresentaram concentrações deste metabólito numa taxa de 1-29 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$, dados comparáveis com valores encontrados para amostras comercializadas na Austrália (5-29 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$ equol)⁷² e Finlândia (6-32 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$ equol).⁷⁴ Vacas alimentadas com silagem à base de trevo vermelho (*Trifolium pratense*), uma leguminosa forrageira rica em isoflavonoides, produziram leite com altas concentrações de equol (458-643 $\mu\text{g}/\text{L}$) enquanto o leite de vacas alimentadas com uma silagem padrão apresentou baixas concentrações (171-287 μg equol/L).⁷⁵

Em estudo desenvolvido por Kuhnle et al. (2008) com 115 alimentos de origem animal (leite, queijo, manteiga, sorvete, iogurte, ovos, carnes, peixes e frutos do mar), bem como seus substitutos vegetarianos, foram analisados os teores de fitoestrógenos, incluindo isoflavonas totais e equol. As amostras dos alimentos foram adquiridas em, pelo menos cinco supermercados de Cambridgeshire (Reino Unido), sendo de diferentes fabricantes. Foram relatados baixos teores de isoflavonas e equol em todas as amostras de leite e em seus derivados lácteos, sendo os teores médios de 6 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ peso para as isoflavonas e 3 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ peso para o equol. Já as amostras de peixes, frutos do mar e manteiga, nas quais o equol não foi detectado, o teor médio de isoflavonas foi de 4 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ peso para os peixes e frutos do mar e 10 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ peso para a manteiga. Já os substitutos vegetarianos, que em sua maioria eram produtos à base de soja, apresentaram os maiores teores de fitoestrógenos, e, em particular, de isoflavonas, sendo que o leite e iogurte de soja apresentaram quase 500 vezes mais fitoestrógenos quando comparados com seus respectivos produtos à base de leite bovino. Já o equol não foi detectado em todas amostras dos substitutivos vegetarianos.⁷⁶

Existem patentes que relatam composições e produtos contendo equol tanto na forma de mistura racêmica quanto nas formas de S-(-)equol e R-(+)equol, com a finalidade de serem aditivos em preparação de alimentos, suplementos alimentares, fármacos e nutracêuticos. Em sua maioria, os processos para obtenção do equol, ou seus respectivos enantiômeros, envolvem a conversão da daidzeína em equol pela ação de uma cepa de micro-organismo.⁷⁷⁻⁸³ Outra forma de obtenção das duas formas enantioméricas R- e S-equol é através de reações químicas com controle de quiralidade.⁸⁴

2.4 PRODUÇÃO DE EQUOL EM HUMANOS E IMPLICAÇÕES CLÍNICAS

Uma vez estabelecida a relação entre as isoflavonas de soja e em particular a daidzeína e o equol, estudos clínicos verificaram que nem todos os adultos saudáveis são capazes de produzir equol mesmo com o consumo diário de alimentos à base de soja.^{66,85-87} Além disso, mesmo quando doses padronizadas de 50 mg de daidzina e daidzeína são administradas, removendo-se assim qualquer influência da matriz alimentar, muitas pessoas não são capazes de converter a daidzeína a equol.^{21,39} Este fenômeno levou a criação de uma classificação em "equol-produtor" e "não equol-produtor" para descrever tal diferença.^{16,17} Essa variabilidade sugere que os efeitos benéficos para a saúde decorrentes da ingestão dos alimentos à base soja difere dependendo da capacidade do indivíduo produzir ou não o equol.⁹

As razões para tais diferenças ainda não foram totalmente elucidadas, no entanto a composição da microflora intestinal, etnia, idade, sexo, hábitos alimentares e alguns polimorfismos genéticos das enzimas metabólicas humanas parecem ser fatores que influenciam a capacidade do indivíduo em metabolizar a daidzeína em equol.^{85,88-90}

Vários estudos evidenciam que os vegetarianos e os indivíduos de origem asiática são os que apresentam uma maior capacidade para a produção do S-(-) equol e as razões para tal fato estão provavelmente relacionadas nas diferenças significativas da macrocomposição das dietas bem como o consumo regular de alimentos à base de soja por estes grupos.^{9,86,91}

Além disso, aproximadamente 50-55% dos orientais são capazes de produzir S-(-)equol, enquanto apenas 20-35% da população ocidental adulta apresenta esta capacidade.^{32,92} Tal diferença pode ser explicada pelo fato de que a dieta oriental é rica em soja e a proporção do consumo de isoflavonas na forma aglicona é mais elevada do que na forma glicosilada uma vez que os alimentos de soja fermentados, que apresentam maior teor de agliconas, correspondem cerca de um terço do total de alimentos à base de soja consumidos no oriente.^{93,94}

Wiseman et al. (2004),⁹⁵ investigaram se o consumo crônico de soja por homens e mulheres saudáveis tem influência sobre a biodisponibilidade das isoflavonas no organismo humano. Para tanto, analisaram as concentrações plasmáticas e excreção das isoflavonas agliconas, como também possíveis modificações na atividade da microflora intestinal dos indivíduos avaliados. Além disso, os autores analisaram se havia diferença entre os sexos no metabolismo destes compostos. Os resultados mostraram que as concentrações das agliconas, genisteína e daidzeína, e dos metabólitos equol e *O*-DMA, no plasma, urina e fezes, bem como atividade de β -glicosidase fecal, foram significativamente maiores nos indivíduos que consumiram uma dieta rica em soja do que naqueles que consumiram a dieta pobre em soja. Em relação às diferenças entre os sexos dos indivíduos, os resultados mostraram que somente a concentração de *O*-DMA, no plasma e na urina, foi influenciada pelo sexo do indivíduo, sendo as taxas deste metabólito maiores em homens do que em mulheres.

Em um estudo realizado com mulheres em período de pós-menopausa, que ingeriram 100 mg/dia de isoflavonas agliconas através de barras de cereais e iogurtes, foi verificado um aumento de três vezes no teor de equol na concentração plasmática e excreção urinária naquelas mulheres “produtoras de equol”. No entanto, em estudo realizado por Vedrine et al. (2006)⁸⁵ a administração crônica das isoflavonas não foi capaz de induzir a capacidade de produzir equol naquelas “não produtoras de equol”. Os mesmos resultados foram relatados em outros três estudos que testaram a exposição a dietas enriquecidas com isoflavonas num período de 4-10 semanas.⁹⁶⁻⁹⁸ Tal estabilidade do fenótipo “equol-produtor” levanta a possibilidade de que a predisposição genética do indivíduo pode influenciar o perfil das bactérias intestinais, determinando a existência ou não de bactérias produtoras de equol.⁹⁹

Outros estudos que também avaliaram a administração crônica de isoflavonas mostraram que os indivíduos capazes de produzir equol (classificados a partir da análise da concentração de equol no soro e urina) parecem manter-se “produtores de equol” ao longo de um período de dois anos de estudo.^{9,91} Demais pesquisadores também sugerem que, a menos que uma pessoa esteja em uso crônico de antibióticos, a capacidade de produzir equol mantem-se relativamente estável.^{97,100,101}

Como um polifenol, o equol apresenta a capacidade de ser um doador de elétrons e, portanto, pode combater radicais livres do organismo. Sua capacidade antioxidante é superior a das isoflavonas agliconas, daidzeína e genisteína, quando medida *in vitro*.^{13,14} Além disso, estudos comparativos de análise de compostos fenólicos demonstraram que o equol é um potente antioxidante, exibindo capacidade antioxidante superior em relação às vitaminas C e E em vários testes *in vitro*.¹⁴

Em estudos de comportamento farmacocinético que avaliaram a cinética plasmática da daidzeína, genisteína e equol em adultos saudáveis, que receberam uma dose padrão de 50 mg dos isoflavonoides analisados, foi demonstrado que o equol apresenta biodisponibilidade superior quando comparado com a biodisponibilidade de genisteína e daidzeína.^{21,39} Além disso, estudo realizado com ratos mostrou que a taxa de depuração de equol é significativamente mais lenta do que a das isoflavonas de soja, o que contribui para a manutenção de concentrações elevadas de equol circulante no plasma.¹⁰²

Em estudo no qual foi investigado os efeitos da daidzeína sobre o estresse oxidativo e sistema de defesa antioxidante em fígado de ratos, tratados por 4 semanas com 20 mg/dia de daidzeína dissolvida em óleo de milho, os resultados mostraram que os efeitos de inibição da peroxidação lipídica e redução na concentração de glutathione em células neuronais corticais dos animais estão associados com o principal metabólito desta isoflavona, o equol.¹⁰³

Estudos mostram que o equol também é capaz de inibir a produção de radical superóxido (O_2^-) e estimular a produção de óxido nítrico livre (NO), prevenindo assim a oxidação da LDL.^{5,104} Além disso, o equol apresenta atividade vasodilatadora, induzindo o relaxamento endotelial NO-dependente, sendo assim capaz de atuar na redução do risco de doenças cardiovasculares.^{105,106}

No que diz respeito aos marcadores de risco cardiovascular, Clerici et al. (2007),¹⁰⁷ realizaram um ensaio randomizado controlado com placebo com 62 homens e mulheres que apresentavam hipercolesterolemia e que receberam uma dieta a base de massa enriquecida com isoflavonas agliconas (33 mg/dia). Os autores observaram uma redução

dos níveis de colesterol total e lipoproteína de baixa densidade (LDL), bem como a redução da rigidez arterial, em maior intensidade nos indivíduos produtores de equol.

Como implicação clínica, o equol também apresenta propriedades relevantes na prevenção da perda de massa óssea¹⁰⁸ como foi observado no estudo realizado por Taku et al. (2010),¹⁰⁹ que demonstraram que a suplementação de 10 mg/dia de S-(-)equol impediu a diminuição na densidade mineral óssea em mulheres japonesas, não produtoras de equol e se encontravam em período de pós-menopausa, sem efeitos adversos.

Estudos epidemiológicos¹¹⁰⁻¹¹⁴ mostram de forma consistente que indivíduos equol produtores apresentam um risco significativamente reduzido de desenvolver câncer de próstata. Jackson et al. (2010)¹¹³ avaliaram a relação das concentrações urinárias de fitoestrógenos com câncer de próstata em um estudo caso-controle em uma sede hospitalar na Jamaica. Foram analisadas amostras de urina a partir casos diagnosticados (n=175) e controles (n=194). Como resultado, foi verificado que os homens que apresentaram maior concentração de equol na urina mostraram uma redução significativa para o risco de câncer de próstata.

Devido à similaridade com o hormônio feminino 17 β -estradiol, as isoflavonas têm sido utilizadas como uma alternativa de tratamento de reposição hormonal a fim de minimizar os sintomas e efeitos da menopausa.⁵ Jou et al. (2008)¹¹⁵ realizaram um estudo clínico para avaliar o efeito da ingestão diária de 135 mg de isoflavonas nos sintomas da menopausa em mulheres produtoras e não produtoras de equol. Após seis meses de estudo, os autores concluíram que a suplementação com isoflavonas era eficaz na redução dos sintomas da menopausa (fraqueza, palpitação, ondas de calor, transpiração excessiva) somente nas mulheres produtoras de equol.

Apesar das fortes evidências que apontam para a importância do equol na prevenção de doenças crônicas, alguns estudos clínicos não foram capazes de comprovar a efetividade desse metabólito em marcadores de risco cardiovascular e osteoporose.^{116,117} No entanto, na maior parte dos estudos clínicos, os efeitos benéficos relatados foram mais evidenciados nos indivíduos capazes de converter a daidzeína a equol.^{107,111,115}

3 CONCLUSÕES

O equol tem despertado grande interesse da comunidade científica devido a sua eficiência biológica e implicações clínicas decorrentes da sua alta afinidade por receptores estrogênicos, propriedades anti-inflamatórias, efeitos anticarcinogênicos e atividade antioxidante superior às demais isoflavonas.⁸⁻¹¹

No entanto, nem todos os indivíduos apresentam a capacidade de biotransformar as isoflavonas a equol,^{16,17} sendo vários os fatores que influenciam em tal capacidade.⁸⁸⁻⁹⁰ Portanto, compreender o porquê da variação de produção de equol entre os indivíduos, bem como analisar os processos de obtenção do equol, torna-se importante uma vez que a capacidade individual de sintetizar o equol parece ser um fator limitante para a magnitude dos efeitos observados em decorrência da ingestão das isoflavonas.⁹

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Allred, C. D.; Allred, K. F.; Ju, Y. H.; Goepfing, T. S.; Doerge, D. R.; Helferich, W. G.; *Carcinogenesis* **2004**, 25, 1649.
2. Pimentel, B. M. V.; Francki, M.; Gollücke, B. P. São Paulo: Editora Varela. **2005**. 14p.
3. Pascual-Teresa, S.; *Journal of Nutritional Biochemistry* **2006**, 17, 257.
4. Liu, Y.; Hu, M.; *Drug metabolism and disposition* **2002**, 30, 370.
5. Cavallini, D. C. U.; Rossi, E. A.; *Alimentos e Nutrição* **2009**, 20, 677.
6. Ishimi, Y.; *The Journal of Nutrition* **2010**, 140, 1373.
7. Usui, T.; Tochiya, M.; Sasaki, Y.; Muranaka, K.; Yamakage, H.; Himeno, A.; et al.; *Clinical Endocrinology* **2013**, 78, 365.
8. Virk-Baker, M. K.; Barnes, S.; Krontiras, H.; Nagy, T. R.; *Nutrition Research*, **2014**, 34, 116.
9. Setchell, K. D. R.; Brown, N. M.; Lydeking-Olsen, E.; *Journal of Nutrition* **2002**, 132, 3577.
10. Shor, D.; Sathyapalan, T.; Atkin, S.L.; Thatcher, N.J.; *European Journal of Nutrition* **2012**, 51, 389.
11. Crawford, S. L.; Jackson, E. A.; Churchill, L.; Lampe, J. W.; Leung, K.; Ockene, J. K.; *Menopause* **2013**, 9, 911.
12. Setchell, K. D.; Clerici, C.; Lephart, E. D.; Cole, S. J.; Heenan, C.; Castellani, D.; et al.; *American Journal of Clinical Nutrition* **2005**, 81, 1072.
13. Turner, R.; Baron, T.; Wolfram, S.; Minihane, A. M.; Cassidy, A.; Rimbach, G.; Weinberg, P.D.; *Free Radical Research* **2004**, 38, 209.
14. Rüfer, C.E.; Kulling, S.E.; *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **2006**, 54, 2926.

15. Wei, X.J.; Wu, J.; Ni, Y. D.; Lu, L. Z.; Zhao, R. Q.; *In Vitro Cellular & Developmental Biology Animal Journal* **2011**, 47, 735.
16. Atkinson, C.; Frankenfeld, C.L.; Lampe, J. W.; *Experimental Biology and Medicine* **2005**, 230, 155.
17. Lampe, J. W.; *American Journal of Clinical Nutrition* **2009**, 89, 1664.
18. Messina, M. J.; *American Journal of Clinical Nutrition* **1999**, 70, 439.
19. Setchell, K. D. R.; *American Journal of Clinical Nutrition* **1998**, 68, 133.
20. Kudou, D.; Fleury, Y.; Welti, D.; Magnolato, D.; Uchida, T.; Kitamura, K.; Okubo. K.; *Agricultural Biology Chemistry* **1991**, 55, 2227.
21. Setchell, K. D. R.; Brown, N. M.; Desai, P.; Zimmer-Nechemias, L.; Wolfe, B. E.; et al; *The Journal of Nutrition* **2001**, 131, 1362.
22. Lee, S. J.; Ahn, J.K.; Kim, S. H.; Kim, J. T.; Han, S. J.; JUNG. M. Y.; et al.; *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003**, 51, 3382.
23. Pyo, Y. H.; Lee, T. C.; Lee, Y. C.; *Food Research International* **2005**, 38, 551.
24. McCue, P.; HoriI, A.; Shetty, K.; *Innovative Food Science and Emerging Technologies* **2004**, 5, 385.
25. Setchell, K. D. R.; *The Journal of Nutrition* **2000**, 130, 654.
26. Marrian, G. F.; Haslewood, G. A. D.; *Journal of Biochemistry* **1932**, 26, 1226.
27. Bennetts, H. W.; Underwood, E. J.; Shier, F. L.; *Journal of Agricultural Research* **1946**, 22, 131.
28. Shutt, D.; Braden, A.; *Australian Journal of Agricultural Research* **1968**; 19, 545.
29. Lindsay, D. R.; Kelly, R. W.; *Australian Veterinary Journal* **1970**, 46, 219.
30. Axelson, M.; Kirk, D. N.; Farrant, R. D.; Cooley, G.; Lawson, A. M.; Setchell, K. D. R.; *Journal of Biochemistry* **1982**, 201, 353.
31. Axelson, M.; Sjövall, J.; Gustafsson, B. E.; Setchell, K. D. R.; *Journal of Endocrinology* **1984**, 102, 49.

32. Watanabe, S.; Yamaguchi, M.; Sobue, T.; Takahashi, T.; Miura, T.; Arai, Y.; Mazur, W.; Wahala, K.; Adlercreutz, H.; *Journal of Nutrition* **1998**, *128*, 1710.
33. Maubach, J.; Depypere, H.T.; Goeman, J.; Van der Eycken, J.; Heyerick, A.; Bracke, M. E.; Blondeel, P.; De Keukeleire, D.; *Obstetrics & Gynecology* **2004**, *103*, 892.
34. Kenneth, D. R. S.; Nadine, M. B.; Eva, L. O.; *Journal of Nutrition* **2002**, *132*, 3577.
35. Chang, H. S.; Robinson, A. R.; Common, R. H.; *Anal Biochemistry* **1975**, *63*, 290.
36. Lamberton, J. A.; Soares, H.; Watson, K. G.; *Australian Journal of Chemistry* **1978**, *31*, 455.
37. Muthyala, R. S.; Ju, Y. H.; Sheng, S.; Willians, L. D.; Doerge, D. R.; Katzenellenbogen, B. S.; et al.; *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2004**, *12*, 1559.
38. Sadler, M. J.; *Nutrition Bulletin* **2006**, *31*, 150.
39. Setchell, K. D. R.; Faughnan, M. S.; Avades, T.; Zimmer-Nechemias, L.; Brown, N. B.; Wolfe, B.; et al.; *American Journal of Clinical Nutrition* **2003**, *77*, 411.
40. Day, A. J.; DuPont, M. S.; Ridley, S.; Rhodes, M.; Rhodes M. J.; Morgan, M. R.; et al.; *FEBS Letters* **1998**, *436*, 71.
41. Decroos, K.; Vanhemmens, S.; Cattoir, S.; Boon, N.; Verstraete, W.; *Archives of Microbiology* **2005**, *183*, 45.
42. Zubik, L.; Meydani, M.; *American Journal of Clinical Nutrition* **2003**, *77*, 1459.
43. Arai, Y.; Uehara, M.; Sato, Y.; Kimira, M.; Eboshida, A.; Adlercreutz, H.; Watanabe, S.; *Journal of Epidemiology* **2000**, *10*, 127.
44. Chang, Y. C.; Nair, M. G.; *Journal of Natural Products* **1995**, *58*, 1892.
45. Lund, T. D.; Munson, D. J.; Haldy, M. E.; Setchell, K. D. R.; Lephart, E. D.; Handa, R. J.; *Biology of Reproduction* **2004**, *70*, 1188.
46. Atkinson, C.; Newton, K. M.; Bowles, E. J.; Yong, M.; Lampe, J. W.; *American Journal of Clinical Nutrition* **2008**, *87*, 679.

47. Bowey, E.; Adlercreutz, H.; Rowland, I.; *Food Chemistry and Toxicology* **2003**, *41*, 631.
48. Setchell, K. D. R.; Zimmer-Nechemias, L.; Cai, J.; Heubi, J. E.; *The Lancet* **1997**, 350, 907, 23.
49. Atkinson, C.; Berman, S.; Humbert, O.; Lampe, J. W.; *Journal of Nutrition* **2004**, *134*, 596.
50. Tsangalis, D.; Ashton, J. F.; McGill, A. E. J.; Shah, N. P.; *Journal of Food Science* **2002**, *6*, 3104.
51. Ueno, T.; Uchiyama, S.; *Annals of Nutrition and Metabolism* **2002**, *45*, 114.
52. Raffi, F.; Hotchkiss, C.; Heinze, T. M.; Park, M.; *Comparative Medicine Journal* **2004**, *54*, 165.
53. Minamida, K.; Tanaka, M.; Abe, A.; Sone, T.; Tomita, F.; Hara, H.; Asano, K.; *Journal of Bioscience and Bioengineering* **2006**, *102*, 247.
54. Wang, X. L.; Kim, H. J.; Kang, S. I.; Kim, S. I.; Hur, H. G.; *Archives of Microbiology* **2007**, *187*, 155.
55. Ishimi, Y.; Oka, J.; Tabata, I.; Ohtomo, T.; Ezaki, J.; Ueno, T.; et al.; *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* **2008**, *43*, 48.
56. Minamida, K.; Ota, K.; Nishimukai, M.; Tanaka, M.; Abe, A.; Sone, T.; et al.; *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **2008**, *58*, 1238.
57. Matthies, A.; Clavel, T.; Gutschow, M.; Engst, W.; Haller, D.; Blaut, M.; Braune, A.; *Applied and Environmental Microbiology* **2008**, *74*, 4847.
58. Yokoyama, S.; Suzuki, T.; *Bioscience and Biotechnology Biochemistry* **2008**, *72*, 2660.
59. Yu, Z. T.; Yao, W.; Zhu, W. Y.; *FEMS Microbiology Letters* **2008**, *282*, 73.
60. Matthies, A.; Blaut, M.; Braune, A.; *Applied and Environmental Microbiology* **2009**, *75*, 1740.
61. Tsuji, H.; Moriyama, K.; Nomoto, K.; Miyanaga, N.; Akaza, H.; *Archives of Microbiology* **2010**, *192*, 279.

62. Nagata, C.; Ueno, T.; Uchiyama, S.; Nagao, Y.; Yamamoto, S.; Shibuya, C.; et al.; *Nutrition and Cancer* **2008**, *60*, 49.
63. Larkin, T.; Price, W. E.; Astheimer, L.; *Critical reviews in food science and nutrition* **2008**, *48*, 538.
64. Tousen, Y.; Uehara, M.; Kruger, M. C.; Ishimi, Y.; *Journal of Nutrition Science* **2012**, *1*, 1.
65. Tousen, Y.; Uehara, M.; Abe, F.; Kimira, Y.; Ishimi, Y.; *Nutrition Journal* **2013**, *12*, 127.
66. Rowland, I. R.; Wiseman, H.; Sanders, T. A.; Adlercreutz, H.; Bowey, E. A.; *Nutrition and Cancer* **2000**, *36*, 27.
67. Ohta, A.; Uehara, M.; Sakai, K.; Takasai, M.; Adlercreutz, H.; Morohashi, T.; et al.; *Journal of Nutrition*, **2002**, *132*, 2048.
68. Gibson, G. R.; Probert, H. M.; Loo, J. V.; Rastall, R. A.; Roberfroid, M. B.; *Nutrition Researches Reviews* **2004**, *17*, 259.
69. Benlhabib, E.; Baker, J. I.; Keyler, D. E.; Singh, A. K.; *Biomeical Chromatography* **2004**, *18*, 367.
70. Hounsome, N.; Hounsomeb, B.; Tomosc, D.; Edwards-Jonesa, G.; *Postharvest Biology and Technology* **2009**, *52*, 173.
71. Hounsome, N.; Grail, B.; Tomos, D.; Hounsome, B.; Edwards-Jones, G.; *Functional Plant Science & Biotechnology* **2010**, *4*, 10.
72. King, R. A.; Mano, M. M.; Head, R. J.; *Journal of Dairy Research* **1998**, *65*, 479.
73. Antignac, J.-P.; Cariou, R.; Le Bizec, B.; Andre, F.; *Food Chemistry* **2004**, *87*, 275.
74. Hoikkala, A.; Mustonen, E.; Saastamoinen, I.; Jokela, T.; Taponen, J.; Saloniemi, H.; et al.; *Molecular Nutrition & Food Research*, **2007**, *51*, 782.

75. Mustonen, E. A.; Tuori, M.; Saastamoinen, I.; Taponen, J.; Wähälä, K.; Saloniemi, H.; *British Journal of Nutrition* **2009**, *102*, 1552.
76. Kuhnle, G. G.; Dell'Aquila, C.; Aspinall, S. M.; Runswick, S. A.; Mulligan, A. A.; Bingham, S. A.; *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **2008**, *56*, 100.
77. Setchell, K. D. R.; Cole, S. J.; US patent. **2014**. (*US 10140039046 A1*).
78. Uchiyama, S.; Ueno, T.; Kumenura, M.; Imaizumi, K.; Masaki, K.; Shimizu, S.; US patent. **2004**. (*US 6716424 B1*).
79. Yoshikazu, S. Y.; Masayuki, T.; Takashi, H.; Norihiro, M.; Yasuhiro, A.; Tadaaki, O.; Ikutaro, S.; Tokyo patent. **2010**. (*EP 2228441-A*).
80. Steffan, B.; US patent. **2010**. (*2010018119 A1*).
81. Schmid, J. D.; Germany patent. **2009**. (*EP 2133080-A1*).
82. Isono, Y.; Mori, H.; Ueno, T.; Endo, R.; Kumemura, M.; Abiru, Y.; Uchiyama, S.; Hong Kong patent. **2011**. (*EP 2335500 A1*).
83. Uchiyama, S.; Ueno, T.; Suzuki, T.; US patent. **2014**. (*20140050703 A1*).
84. Messina, M.; Watanabe, S.; Setchell, K. D. R.; *Journal of Nutrition* **2009**, *139*, 796.
85. Védrine, N.; Mathey, J.; Morand, C.; Brandolini, M. et al.. *European Journal of Clinical Nutrition* **2006**, *60*, 1039.
86. Setchell, K. D. R.; Cole, S. J.; *Journal of Nutrition* **2006**, *136*, 2188.
87. Setchell, K. D. R.; Clerici, C.; *Journal of Nutrition* **2010**, *140*, 1355.
88. Lampe, J. W.; *American Journal of Clinical Nutrition* **2009**, *89*, 1664.
89. Tousen, Y.; Uehara, M.; Abe, F.; Kimira, Y.; Ishimi, Y.; *Nutrition Journal* **2013**, *12*, 127.
90. Setchell, K. D.; Clerici, C.; *Journal of Nutrition* **2010**, *140*, 1355.
91. Setchell, K. D.R.; Brown, N. M.; Summer, S.; King, E. C.; Heubi, J. E.; Cole, S.; et al.; *Journal of Nutrition* **2013**, *143*, 1950.

92. Arai, Y.; Uehara, M.; Sato, Y.; Kimira, M.; Eboshida, A.; Adlercreutz, H.; Watanabe, S.; *Journal of Epidemiology* **2000**, *10*, 127.
93. Wakai, K.; Egami, I.; Kato, K.; Kawamura, T.; Tamakoshi, A. Y. L.; Nakayama, T.; Wada, M.; Ohno, Y.; *Nutrition and Cancer* **1999**, *33*, 139.
94. Somekawa, Y.; Chiguchi, M.; Ishibashi, T.; Aso, T.; *Obstetrics & Gynecology* **2001**, *97*, 109.
95. Wiseman, H.; Casey, K.; Bowey, E. A.; Duffy, R.; Davies, M.; Rowland, I. R.; et al.; *American Journal of Clinical Nutrition* **2004**, *80*, 692.
96. Lu, L. J.; Lin, S. N.; Grady, J. J.; Nagamani, M.; Anderson, K. E.; *Nutrition and Cancer* **1996**, *26*, 289.
97. Lampe, J. W.; Skor, H. E.; Li, S.; Wahala, K.; Howald, W. N.; Chen, C.; *Journal of Nutrition* **2001**, *131*, 740.
98. Wiseman, H.; Casey, K.; Bowey, E. A.; Duffy, R.; Davies, M.; Rowland, I. R.; Lloyd, A. S.; Murray, A.; Thompson, R.; Clarke, D. B.; *American Journal of Clinical Nutrition* **2004**, *80*, 692.
99. Hong, K. W.; Ko, K. P.; Ahn, Y.; Kim, C. S.; Park, S. J.; Park, J. K.; et al.; *Genes & Nutrition* **2012**, *7*, 567.
100. Ko, T. F.; Tsai, H. S.; Lin, S. M.; Liu, C. D.; Learn, S. P.; Chiou, R.Y.; *Journal of Food Science* **2010**, *75*, 306.
101. Frankenfeld, C. L.; Atkinson, C.; Thomas, W. K.; Gonzalez, A.; Jokela, T.; Wähälä, K.; Schwartz, S. M.; Li, S. S.; Lampe, J. W.; *British Journal of Nutrition* **2005**, *94*, 873.
102. Brown, N. M.; Setchell, K. D. R.; *Laboratory Investigation (journal)* **2001**, *81*, 735.
103. Choi, E. J; *European Journal of Pharmacology* **2006**, *542*, 162.
104. Hwang, J.; Wang, J.; Morazzoni, P.; Hodis, H. N.; Sevanian, A.; *Free Radical Biology and Medicine* **2003**, *34*, 1271.
105. Jackman, K. A.; Woodman, O. L.; Chrissobolis, S.; Sobey, C. G.; *Brain Research* **2007**, *1141*, 99.

106. Cheng, C.; Wang, X.; Weakley, S. M.; Kougias, P.; Lin, P. H.; Qizhi, Y.; Chen, C.; *Journal of Nutrition* **2010**, *140*, 12.
107. Clerici, C.; Setchell, K. D. R.; Battezzati, P. M.; Pirro, M.; Giuliano, V.; Asciutti, S.; Castellani, D.; Nardi, E.; Sabatino, G.; et al.; *Journal of Nutrition* **2007**, *137*, 2270.
108. Tousein, Y.; Abe, F.; Ishida, T.; Uehara, M.; Ishimi, Y.; *Metabolism* **2011**, *60*, 1425.
109. Taku, K.; Melby, M. K.; Takebayashi, J.; Mizuno, S.; Omori, T.; Watanabe, S.; *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, **2010**, *19*, 33.
110. Kurahashi, N.; Iwasaki, M.; Inoue, M.; Sasazuki, S.; Tsugane, S.; *Journal of Clinical Oncology* **2008**, *26*, 5923.
111. Park, S. Y.; Wilkens, L. R.; Franke, A. A.; Le Marchand, L.; Kakazu, K. K.; Goodman, M. T.; et al.; *British Journal of Cancer* **2009**, *101*, 185.
112. Travis, R. C.; Spencer, E. A.; Allen, N. E.; Appleby, P. N.; Roddam, A. W.; Overvad, K.; et al.; *British Journal of Cancer* **2009**, *100*, 1817.
113. Jackson, M. D.; McFarlane-Anderson, N. D.; Simon, G. A.; Bennett, F. I.; Walker, S. P.; *Cancer Causes Control*, **2010**, 249-57.
114. Miyanaga, N.; Akaza, H.; Hinotsu, S.; Fujioka, T.; Naito, S.; Namiki, M.; et al.; *Cancer Science* **2012**, *103*, 125.
115. Jou, H. J.; Wu, S.C.; Chang, F. W.; Ling, P. Y.; Chu, K. S.; Wu, W. H.; *International Journal of Gynecology & Obstetrics* **2008**, *102*, 44.
116. Brink, E.; Coxam, V.; Robins, S.; Wahala, K.; Cassidy, A.; Branca, F.; *American Journal Clinical of Nutrition* **2008**, *87*, 761.
117. Thorp, A. A.; Howe, P. R.; Mori, T. A.; Coates, A. M.; Buckley, J. D.; Hodgson, J.; Mansour, J.; Meyer, B. J.; *American Journal of Clinical Nutrition* **2008**, *88*, 298.

CAPÍTULO II

ENRICHMENT OF EQUOL AND BIOACTIVE ISOFLAVONES IN SOYMILK BY BIOTRANSFORMATION USING LACTIC ACID BACTERIA AND TANNASE

L.D. Queiros^a, J.A. Macedo^b, G.A. Macedo^a

Formatado segundo as normas da revista “Food Chemistry”

ABSTRACT

Soy isoflavones have received considerable attention for their health-promoting potential. The soybean aglycones daidzein and genistein have proven beneficial functions, demonstrated by *in vitro* and *in vivo* studies. However, recent works have suggested the importance of equol, a daidzein metabolite formed by intestinal bacteria that seems to be superior to all other isoflavones in its biological effects. The goal of this work was evaluate the viability of producing equol using *in vitro* bioprocess from soymilk. Three biotransformation processes of soymilk were proposed based in soymilk fermentation by probiotic lactic acid bacteria strains and tannase application, obtained from *Paecilomyces variotti*. It was demonstrated that all three biotransformation processes were able to biotransform glucosides isoflavones to aglycones and led to an increasing of equol content. Furthermore, these processes were very effective in increasing the total phenolic content and potential antioxidant (ORAC and DPPH) of biotransformed samples. The results suggest that fermentative process or enzymatic biotransformation with tannase was an efficient strategies to improve bioactive potential of soymilk.

Keywords: soymilk, isoflavones, equol, tannase, biotransformation, antioxidant activity.

1 INTRODUCTION

Soybeans have attracted considerable attention worldwide for their health-promoting and disease-preventing effects, which are mainly attributed to isoflavones, a group of flavonoids present in relevant amounts in soybean and soybean-based products. Isoflavones are a class of natural heterocyclic phenols which act as phytoestrogen compounds due to their structurally and functionally similar to 17β -estradiol and show a weak estrogenic activity (being able to show estrogenic or anti-estrogenic effects, according to the situation), as well as antioxidant properties (Mueller, Chae, & Korach, 2004).

The composition and distribution of different chemical forms of isoflavones in soy-based products can be affected during processing methods (Chien, Hsieh, Kao, & Chen, 2005). In native soybeans, isoflavones exist mainly as glucoside forms. However, some food processing, such as fermentation, converts the glucosides into their respective aglycone forms (Coward, Smith, Kirk, & Barne, 1998). These changes on isoflavone composition may affect the bioavailability of soy isoflavones in soy products, once the aglycones are known to be more bioactive than their respective glucosides (Xu, Harris, Wang, Murphy, & Hendrich, 1995).

Epidemiological and clinical studies have shown several possible mechanisms for the health-promoting effect of isoflavones that include the alleviation of postmenopausal syndrome and the prevention of osteoporosis, cancer and cardiovascular disease (Albulescu & Popovici, 2007; Barnes, 2010; Pan, Lai, & Ho, 2010; Wang, Wan, Lu, Kao, & Chen, 2009). However, these effects seem to depend on individual ability to transform soy isoflavones to equol (Setchell, Brown, & Lydeking-Olsen, 2002). There are great interethnic variations in this conversion capacity (Akaza et al., 2004; Song et al., 2006).

Marrian and Haslewood, in 1932, were the first researchers to isolate equol from the urine of pregnant mares and elucidated its chemical structure (Marrian & Haslewood, 1932). Equol [7-hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)-chroman] is a nonsteroidal estrogen of the isoflavonone class formed in the biotransformation of the dietary soy isoflavones daidzin and daidzein (Kenneth, Nadine, & Eva, 2002; Muthyala et al., 2004). It is exclusively a metabolic product of intestinal bacterial metabolism and it possesses estrogenic activity,

having affinity for both estrogen receptors, ER α and ER β . (Atkinson, Newton, Bowles, Yong & Lampe, 2008; Yuan, Wang, & Liu, 2007).

Equol can be produced in majority of animals, including rodents. However, only approximately 30-50% of humans individuals who consume soy foods produce equol (Setchell, & Clerici, 2010). Several recent studies suggest that those who are equol producers show more favorable responses to soy isoflavone-containing diets, indicating that the metabolite equol has greater biological potency than either daidzein or genistein (Setchell et al., 2002). For this reason, associate with the interest in the development of bioprocesses for the production or extraction of bioactive compounds from natural sources, there is considerable interest in using isolated equol as a pharmaceutical or nutraceutical agent, as well as a food additive for health promoter (Yee et al., 2008).

Tannin acyl hydrolases, commonly referred to as tannase (E.C. 3.1.1.20), is an extracellular enzyme and its production is inducible in presence of tannic acid by fungi, yeast and bacteria (Lekha; Losane, 1997; Battestin & Macedo, 2007a). Tannase have mostly been characterised by their activity on complex polyphenolics and are able to hydrolyse the ester bond (galloyl ester of an alcohol moiety) and the depside bond (galloyl ester of gallic acid) of substrates such as tannic acid, epicatechin gallate, epigallocatechin gallate, and chlorogenic acid (Garcia-Conesa, Ostergaard, Kauppinen, & Williamson, 2001; Battestin; Macedo; & de Freitas, 2008).

Based on these information, microbial and/or enzymatic process were performed in this study with the purpose of biotransforming the soymilk isoflavones (daidzin and genistin) and increase equol concentration, in this way, modifying the biological activity and improving the nutraceutical potential of this product.

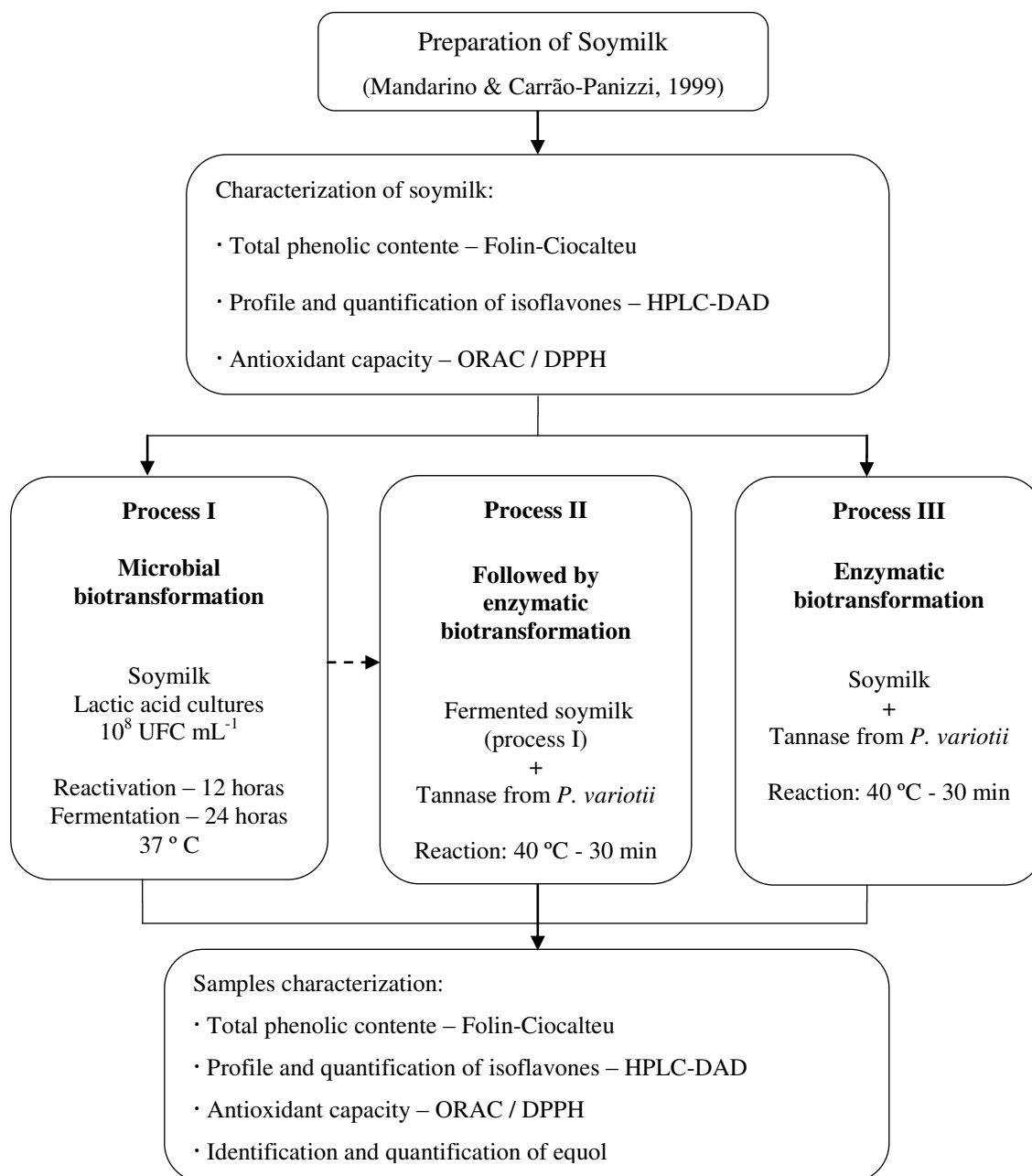
2 MATERIALS AND METHODS

2.1. MATERIALS

Soybean (*Glycine max*) was purchased at a local supermarket (Nattus, Campinas, SP, Brazil). Daidzin, genistin, daidzein, genistein, equol, tannic acid, gallic acid 2,2'-azobis (2-methylpropionamidine) (AAPH) (97%), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) were

purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Fluorescein was purchased from ECIBRA (SP, Brazil), and Trolox® (97%) was purchased from Acros Organics (Belgium). The commercial cultures of lactic acid bacteria and bifidobacteria were donated by Chr. Hansen Ind. & Com. Ltda (Valinhos, São Paulo, Brazil). HPLC grade methanol was from J.T. Baker® (Mexico City, Mexico), deionized water was used for all HPLC analyses. All other chemicals were purchased in the grade commercially available.

The following flowchart shows the steps of the work.



2.2. SOYMILK PREPARATION

Soymilk was prepared following the adapted processing technology as described by Mandarino and Carrão-Panizzi (1999). Whole soybeans were soaked for 6 hours at room temperature in distilled water. After decanting the soaking water, soybeans were submitted to boiling in water for five minutes. Then soybeans were blended with distilled water (1:4 w/v) for 3 min. The resultant slurry was centrifuged at $9630 \times g$ for 15 min at room temperature and the supernatant, known as soybean milk, was obtained and heated to boiling for 10 min. Soymilk was dispensed into flasks, and was sterilized by heating at 121°C for 15 min before refrigeration.

In this article, the raw soymilk refers to sterilized soymilk without biotransformations.

2.3. ENZYME OBTENTION AND ASSAY

Tannase (E.C: 3.1.1.20), obtained from *Paecilomyces variotii*, as described by Battestin and Macedo (2007a), was used in this study. A 250 mL erlenmeyers containing 10 g of wheat bran, 10 mL of distilled water and 10% tannic acid (w/w) was used as culture medium (pH 5.7) and it was sterilized at 121°C for 15 min. After sterilization, the erlenmeyers were inoculated with 2,5 mL (5.0×10^7 spores/mL) of the pre-inoculum suspension in distilled water and incubated at 30°C for 120 h. After fermentation, 80 mL of acetate buffer (20 mM, pH 5.0) was added and samples were shaken at 200 rpm for 1 h. The final solution was filtered and centrifuged at $9630 \times g$ for 30 min at 4°C (Beckman J2-21 centrifuge, Beckman-Coulter, Inc. Fullerton, CA, USA). The supernatant was then treated with solid ammonium sulfate (80% saturation) and incubated overnight at 4°C . The precipitate was collected by centrifugation ($9650 \times g$ for 30 min), resuspended in distilled water and dialyzed for 48 h against distilled water. The dialyzed preparation was freeze-dried and used as a semi-purified tannase extract.

The tannase activity was assayed according to Battestin & Macedo (2007b). The substrate was a 0.7% (w/v) solution of tannic acid in 0.2 M acetate buffer at pH 5.5. The reaction was conducted by adding 0.3 mL of substrate solution to 0.5 mL of enzyme extract and incubating at 60 °C for 10 min. After incubation, the reaction was stopped by the addition of 3 mL of a 1.0 mg/mL bovine serum albumin solution (BSA) prepared in a 0.17 M sodium chloride solution in 0.2 M acetate buffer, pH 5.0. The solution was then filtered and centrifuged at 10,070 x g for 15 min at 4 °C. The precipitate was dissolved in 3 mL of SDS-triethanolamine and 1 mL of FeCl₃ reagent added and held for 15 min for stabilization of the color. The absorbance was measured at 530 nm (Mondal, Banerjee, Jana, & Pati, 2001) and the enzyme activity calculated: $Ab_{530} = Ab_{\text{control}} - Ab_{\text{test}}$. One unit of tannase activity was defined as the amount of tannic acid hydrolyzed by 1 mL of enzyme per minute of reaction.

2.4. ENZYMATIC BIOTRANSFORMATION OF ISOFLAVONOIDS

The commercial standard control of isoflavonoids (daidzin, daidzein, genistin, genistein, equol) were used as substrates for enzymatic hydrolysis by tannase isolated from *Paecilomyces variotii* (Battestin & Macedo, 2007a).

The standards of isoflavonoids (1 mg) were dissolved in 1 ml of phosphate buffer (pH 7.4, 75 mM) and incubated with 0.18 U of tannase, at 40 °C for 30 min. The hydrolysis process was stopped by placing the reaction in an ice bath for 15 min. The final products of standards isoflavonoids were evaluated by HPLC-DAD.

2.5. SOYMILK BIOTRANSFORMATION PROCESSES

2.5.1 PROCESS I – MICROBIAL BIOTRANSFORMATION

The starter organisms used for the fermentation of soymilk were *Streptococcus* ssp. *Thermophilus* (YF-L811) and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* (LB-340) and probiotic lactic acid bacteria were *Bifidobacterium animalis* ssp. *Lactis* (Bb-12) and *Lactobacillus acidophilus* (LA-05). All lyophilized cultures were recultivated, individually, in the sterilized soymilk at 37 °C for 12 h in condition of anaerobiosis, using an anaerobic jar. The starter organisms were inoculated at a concentration of 1% (v/v) and probiotic lactic acid bacteria of 5% (v/v), providing the count between $10^6 - 10^7$ log CFU ml⁻¹ (Cruz et al., 2013).

The preparation process of fermented soymilk was conducted according to traditional methodology (Tamime & Robinson, 2007). The sterilized soymilk was aseptically inoculated, simultaneously, with all activated cultures. Inoculated soymilk were incubated at 37 °C for 24 h, in condition of anaerobiosis using an anaerobic jar.

The fermented soymilk sample was submitted to chemical profile evaluation (total phenolic content and HPLC analysis) and to antioxidant activity (ORAC and DPPH assays).

2.5.2 PROCESS II – MICROBIAL FOLLOWED BY ENZYMATIC BIOTRANSFORMATION

The fermented soymilk (1 mL), obtained in process I, was incubated with 1.8 U of tannase, at 40 °C, for 30 min. The hydrolysis process was stopped by placing the reaction in an ice bath for 15 min.

Biotransformed soymilk samples were submitted to chemical profile evaluation (total phenolic content and HPLC analysis) and to antioxidant activity (ORAC and DPPH assays).

2.5.3 PROCESS III - ENZYMATIC BIOTRANSFORMATION

The raw soymilk (1 mL) was incubated with 1.8 U of tannase, at 40 °C, for 30 min. The hydrolysis process was stopped by placing the reaction in an ice bath for 15 min.

Biotransformed soymilk samples were submitted to chemical profile evaluation (total phenolic content and HPLC analysis) and to antioxidant activity (ORAC and DPPH assays).

2.6. CHEMICAL PROFILE EVALUATION

2.6.1 TOTAL PHENOLIC CONTENT

The total phenolic content was determined by the Folin-Ciocalteu assay modified by Chandler and Dodds (1983). Brief, 1 ml of sample was diluted 1:5 using 70% methanol and then assayed for total phenolic content. To each 1 mL sample of diluted extract (or blank, 1 ml 70% methanol), 5 ml of distilled water were added, followed by 0.5 ml of 1 M Folin-Ciocalteu phenol reagent. The samples were vortexed and then allowed to stand at room temperature for 5 min. Next, 1 ml of Na₂CO₃ solution 5% (w/v) was added into the each sample. The samples were then vortexed and incubated in a dark at room temperature for 1 h. Later, the samples were vortexed again, and the absorbance was measured at 725 nm using a UV-visible spectrophotometer (DU®640, Beckman Coulter TM, EUA). Concentrations were determined by comparing the absorbance of the samples with a calibration curve constructed using catechin. Results were expressed as µg of catechin mL⁻¹ soymilk.

2.6.2 HPLC ANALYSIS OF ISOFLAVONES

The glucosides isoflavones (daidzin and genistin), aglycones (daidzein and genistein) and equol were identified and quantified on all samples by HPLC-DAD.

The isoflavonoids extraction of soymilk samples was performed according to Aguiar (2003), with modifications. 1 mL of biotransformed soymilk samples were mixed with 5 mL of 70% (v/v) methanol at 25 °C, during 60 min, at 100 rpm. After, the mixture was centrifuged for 10 min, at 5790 x g and the supernatants obtained were filtered through a 0.45 µm membranes before being injected into a reversed-phase HPLC.

The chromatographic condition used was previously described by Park et al. (2001). A Dionex UltiMate 3000 (Germany) liquid chromatography equipped with a C-18 Atlantis® (Waters, 5 µm, 4.6 x 150 mm) column maintained at 30 °C was used. The detection was carried out using a UV/VIS (DAD-3000). The mobile phase consisting of deionized water (A) and methanol (B). The gradient elution was as follows: 20% B (0-15 min), 20-80% B (15-75 min), 80-100% B (75-80 min), 100-20% B (80-90 min) and 20% B (90-95 min) with a flow rate of 0.5 mL min⁻¹. The injection volume was 20 µL and all samples were analysed in triplicate. The spectra were obtained at 190 and 480 nm and the chromatograms processed at 254 nm.

Individual phenols were identified by comparing their retention time and spectrum to those of the standards: daidzin, genistin, daidzein, genistein and equol. Quantification of individual phenols was carried out by integration of the peak areas and using calibration curves that were established in the concentration range 0.01-1.0 mg/mL standards of isoflavones and equol. Results were expressed as µg of each phenolic compound mL⁻¹ of sample.

2.7. ANTIOXIDANT ACTIVITY OF BIOTRANSFORMED SOYMILK POLYPHENOLS

2.7.1. ORAC antioxidant assay

ORAC assays were performed using fluorescein (FL) as the fluorescent probe, as described by Macedo, Battestin, Ribeiro, & Macedo (2011). The automated ORAC assay was carried out on a Fluostar Optima Microplate reader (FLUOstar OPTIMA – BMG Labtech, Germany) with fluorescence filters for an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 520 nm. The measurements were made in a Costar® 96 well black opaque plate (Corning Costar Corporation, Cambridge, EUA). The reaction was performed at 37 °C, being that it was started by thermal decomposition of AAPH in a 75 mM phosphate buffer (pH 7.4) due to the sensitivity of FL to pH. The solution of FL (70 nM) in phosphate buffer (PBS) (75 mM, pH 7.4) was prepared daily and stored in complete darkness. The reference standard was a 75 µM Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxylic acid) solution, prepared daily in PBS, and diluted to 1.5-1500 µmol/ml solutions for the Trolox standard curve preparation. Before the reaction, 1 ml of sample was diluted 1:5 using 70% methanol. In each well, 120 µl of FL solution were mixed with either 20 µl of sample, blank (PBS), or standard (Trolox solutions), before 60 µl of AAPH (12 mM) was added. The fluorescence was measured immediately after the addition of AAPH and measurements in triplicate were then taken every 6 min during 87 min. ORAC values were defined as the difference between the area under the FL decay curve and the blank (net AUC). Regression equations between net AUC and antioxidant concentration were calculated for all of the samples. A control for the tannase was performed as regular sample, and the ORAC value obtained was subtracted from the samples treated with the enzyme. ORAC-FL values were expressed as µmol of TroloxL⁻¹ equivalent of soymilk.

2.7.2. DPPH antioxidant assay

The potential antioxidant activity of the soymilk, fermented and unfermented, was also assessed by the scavenging activity on the stable 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical, as described by Macedo et al. (2011). Various concentrations (0.01-0.1 mg mL⁻¹ in 70% (v/v) methanol) of test samples were prepared. The reaction mixtures (50 µl of test samples plus 150 µl of 0.2 mM DPPH in methanol) were mixed in 96-well plates (BMG Labtech 96, Germany), before the reaction was carried out on a Fluostar Optima Microplate reader (Fluostar Optima – BMG Labtech, Germany) with absorbance filters for an excitation wavelength of 520 nm. The decolourising process was recorded after 90 min of reaction and compared with a blank control; for the coloured samples and tannase treated samples, an additional blind control was performed which contained the extract solution (or tannase solution) and pure methanol, instead of DPPH. The solutions were freshly prepared and stored in darkness. The measurement was performed in triplicate and anti-radical activity was calculated using the linear regression equation determined by plotting the anti-radical activity of Trolox solutions of known concentrations. Antiradical activity was expressed as µmol of Trolox L⁻¹ equivalent of soymilk.

2.8. CALCULATIONS AND STATISTICS

Results are expressed as the arithmetic means and standard deviation. The statistical significance of the differences between the groups was analysed using the Tukey test. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1. BIOPROCESS EFFECT ON TOTAL PHENOLIC CONTENT AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF SOYMILK SAMPLES

The effects of fermentation and/or enzymatic biotransformation in soymilk total phenolic content (TPC) and antioxidant activities measured by ORAC and DPPH methods are presented in Table 1. Significant differences ($p < 0.05$) in TPC, ORAC and DPPH values were found in all bioprocess.

Table 1. Total phenolics content and antioxidant activities from ORAC and DPPH assays of soymilk before and after the biotransformations process.

Process	Samples	TPC μg of catechin mL^{-1}	ORAC Trolox Eq $\mu\text{mol L}^{-1}$	DPPH Trolox Eq $\mu\text{mol L}^{-1}$
Standard	Raw Soymilk	$101^a \pm 6$	$11,584^a \pm 1,022$	$821^a \pm 14$
I	Fermented Soymilk	$254^b \pm 11$	$25,987^b \pm 977$	$1,729^b \pm 27$
II	Fermented Soymilk + Tannase	$387^c \pm 9$	$31,801^c \pm 858$	$4,439^c \pm 39$
III	Soymilk + Tannase	$847^d \pm 7$	$45,758^d \pm 937$	$6,724^d \pm 36$

The results are expressed as mean $\pm$ standard deviation ($n = 3$). Mean in the same column with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

The results showed that there was a significant increase in the total phenolics content for all the biotransformed samples ($p < 0,05$). After the fermentation process with lactic acid bacterias (process I), the total soluble phenolic content of soymilk increased significantly from 101 to $254 \mu\text{g mL}^{-1}$, an increase of nearly 2.5 times, compared to standard (raw soymilk). In the process II, this fact also was observed when analyzed the reaction of the fermented soymilk with tannase in which the increased of the total phenols content was about 3.8 times (101 to $387 \mu\text{g mL}^{-1}$), compared to standard. The process III

showed the highest increase on total phenolic content (101 to 847 $\mu\text{g mL}^{-1}$), about 8.4 times after the reaction of raw soymilk with tannase. These results suggest that the fermentation process and enzymatic biotransformation with tannase improves the release of phenolic compounds from the soymilk matrix.

McCue and Shetti (2005) studied the phenolic antioxidant mobilization during yogurt production from soymilk using *Kefir* cultures and showed that total phenolic content of soymilk increased 80% from 232 ± 32 μg catechin equivalents (CAE/mL) of yogurt sample, initially, to 418 ± 13 μg CAE/mL, at 40 h of fermentation. The authors hypothesized that the degradation of polymeric phenolic structures by β -glucosidase enzymes of the Kefir cultures could explain increase in soluble phenolic content.

Nam et al. (2011) showed that the fermentation process of *meju*, a fermented soybean derivative, with *Aspergillus oryzae* NL 5 showed an increasing of total phenolics probably due to accumulation of free forms of isoflavones. A wide range of phenolic constituents in soy by-products was previously reported by Tyug, Prasad and Ismail (2010) that also demonstrated that total phenolics content had depended on the soybean variety and the processing conditions to produce soymilk.

Various methods have been developed to characterize the potential antioxidant of several compounds and biological samples. One such method, the semiautomated ORAC protocol, developed by Cao, Sofic and Prior (1996), has received extensive coverage and utilisation in the field of antioxidant and oxidative stress. In the DPPH method, the substances tested were reacted with the DPPH, which is a stable free radical, where a decrease in the absorbance measured at 520 nm was induced, suggesting the scavenging potential of the extracts. (Huang, Ou, & Hampsch-Woodi, 2002).

The bioactivity of the samples, before and after the three biotransformations of soymilk, were assayed using DPPH and ORAC methods. The results are described in Table 1 and expressed as Trolox® concentration equivalents. In general, the results demonstrated that there was a significant increase in the antioxidant capacity of the biotransformed samples in both methodologies ($p < 0,05$), corroborating TPC results.

These results (Table 1) indicate that the fermentation process of soymilk (process I) resulted in significantly increase of about 2.2 times the antioxidant capacity by the ORAC method and an increase of approximately 2.1 times by the DPPH method. The fermentation followed by the enzyme biotransformation (process II) resulted in an increased antioxidant capacity of 2.7 and 5.4 times by ORAC and DPPH assays, respectively. Similarly, in the biotransformation of soymilk catalyzed by only tannase (process III), there was a significant increase in the antioxidant capacity of 4 and 8 times by ORAC and DPPH assays, respectively.

Some studies (Chang et al., 2009; McCue, & Shetty, 2005; Pyo, Lee, & Lee, 2005; Wang, Yu, & Chou, 2006; Wardhani, Vázquez, & Pandiella, 2010) based on fermented soymilk cultured with *kefir*, lactic acid bacteria, bifidobacteria and filamentous fungi, have focused on antioxidant activities of raw or processed soymilk. Their findings have demonstrated that fermented soymilk possessed significantly higher antioxidant properties than unfermented soymilk.

The increased of the total phenolic content and antioxidant activity of the biotransformed samples of soymilk observed in the present study is consistent with previous reports. Tempeh, a fermented product from soybean, using by *Rhizopus oligosporus* exhibited superior antioxidant activity, determined by the DPPH method, than unfermented soybean (Chang et al., 2009). Cho et al. (2009) evaluated the changes in total phenolics and DPPH radical scavenging activity during the fermentation, for 60 h at 37 °C, of *cheonggukjang*, a fermented soybean paste used in Korean. The total phenolics increased markedly from the starting amount of 253 to 9414 mg/kg and the level of DPPH radical scavenging activity increased from 53.6 to 93.9% at the end of fermentation process.

Soybeans and soy based products are nutritionally rich foods and they contain various phytochemicals (isoflavones, phytosterols, saponins, phenolic acids, phytic acid and trypsin inhibitors) that show functional, antioxidant and radical-scavenging properties (Wardhani, Vázquez, & Pandiella, 2010). The phenolics compounds of soybean have free radical scavenging activity (Kim, Kwon, Lee, Choung, & Moon, 2005; Shon et al., 2007), which may explain the correspondence of the increase of total phenolic content with antioxidant activity shown in Table 1.

The application of tannase from *P. variotii* in foods matrices has previously been reported in some studies (MACEDO et al., 2011; FERREIRA et al., 2013) and resulted in products with heightened functional activity in relation to the original samples. However, in this present study the potential of action of tannase led to results more promising, since the increases in the ORAC and DPPH assays were higher compared to the other works.

According to Macedo et al. (2011), the antioxidant power of green tea and yerba mate, after enzyme treatment with tannase from *Paecilomyces variotii*, increased by 55% and 43%, respectively, by ORAC method, while the results by DPPH method showed an increase of 23% and 17%, respectively.

Similar results were also found in a study developed by Ferreira et al. (2013) in which the biotransformation of orange juice catalyzed by tannase from *P. variotii*, led to a significant increase in the antioxidant capacity of the biotransformed sample, both in the ORAC method (50% increase), as well as the DPPH method (70% increase). In this study it was demonstrated that the tannase extract from *P. variotii* was able to remove the glycosides of naringin and hesperidin and this enzymatic biotransformation led to an increase in bioactivity of orange juice. Similarly, in the present study, the enzymatic treatment with the tannase was probably able to hydrolyse the glycosides forms of isoflavones in soymilk, and the products of hydrolysis (aglycones forms) contributed to the observed increase in the antioxidant capacity of soymilk since the aglycones isoflavones are known to be more bioactive than their respective glucosides (Xu et al., 1995).

The highest antioxidant activity by ORAC and DPPH methods, as well as the total phenolic content, occurred in soymilk after the enzymatic biotransformation (process III). These results indicate that the enzymatic biotransformation with tannase provided higher increase in the soymilk antioxidant capacity in relation to the fermentation process, showing the potential of the tannase application to increase the antioxidant power of this beverage.

The results of this work indicate a trend toward increased total phenolic content after the three proposed bioprocesses. This trend was similar to the one observed in

radical scavenging capacity by ORAC and DPPH method, supporting the results obtained by microbial and enzymatic treatments of the soymilk.

3.2. ISOFLAVONES PROFILE

The concentration of genistin, daidzin, genistein, daidzein and the formation of equol were evaluated before and after the three process of biotransformation using HPLC-DAD (Table 2). The isoflavones and equol were successfully separated and identified according to Aguiar (2003) methodology.

Table 2 - Concentration of isoflavone isomers and equol ($\mu\text{g mL}^{-1}$) in soymilk before (standard) and after the biotransformations process.

Process	Samples	Isoflavone contents (μg mL ⁻¹)				Equol
		Glucoside		Aglycone		
		Daidzin	Genistin	Daidzein	Genistein	
Standard	Soymilk	313.0 ^a ± 2.0	393.8 ^a ± 3.2	25.6 ^a ± 0.6	10.2 ^a ± 0.5	0.08 ^a ± 0.0003
I	Fermented Soymilk	194.2 ^b ± 5.7	202.5 ^b ± 5.9	91.4 ^b ± 1.9	52.3 ^b ± 2.0	0.31 ^b ± 0.0008
II	Fermented Soymilk + Tannase	n.d.	n.d.	717.2 ^c ± 11.0	251.4 ^c ± 6.9	0.63 ^c ± 0.0142
III	Soymilk + Tannase	n.d.	n.d.	944.5 ^d ± 0.9	321.6 ^d ± 0.8	0.82 ^d ± 0.0104

n.d. = not detected.

The results are expressed as mean $\pm$ standard deviation ($n = 3$). Mean in the same column with different letters are significantly different ($p < 0,05$).

The results demonstrated that all bioprocess developed were able to significantly increase the content of aglycones forms (daidzein and genistein) and equol in soymilk. Due the hydrolysis of daidzin and genistin, the contents of corresponding aglycones, daidzein and genistein, in raw soymilk increased after the fermentation and enzymatic biotransformation ($p < 0,05$).

As shown in Table 2, the glucosides isoflavones were the predominant forms in raw and fermented soymilk. However, the concentrations of glucosides daidzin and genistin of fermented soymilk (process I) decreased about 1.6 and 2 times, respectively, and the aglycones daidzein and genistein increased about 3.5 and 5 times, respectively, when compared to the standard. Therefore, this result suggests that the glucosides isoflavones were transformed to aglycones forms as a result of fermentation process. This could be due to the β -glucosidase activity inherent in the microorganisms used to carry out the fermentation process as well documented before (Dueñas et al., 2012).

The concentration and distribution of isoflavones in soybean foods depends on the soybean varieties and processing techniques, such as fermentation and heat treatment (Barbosa, Lajolo, & Genovese, 2006; Chun, Kim, & Kim, 2008; Yamabe, Kobayashi-Hattori, Kaneko, Endo, & Takita, 2007). Studies have demonstrated that the fermentation process of soybean promotes changes in the phytochemical compounds. In general, the glucosidic isoflavones are the predominant isomeric forms in non-fermented soymilk and these forms require bacterial induced hydrolytic deconjugation for transformation into a bioavailable aglycone forms (King, & Bignell, 2000).

Rekha and Vijayalakshmi (2008) reported a significant bioconversion of the glucoside isoflavones into their corresponding aglycones during soymilk fermentation. They tested five different combinations of lactic acid bacteria and yeast *Saccharomyces boulardii*, all of them resulting in glycosyl bond cleavage by microbial fermentation. Chen and Wei (2008) studied the aglycones isoflavones concentrations in soybean and its derivatives, including unfermented (tofu, soy extract and soy flour) and fermented (*natto*, *miso* and *sufu*) products. The isoflavones concentration found in soybean and its derivatives ranged between 109 and 508 mg per 100 g. Isoflavone aglycones had the concentration of 2-19% of total isoflavones in soybeans and non-fermented soybean products. There was a broad distribution of isoflavone aglycones at 4-94% of total isoflavones in fermented soybeans. The authors showed that the increase in the aglycone forms was due to the β -glycosidase produced by the microorganisms used to ferment these products.

As observed in Table 2, after the process II and III the glucosides forms (daidzin and genistin) were not identified, showing that these forms were converted to theirs

respectives aglycones forms, as shown by the significant increase in the levels of daidzein and genistein after these bioprocesses. The concentrations of aglycones forms of fermented soymilk, after the process II, significantly increased about 28 times (from 25.6 to 717.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$) for daidzein and 25 times (from 10.2 to 251.4 $\mu\text{g mL}^{-1}$) for genistein, compared to raw soymilk. In the process III, the aglycones forms increased markedly compared to raw soymilk about 37 times (from 25.6 to 944.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) for daidzein and 32 times (from 10.2 to 321.6 $\mu\text{g mL}^{-1}$) for genistein. These results indicate that the enzymatic reaction with tannase (process III) showed the highest increase on the bioactive forms of isoflavones, which was also observed for the results of total phenolic content and ORAC and DPPH assays.

The aglycone isoflavones were reported to exhibit stronger bioactive function than glucosides (Cederroth, & Nef, 2009; Setchell, 1998). Therefore these forms are mainly responsible for the antioxidant activity of soy foods although other soy constituents such as phenolic compounds might also contribute to antioxidant capacity to a certain extent (Cheng, Lin, & Liu, 2011).

Ferreira et al. (2013) demonstrated that the semi-purified tannase extract of *Paecilomyces variotii* was able to modify the chromatographic profile of the polyphenolic composition of the orange juice and there was a significant increase in the antioxidant capacity of the biotransformed sample, both in the ORAC method (50% increase), as well as the DPPH method (70% increase).

Similar results have been demonstrated by Nam et al. (2011). These authors demonstrated that the antioxidant activity of fermented soy with *Aspergillus oryzae* was proportional to the concentration of aglycones isoflavones. Cheng, Lin and Liu (2011) showed that the high antioxidative activity of fermented black soybean milk by immobilized *Rhizopus oligosporus* was due to the higher daidzein and genistein (aglycone forms) content compared with the unfermented soymilk. Cho et al. (2009) showed that soybean fermentation by *Bacillus pumilus* afforded changes in esterase activity and phenolic content. They observed a markedly increase in radical scavenging activity, which could be related to increase level of isoflavone aglycones and decrease of its glycosides.

Therefore, the bioconversion of the glucoside isoflavones into aglycones forms observed after the three proposed processes of biotransformation, proved to be very effective in increasing the antioxidant capacity of these samples by the tested methods, as demonstrated with *in vitro* tests of antioxidant activity (ORAC and DPPH).

The tannase ability to catalyze the biotransformation of commercial standards of glucosides isoflavones (daidzin, genistin) was proven in the tests that were carried out. Fig. 1 presents the chromatograms obtained after 30 min at 40 °C for the reaction of standard daidzin (A) and genistin (B) with the semi-purified tannase extract of *P. variotti* and presents the time of retention and the absorption spectrum of the products of the reaction.

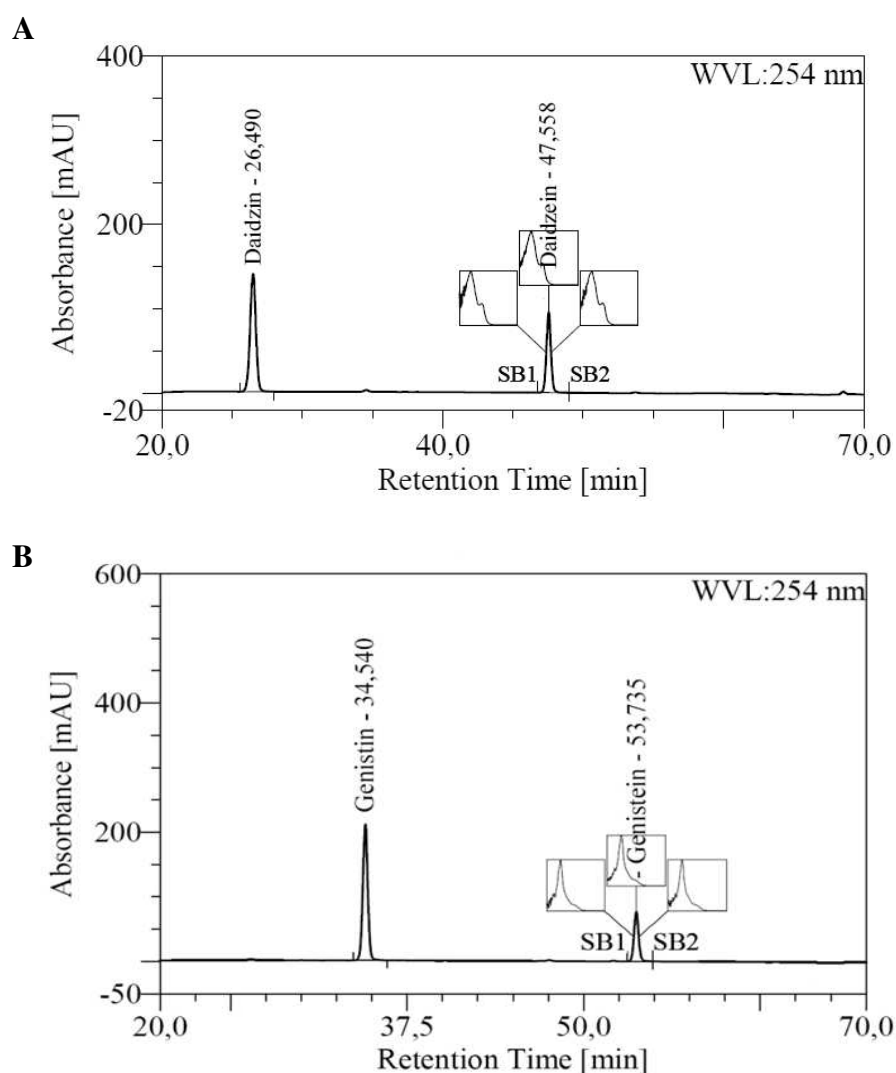


Fig 1. HPLC-DAD chromatograms of the tannase reaction at 30 min at 40 °C of: (A) daidzin and (B) genistin.

As shown in Fig. 1, it is possible to evidence that the reaction between the tannase and the glucosides isoflavones (daidzin and genistein) led to the formation of the respective aglycones daidzein (A) and genistein (B). It can be confirmed based on the similarity between the time of retention of the products of the reactions. These results obtained prove that the tannase is able to act on glucosides isoflavones.

Similar results were found by Ferreira et al. (2013) that used the tannase from *P. variotti* to catalyze the biotransformation of commercial standards of typical citric polyphenols, hesperidin and naringin, 1:1 (w/w) tannase:standard. The results of this study demonstrated that the tannase was able to act in naringin and hesperidin in the removal of glycosides and lead to the formation of the aglycones molecules, naringenin and hesperitin.

Studies conducted by Park et al (2011) also reported the biotransformation of isoflavones by an enzymatic process. The work demonstrated that the application of β -glucosidase enzyme was able to hydrolyze glucosides isoflavone into their respective aglycones forms.

In addition to the deglycosylation activity observed in the results presented, in a study developed by Battestin, Macedo, and De Freitas (2008) was demonstrated that the tannase, from *P. variotti*, can completely hydrolyse the epigallocatechin gallate in green tea to epigallocatechin and gallic acid, resulting in an increased antioxidant activity of the tea extract after the enzymatic reaction.

Previous researches have shown that tannase catalyzing the decomposition of hydrolysable tannins such as tannic acid, methyl gallate, ethyl gallate and n-propyl gallate (Lekha, & Lonsane, 1997), as well as demonstrating activity in the hydrolysis of chlorogenic acid with the formation of caffeic acid and quinic acid (Aguilar et al., 2007; Yao, Fan, Lu, & Liu, 2011).

Studies have shown the importance of biotransformation of soy isoflavones to the equol into consideration in several clinical studies on the beneficial effects of soy isoflavones on prevention of chronic diseases (Alekel et al., 2000; Cheng et al., 2010; Clerici et al., 2007). Several works show that the enzymatic and microbial activity can lead to conversions of isoflavones of soy, leading to higher bioavailability of these bioactive

molecules and the formation of equol (Chien, Huang, & Chou, 2006; Di Cagno et al., 2010).

As shown in the Table 2, the concentration of equol after the fermentation of soymilk with lactic acid bacterias (process I) increased significantly the content of equol, about 3.9 times. In process II, the enzymatic treatment of fermented soymilk this bioactive compound increased significantly about 7.9 times, compared to raw soymilk. In process III, after enzymatic treatment of raw soymilk (process III) increased significantly, about 10 times. These results indicate that tannase processing showed higher hydrolytic catalysis of isoflavone glycosides in relation to the fermentation process and than was able to improve the content of equol in soymilk samples.

The capacity of the tannase to biotransformation isoflavones of soymilk and increase the content of equol was proven in the tests that were carried out. Fig. 2 presents the chromatographic profile of the general composition in polyphenols for the soymilk without biotransformation (A) and for the soymilk fermented with acid lactic bacteria (B), as well as for the fermented soymilk (C) and unfermented soymilk (D) treated with 20 mg mL⁻¹ of semi-purified tannase extract.

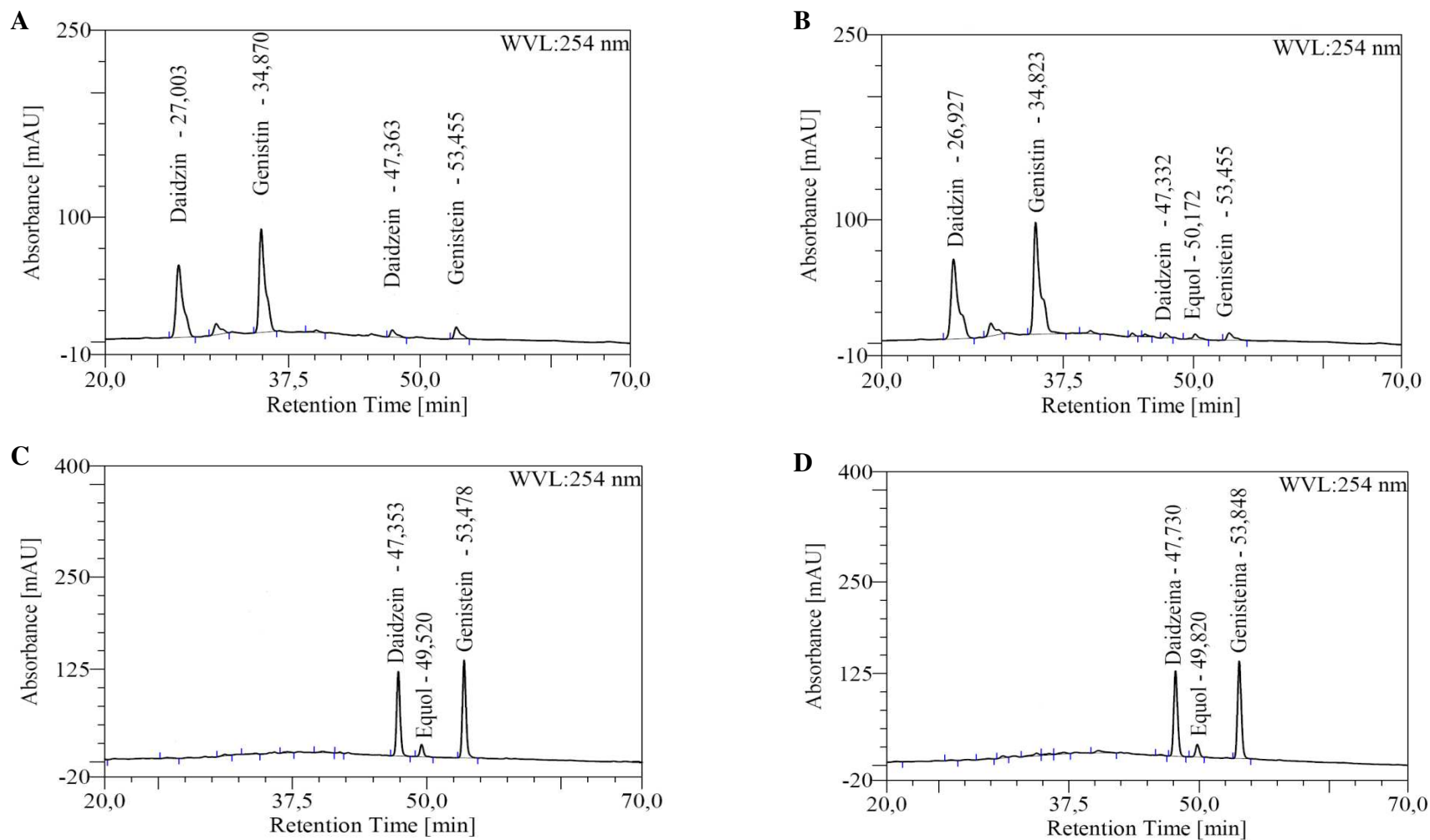


Fig. 2. HPLC-DAD chromatograms of the (A) raw soymilk, (B) fermented soymilk, (C) fermented soymilk reacted with 1.8 U of tannase and (D) raw soymilk reacted with 1.8 U of tannase at 30 min at 40 °C.

As observed in Fig. 2, it is possible to see that the both fermentation process and the tannase were able to significantly increase the content of aglycones forms (daidzein and genistein). Furthermore, these bioprocess led to the formation of equol. It can be confirmed based on the similarity between the time of retention of the equol.

The literature affirm that the gut microflora performs the transformation of the isoflavones into equol (Cavallini, & Rossi, 2009; Yuan, Wang, & Liu, 2007). A number of bacteria in intestinal flora have also been reported to be responsible for this conversion (Setchell, & Cleirici, 2010).

However, some studies also have considered the synthesis of equol during soy milk fermentation without the presence of bacteria from intestinal microflora. The use of bifidobacteria and lactic acid bacteria to convert isoflavone glucosides into aglycones and/or equol during soy milk fermentation is related in several works (Tsangalis, Ashton, McGill, & Shah, 2002; Wei, Chen, & Chen, 2007; Di Cagno et al., 2010; Rekha & Vijayalakshmi, 2011).

Study developed by Tsangalis et al. (2002) evaluated the enzymatic transformation of isoflavone phytoestrogens in soymilk by β -glucosidase from bifidobacterias. The results showed that the soymilk fermented with *Bifidobacterium animalis* contained the highest concentration of aglycones and equol after 24 h of incubation, and this strain also showed the highest β -glucosidase activity amongst the strains studied. The authors proposed that there would be correlations between β -glucosidase activity of bifidobacteria, their growth characteristics in soymilk, and transformation of isoflavone glucosides to bioactive forms.

The results on table 2 showed that the tannase from *P. variotti* was able to synthesize equol at a higher level than strains used in fermentation process. To our knowledge, studies in this area are rare and there is little information on correlation between equol formation and use of enzymes.

Despite the need for more in-depth analytic studies for a detailed characterization of the changes observed in the phenolic profile of the soymilk after the activity of tannase extract, it can be observed that the action of this enzyme was not limited to the deglycosylation of isoflavones (Fig 1). The tannase was also able to increase the content of

equol. These results make tannase an interesting option for application on soy foodstuff, with a rich composition of polyphenols in which the enzyme can act in different ways in the biotransformation.

4 CONCLUSION

In this study was proposed microbial and/or enzymatic processing of soymilk to improve equol and bioactives isoflavones. The results demonstrated that biotransformation process by microbial fermentation and by enzyme were able to promoted a significant bioconversion of the glucosidic form of isoflavones into their respective bioactive aglyconic forms and increase significantly the equol content. Furthermore, the three proposed process act significantly on the increase the bioactivity of soymilk, as shown by the ORAC and DPPH assays and total phenolic compounds.

It was demonstrated that the action of the tannase extract from *P. variotii* was better than fermentation process in increasing the antioxidant power by biotransformation of polyphenols of soymilk and not limited to the deglycosylation of isoflavones, but also was able to increase the content of equol, although there is no mechanism elucidated.

A few information is available in the literature about the bioprocess that aimed at the formation of equol in soy-derivatives. To the best of our knowledge, this is the first study that has focused on evaluating the obtaining of equol from a biological process.

The novelty was produce a significance equol concentration in soymilk using only enzymatic processing without microbial action, proving that is possible develop a simple and effective process in vitro without microbial intervention, which was not possible until now according to actual literature.

REFERENCES

- Aguilar, C. L.; Suzuki, C. N.; Paredes, J. G.; Alencar, S. M.; Park, Y. K. (2003). Transformation of beta-glucoside isoflavones on solid-state fermentation of the soy flour with *Aspergillus oryzae*. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 4(2), 115-121.
- Aguilar, C. N., Rodríguez, R., Gutiérrez-Sánchez, G., Augur, C., Favela-Torres, E., & Prado-Barragan, L. A. (2007). Microbial tannases: Advances and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(1), 47–59.
- Akaza, H., Miyanaga, N., Takashima, N., Naito, S., Hirao, Y., Tsukamoto, T., et al. (2004). Comparisons of percent equol producers between prostate cancer patients and controls: case-controlled studies of isoflavones in Japanese, Korean and American residents. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 34(2), 86–89.
- Albulescu, M., & Popovici, M. (2007). Isoflavones – biochemistry, pharmacology and therapeutic use. *Revue Roumaine de Chimie*, 52(6), 537-550.
- Alekel, D. L., Germain, A. S., Peterson, C. T., Hanson, K. B., Stewart, J. W., & Toda, T. (2000). Isoflavone-rich soy protein isolate attenuates bone loss in the lumbar spine of perimenopausal women, *American Journal of Clinical Nutrition*, 72(3), 844– 852.
- Atkinson, C., Newton, K. M., Bowles, E. J., Yong, M., & Lampe, J. W. (2008). Demographic, anthropometric, and lifestyle factors and dietary intakes in relation to daidzein-metabolizing phenotypes among premenopausal women in the United States. *American Journal of Clinical Nutrition*, 87(3), 679–87.
- Barbosa, A. C. L., Lajolo, F. M. & Genovese, M. I. (2006). Influence of temperature, pH and ionic strength on the production of isoflavone-rich soy protein isolates. *Food Chemistry*, 98(4), 757-766.
- Barnes S. (2010). The biochemistry, chemistry and physiology of the isoflavones in soybeans and their food products. *Lymphatic Research and Biology*, 8(1), 89-98.
- Battestin, V., & Macedo, G. A. (2007a). Tannase production by *Paecilomyces variotii*. *Bioresource Technology*, 98(9), 1832-1837.
- Battestin, V., & Macedo, G. A. (2007b). Purification and biochemical characterization of tannase from a newly isolated strain of *Paecilomyces variotii*. *Food Biotechnology*, 21(3), 207–216.

- Battestin, V., Macedo, G. A., & de Freitas, V. A. P. (2008). Hydrolysis of epigallocatechingallate using a tannase from *Paecilomyces variotti*. *Food Chemistry*, 108(1), 228-233.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantifications of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Cao, S., Sofic, M., & Prior, R. L. (1996). Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 44(11), 3426–3431.
- Carrão-Panizzi, M. C., Beléia, A. D. P., Prudêncio-Ferreira, S. H., Oliveira, M. C. N., & Kitamura, K. (1999). Effects of isoflavones on beany flavor and astringency of soymilk and cooked whole soybean grains. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 34(6), 1044-1052.
- Cavallini; D. C. U.; Rossi, E. A. (2009). Equol: efeitos biológicos e importância clínica de um metabólito das isoflavonas. *Alimentos e Nutrição*, v. 20(4), 677-684.
- Cederroth, C. R., & Nef, S. (2009). Soy, phytoestrogens and metabolism: a review. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 304(1), 30–42.
- Chandler, S. F., & Dodds, J. H. (1983). The effect of phosphate, nitrogen, and sucrose on the production of phenolics and sicosidine in callus cultures of *solanum tuberosum*. *Plant Cell Reports*, 2:105–108.
- Chang, C. T., Hsu, C. K., Chou, S. T., Chen, Y. C., Huang, F. S. & Chung Y.C. (2009). Effect of fermentation time on the antioxidant activities of tempeh prepared from fermented soybean using *Rhizopus oligosporus*. *Internatonal Journal of Food Science and Technology*, 44(4), 799–806.
- Chen, T. R., & Wei, Q. K. (2008). Analysis of bioactive aglycone isoflavones in soybean and soybean products. *Nutrition and Food Science*, 38(6), 540–547.
- Cheng, C., Wang, X., Weakley, S. M., Kougiass, P., Lin, P. H., Qizhi, Y., et al. (2010). Soybean isoflavonoid equol blocks ritonavir-induced endothelia dysfunction in porcine pulmonary arteries and human pulmonary artery endothelial cells. *Journal of Nutrition*, 140(1), 7-12.
- Cheng, K. C., Lin, J. T., & Liu, W. H. (2011). Extracts from fermented black soybean by immobilized *Rhizopus oligosporous* exhibit both antioxidative and cytotoxic activities. *Food Technology and Biotechnology*, 49(1), 111–117.

Chien, J. T., Hsieh, H. C., Kao, T. H., & Chen, B. H. (2005). Kinetic model for studying the conversion and degradation of isoflavones during heating. *Food Chemistry*, 91(3), 425-434.

Chien, H. L., Huang, H. Y., & Chou, C. C. (2006). Transformation of isoflavone phytoestrogens during the fermentation of soymilk with lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiology*, 23(8), 772-778.

Cho, K. M., Hong, S. Y., Math, R. K., Lee, J. H., Kambiranda, D. M., Kim, J. M. et al. (2009). Biotransformation of phenolics (isoflavones, flavanols and phenolic acids) during the fermentation of *cheonggukjang* by *Bacillus pumilus* HY1. *Food Chemistry*, 114(2), 413-419.

Chun, J., Kim, J. S., & Kim, J. H. (2008). Enrichment of isoflavone aglycones in soymilk by fermentation with single and mixed cultures of *Streptococcus infantarius* 12 and *Weissella* sp. 4. *Food Chemistry*, 109(2), 278-284.

Clerici, C., Setchell, K. D., Battezzati, P. M., Pirro, M., Giuliano, V., Asciutti, S., Castellani, D., et al. (2007). Pasta naturally enriched with isoflavone aglycons from soy germ reduces serum lipids and improves markers of cardiovascular risk. *Journal of Nutrition*, 137(10), 2270-2278.

Coward, L., Smith, M., Kirk, M., & Barne, S. (1998). Chemical modification of soy foods during cooking and processing. *American Journal of Clinical Nutrition*, 68(6), 1486-1491.

Cruz, A. G., Guerreiro, L., Nogueira, L. C., Sant'Ana, A. S., Faria, J. A. F., Oliveira, C. A. F., et al. (2013). Developing a prebiotic yogurt: rheological, physico-chemical and microbiological aspects and adequacy of survival analysis methodology. *Journal of Food Engineering*, 114(3), 323-330.

Di Cagno, R., Mazzacane, F., Rizello, C. G., Vincentini, O., Silano, M., Guilani, G., et al. (2010). Synthesis of isoflavone aglycones and equol in soy milks fermented by food-related lactic acid bacteria and their effect on human intestinal Caco-2 cells. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 58(19), 10338-10446.

Dueñas, M., Hernández, T., Robredo, S., Lamparski, G., Estrella, & I., Muñoz, R. (2012). Bioactive phenolic compounds of soybean (*Glycine max* cv. *Merit*): modifications by different microbiological fermentations. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 62(4), 241-250.

Ferreira, L. R., Macedo, J. A., Ribeiro, M. L & Macedo, G. A. (2013). Improving the chemopreventive potential of orange juice by enzymatic biotransformation. *Food Research International*, 51(2), 526-535.

- Garcia-Conesa, M. T., Ostergaard, P., Kauppinen, S., & Williamson, G. (2001). Hydrolysis of diethyl diferulates by tannase from *Aspergillus oryzae*. *Carbohydrate Polymers*, 44(4), 319–324.
- Huang, D., Ou, D., & Hampsch-Woodi, M. (2002). Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated β -cyclodextrin as the solubility enhancer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(7), 1815–1821.
- Kenneth, D. R. S., Nadine, M. B., & Eva, L. O. (2002). The clinical importance of the metabolite equol – a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. *Journal of Nutrition*, 132(12), 3577–3584.
- Kim, S. H., Kwon, T. W., Lee, Y. S., Choung, M. G., Moon, G. S. (2005). A major antioxidative components and comparison antioxidative activities in black soybean. *Korean Journal of Food Science Technology*, 37(1), 73–77.
- King, R. A., & Bignell, C. M., (2000). Concentrations of isoflavones phytoestrogens and their glucosides in Australian soya beans and soya foods. *Australian Journal of Nutrition and Dietetics*, 57(2), 70–78.
- Lekha, P. K., & Lonsane, B. K. (1997). Production and application of tannin acyl hydrolase: state of the art. *Advances in Applied Microbiology*, 44, 215–260.
- Macedo, J. A., Battestin, V., Ribeiro, M. L., & Macedo, G. A. (2011). Increasing the antioxidant power of tea extracts by biotransformation of polyphenols. *Food Chemistry*, 126(2), 491–497.
- Mandarino, J. M. G., & Carrão-Panizzi, M.C. (1999). *A soja na cozinha*. Embrapa Soja, doc. 136. p.13.
- Marrian, G. F., & Haselwood, G. A. D. (1932). Equol, a new active phenol isolated from ketohydroxyestrin fraction of mares urine. *Biochemistry Journal*, 26, 1226–1232.
- McCue, P. P., & Shetty, K. (2005). Phenolic antioxidant mobilization during yogurt production from soymilk using Kefir cultures. *Process Biochemistry*, 40(5), 1791–1797.
- Mondal, K. C., Banerjee, D., Jana, M., & Pati, B. R. (2001). Colorimetric assay method for determination of the tannin acyl hydrolase activity. *Analytical Biochemistry*, 295(2), 168–171.

- Mueller, S. O., Simon, S., Chae, K., Metzler, M., & Korach, K. S. (2004). Phytoestrogens and their human metabolites show distinct agonistic and antagonistic properties on estrogen receptor α (ER α) and ER β in human cells. *Toxicological Science*, 80(1), 14-25.
- Muthyala R. S., Ju Y. H., Sheng S., Williams L. D., Doerge D. R., Katzenellenbogen B. S., et al. (2004). Equol, a natural estrogen metabolite from soy isoflavone: convenient preparation and resolution of R- and S-equol and their differing binding and biological activity through estrogen receptor alpha and beta. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 12(6), 1559–1567.
- Nam, D. H., Kim, H. J., Lim, J. S., Kim, K. H., Park C., Kim J. H., et al. (2011). Simultaneous enhancement of free isoflavone content and potential of soybean by fermentation with *Aspergillus oryzae*. *Journal of Food Science*, 76(8), 194–200.
- Pan, M. H., Lai, C. S., & Ho, C. T. (2010). Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids. *Food and Function*, 1(1), 15-31.
- Park Y. K., Alencar, S. M., Nery, I. A., Aguiar, C.L., Pacheco, T. A. R. C. (2001). Enrichment of isoflavone aglycones in extracted soybean isoflavones by heat and fungal β -glucosidase. *Food Science-South Korea*, 34(4), 14-19.
- Pyo, Y-H., Lee, T-C., & Lee, Y-C. (2005). Enrichment of bioactive isoflavones in soymilk fermented with β -glucosidase-producing lactic acid bacteria. *Food Research International*, 38(5), 551–559.
- Rekha, C. R., & Vijayalakshmi, G. (2008). Biomolecules and nutritional quality of soymilk fermented with probiotic yeast and bacteria. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 151(2), 452–463.
- Rekha, C R., & Vijayalakshmi G. (2011). Isoflavone phytoestrogens in soymilk fermented with β -glucosidase producing probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 62(2), 111–120.
- Setchell, K. D. R., Borriello, S. P., Hulme, P., Kirk, D. N., & Axelson, M. (1984). Non steroidal estrogens of dietary origin: possible roles in hormone-dependent disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, 40(3), 569–578.
- Setchell, K. D. (1998). Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. *American Journal of Clinical Nutrition*, 68(6), 1333–1346.

- Setchell, K. D. R., Brown, N. M. & Lydeking-Olsen, E. (2002). The clinical importance of the metabolite equol - A clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. *Journal of Nutrition*, 132(12), 3577–3584.
- Setchell, K.D.R., & Clerici, C., (2010). Equol: history, chemistry and formation. *Journal of Nutrition*, 140(7), 1355-1362.
- Shon, M. Y., Lee, J., Choi, J. H., Choi, S. Y., Nam, S. H., Seo, K. I., et al. (2007). Antioxidant and free radical scavenging activity of methanol extract of chungkukjang. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(2), 113–118.
- Song, K. B., Atkinson, C., Frankenfeld, C. L., Jokela, T., Wähälä, K., Thomas, W. K., et al. (2006). Prevalence of daidzein-metabolizing phenotypes differs between caucasian and korean american women and girls. *Journal of Nutrition*, 136(5), 1347–51.
- Tamime, A. Y., & Robinson R.K. (2007). *Yoghurt: Science and Technology*. (3th ed.). Cambridge, UK: Woodhead Publishing, 791 p.
- Tsangalis, D., Ashton, J. F., McGill, A. E. J., & Shah, N. P. (2002). Enzymatic transformation of isoflavone phytoestrogens in soymilk by β -glucosidase-producing bifidobacteria. *Journal of Food Science*, 6(8), 3104–3113.
- Tyug, T. S., Prasad, K. N., & Ismail, A. (2010). Antioxidant capacity, phenolics and isoflavones in soybean by-products. *Food Chemistry*, 123(3), 583–589.
- Wang, B. F., Wang, J. S., Lu, J. F., Kao, T. H., & Chen, B. H. (2009). Anti-proliferation effect and mechanism of prostate cancer cell lines as affected by isoflavones from soybean cake. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 57(6), 2221-2232.
- Wang, Y. C., Yu, R. C. & Chou, C. C. (2006). Antioxidative activities of soymilk fermented with lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiology*, 23(2), 128-135.
- Wardhani, D. H., Vázquez, J. A., & Pandiella, S. S. (2010). Optimisation of antioxidants extraction from soybeans fermented by *Aspergillus oryzae*. *Food Chemistry*, 118(3), 731–739.
- Wei, Q. K., Chen, T. R., & Chen, J. T. (2007). Using of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* to product the isoflavone aglycones in fermented soymilk. *International Journal of Food Microbiology*, 117(1), 120–124.
- Xu, X., Harris, K. S., Wang, H. J., Murphy, P. A. & Hendrich, S. (1995). Bioavailability of soybean isoflavones depends upon gut microflora in women. *Journal of Nutrition*, 125(9), 2307-2315.

- Yamabe, S., Kobayashi-Hattori, K., Kaneko, K., Endo, H., & Takita, T. (2007). Effect of soybean varieties on the content and composition of isoflavone in rice-koji miso. *Food Chemistry*, 100(1), 369-374.
- Yee, S., Burdock, G. A., Kurata, Y., Enomoto, Y., Narumi, K., Hamada, S., et al. (2008). Acute and subchronic toxicity and genotoxicity of SE5-OH, an equol-rich product produced by *Lactococcus garvieae*. *Food and Chemical Toxicology*, 46(8), 2713–2720.
- Yao, J., Fan, X. J., Lu, Y., & Liu, Y. H. (2011). Isolation and characterization of a novel tannase from a metagenomic library. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(8), 3812–3818.
- Yuan, J. P., Wang, J. H., & Liu, X. (2007). Metabolism of dietary soy isoflavones to equol by human intestinal microflora—implications for health. *Molecular Nutrition and Food Research*, 51(7), 765–781.

CONCLUSÃO GERAL

Ao melhor de nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que se concentrou em avaliar a obtenção de equol em um derivado da soja a partir de um processo biológico *in vitro*, sem ação de bactérias intestinais, a partir da reação enzimática com extrato de tanase de *P. variotii*.

Os processos de biotransformação por fermentação microbiana e/ou reação com a enzima tanase foram capazes de promover mudanças no perfil polifenólico do extrato hidrossolúvel de soja promovendo a bioconversão da forma glicosídica das isoflavonas em suas respectivas formas bioativas (agliconas).

Assim, este trabalho revela uma nova forma de biotransformar os compostos fenólicos de extrato hidrossolúvel de soja para obtenção de um produto rico em compostos antioxidantes, principalmente o equol, sugerindo sua utilização como ingrediente para bebidas funcionais como opção para indivíduos não produtores deste composto bioativo.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Identificar os compostos fenólicos do extrato hidrossolúvel de soja antes e após os processos de biotransformação (fermentativo e com o extrato semipurificado de tanase de *P. variotii*) por espectrometria de massas;
- Caracterizar a forma enantiomérica do equol obtido pelos processos de biotransformação estudados;
- Otimizar as condições do processo fermentativo e da reação entre os substratos polifenólicos e o extrato semipurificado de tanase de *Paecilomyces variotii*;
- Purificar a tanase de *P. variotii* e avaliar a biotransformação dos padrões de isoflavonas e da matriz extrato hidrossolúvel de soja com o extrato semipurificado de tanase imobilizado;
- Testar o extrato hidrossolúvel de soja antes e após biotransformação em estudos *in vivo* para modelos anti-inflamatórios e de quimioprevenção.

ANEXOS

ANEXO 1 - Caracterização do extrato semipurificado de tanase

O extrato semipurificado de tanase de *Paecilomyces variotii* utilizado nos ensaios foi primeiramente caracterizado quanto o seu teor de proteínas totais, sua atividade e atividade específica nas condições empregadas no estudo (pH 7,4 e 40 °C). Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 1 a seguir.

O teor de proteínas totais do extrato semipurificado de tanase foi determinado segundo Bradford (1976) com o resultado expresso em mg de proteína/g enzima. A determinação da atividade enzimática foi realizada conforme o método de Battestin & Macedo (2007b), como descrito anteriormente no capítulo II.

Tabela 1: Medida da atividade enzimática específica de tanase do extrato enzimático semipurificado de *Paecilomyces variotii*.

Atividade de tanase	Atividade (U* / g enzima)	Proteínas totais (mg proteína / g enzima)	Atividade específica (U* / mg proteína)
Extrato semipurificado de tanase de <i>Paecilomyces variotii</i>	89,53	311,97	0,287

*1U de atividade enzimática foi definida como a quantidade em μmol de ácido gálico formado por minuto de reação.

Com o objetivo de avaliar se o extrato semipurificado de tanase sofria alguma alteração durante as condições de análise que pudesse comprometer os cromatogramas obtidos nas reações dos isofalvonóides, o controle da enzima foi avaliado por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) e os cromatogramas processados a 254 nm.

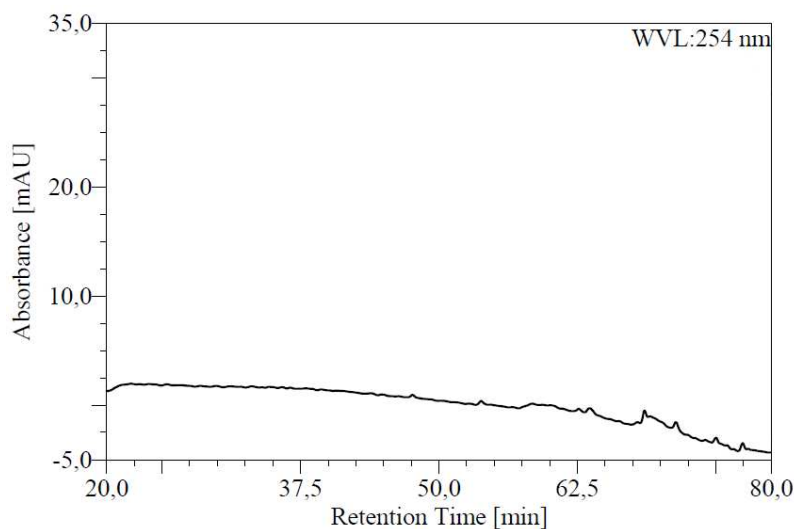


Figura 1 - Cromatograma obtidos por CLAE-DAD da tanase de *Paecilomyces variotii* no tempo de 30 minutos de reação a 40 °C em tampão fosfato 75 mmol.L⁻¹ pH 7,4 processado a 254 nm.

Conforme o esperado, o cromatograma do controle da enzima apresentou baixa intensidade dos sinais e pouca alteração no perfil cromatográfico durante os 30 minutos de reação, indicando que simplesmente a presença da tanase no meio reacional não foi capaz de gerar qualquer modificação significativa no perfil dos isoflavonoides reagidos.

ANEXO 2 - Caracterização dos padrões comerciais de isoflavonas

Os padrões comerciais de isoflavonas, daidzina, genistina, daidzeína, genisteína e equol, foram caracterizados por CLAE-DAD para definição do tempo de retenção e perfil de absorção de cada composto nas condições de análise (Figura 2).

Para todos os polifenóis avaliados sem reação com o extrato semipurificado de tanase, os cromatogramas não apresentaram diferença com o decorrer do tempo de reação, logo não sofreram degradação espontânea devido às condições de análises.

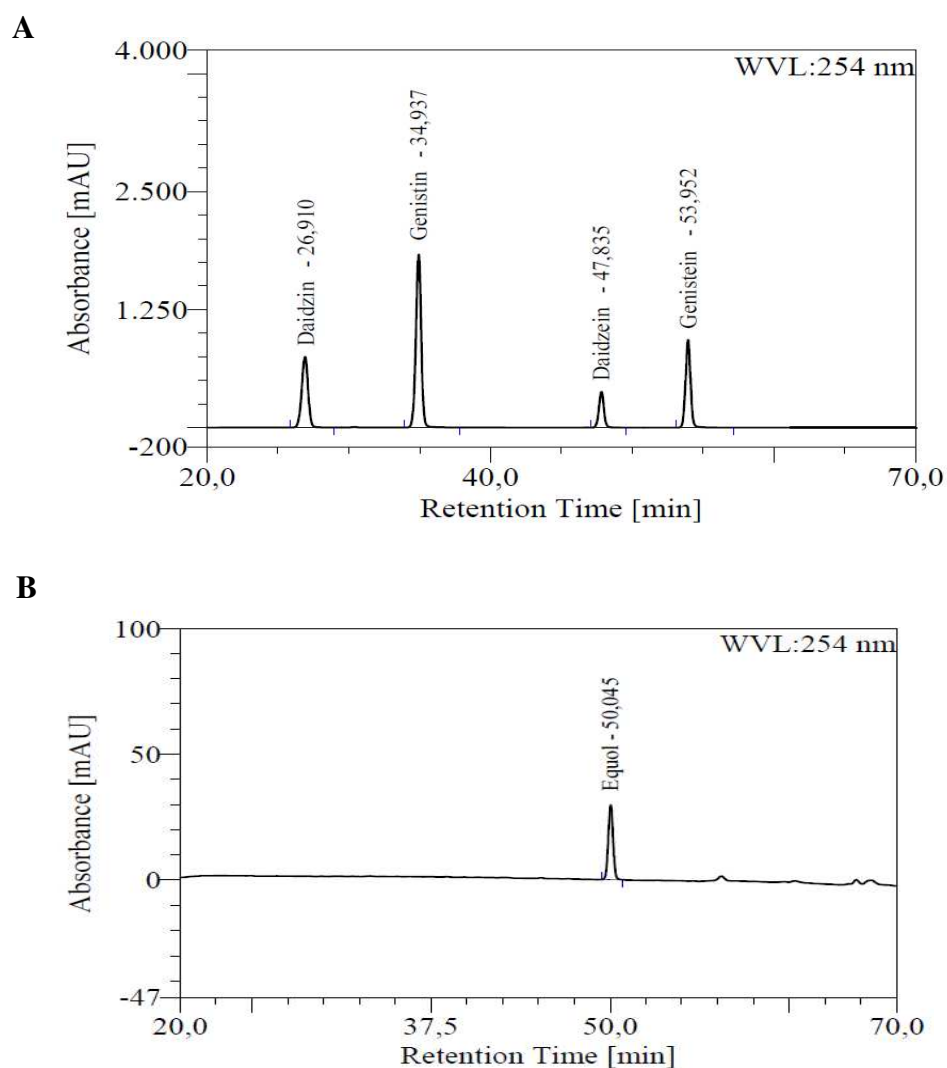


Figura 2 - Cromatograma obtido por CLAE-DAD com tempo de retenção dos padrões de isoflavonoides (A) daidzina, genistina, daidzeína, genisteína e (B) equol em tampão fosfato 75 mmol.L⁻¹.