UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS

TRANSFORMAÇÕES FÍSICA E BIOQUÍMICA DE ISOFLAVONAS CONJUGADAS DE SOJA (*Glycine max* L.) E O EFEITO NA ATIVIDADE BIOLÓGICA *in vitro*

CLAUDIO LIMA DE AGUIAR
Mestre em Ciências

Orientador: Prof. Dr. **YONG KUN PARK**

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Doutor em Ciências de Alimentos.

CAMPINAS
Estado de São Paulo – Brasil
2004

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

Aguiar, Claudio Lima de
Ag93t Transformações física e bioquímica de isoflavonas conjugadas de soja (*Glycine max* L.) / Cláudio Lima de Aguiar. – Campinas, SP: [s.n.], 2004.

Orientador: Yong Kun Park
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Isoflavonas. 2.Glicosidases. 3.Aquecimento. 4.Radiação. I.Park, Yong Kun. II.Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

BANCA EXAMINADORA

Tese defendida e aprovada em ..... de ..... de 2004, pela banca examinadora constituída pelos professores:

Prof. Dr. Yong Kun Park
Orientador

Profa. Dra. Heizir Ferreira de Castro
Membro

Prof. Dr. Jorge Horii
Membro

Prof. Dr. Júlio Marcos Melges Walder
Membro

Prof. Dr. Severino Matias de Alencar
Membro

Profa. Dra. Helena Teixeira Godoy
Membro

Profa. Dra. Siu Mui Tsai
Membro

DEDICATÓRIA

Muito mais presentes que qualquer outra pessoa estavam aqueles aos quais dedico este trabalho, por quem tenho grande admiração e enorme afeto.

Fica registrado aqui meu obrigado,

Aos meus pais e amigos, LAUCIRO e IZABEL.

À RENATA, companheira em mais este trabalho.

Aos meus irmãos, ROGÉRIO e MARCELO, e à SHEILA.

E às minhas novas paixões, MARIA PAULA e ANA TERESA.

AGRADECIMENTOS

Espero ter atingido satisfatoriamente os objetivos e anseios de todos aqueles que acreditaram neste trabalho e no meu esforço. Àqueles que de alguma forma contribuíram para a condução deste trabalho de Tese, fica aqui, nestas linhas, registrado o meu agradecimento.

À DEUS que me deu a oportunidade de realizar mais este trabalho na busca do desenvolvimento científico e divulgação do potencial da Comunidade Científica do Brasil.

Ao Professor Dr. Yong K. Park por ter me dado a oportunidade de realizar este trabalho investigativo.

Ás Professoras Dra. Adilma R. P. Scamparini e Dra. Hélia H. Sato por toda colaboração e apoio durante a realização deste trabalho.

Aos Pesquisadores, Dra. Mercedes C. C. Panizzi, do CNPSo/Embrapa; e Dr. Hipólito A. A. Mascarenhas, do IAC, pelas valiosas doações dos cultivares de soja analisados neste trabalho; e aos Dr. Julio M. M. Walder (CENA/USP); Dr. Marcos N. Eberlin (IQ/UNICAMP); Dr. Elliot W. Kitajima (ESALQ/USP); Engª Gizelda M. Alves (DEQUI/Faenquil); e doutorando Renato Haddad (IQ/UNICAMP), pelas valiosas contribuições analíticas a este trabalho de tese.

Aos funcionários, Beatriz Mello, Eliane Pereira, Guilherme Jacyntho, Karla Neri, Marcelo Funo e Maria das Dores, do DCA/FEA/UNICAMP, pelo companheirismo durante estes anos.

Aos funcionários, Jardete, Marcos Castro e Marcos Sampaio, da Secretária do Departamento de Ciência de Alimentos - UNICAMP, pela amizade durante minha estadia na UNICAMP, e que se mantenha por muitos anos.

Aos AMIGOS, Antonio Sampaio, Severino Matias, Júlio Paredes, Carla Suzuki, Alice, Cristina Lui, Ana Maria e Ezequias, Cristina Ferraz, Gabriela "Biba", Hermelinda, Luciana Ferracini, Luciana Liboni, Márcia, Margarida e Marcelo, Maybi, Mareci, Masaharu, Marcelo Prado, Neiva, Pricila, Rodrigo e Tatiane Pacheco por estarem do meu lado em todas as horas, tendo sido elas fáceis ou difíceis, dando apoio e valiosas sugestões.

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram com este trabalho de tese.

Em 1920, P. Antonio Coiazzi, um dos discípulos do Ven. D. João Bosco, editou um livro intitulado "D. Bosco dizia assim ... ", com diversos pensamentos sobre as formas de educar os pequenos e os adolescentes. Alguns destes pensamentos trago aqui ao vosso conhecimento.

D. Bosco dízía assím ...

> ... se poís o dívíno Mestre se tínha na conta de servo dos seus díscípulos, poderá sem díffículdade fazer o mesmo aquelle que por natureza, por emprego, por míssão, se ímpoz a tarefa de educar ...
>
> ... fazeí-vos amar se quereís que vos respeítem. O educador é um índívíduo consagrado ao bem dos seus alumnos, por ísso deve estar dísposto a arcar com todas as díffículdades, a ímpôr-se todas as canceíras para conseguír o seu fím ...
>
> ... não sejaes parcos ou avaros em díspensar estímulos, em anímar, mas sêde parcos nos elogíos. As palavras de anímação accordam n'alma nossos bríos e energía, sem despertar o orgulho ...
>
> ... tendes rígorosa obrígação de estudar os meíos capazes de corrígír os caracteres maus e ímpedír que sejam nocívos aos caracteres ordínaríos e bons ...
>
> ... prímeíro é precíso pratícar e só depoís ensínar ...

P. Antonio Coiazzi (1920)

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS xiii
LISTA DE TABELAS xvii
LISTA DE QUADROS xix
RESUMO xxv
ABSTRACT xxvii
1. INTRODUÇÃO 1
2. OBJETIVOS 5
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 7
3.1 Alimentos funcionais 7
3.2 Cultura da soja 14
3.3 Transformações bioquímicas de flavonóides 22
3.3.1 Flavonóides 23
3.3.2 Transformações microbianas e enzimáticas 33
3.4 Isoflavonas 59
3.4.1 Atividades biológicas 67
4. MATERIAL E MÉTODOS 91
4.1 Reagentes 91
4.2 Cultivares de soja 91
4.3 Extratos de isoflavonas 93
4.3.1 Extratos alcoólicos de isoflavonas 93
4.3.2 Extrato concentrado de isoflavonas 93
4.4 Análises cromatográficas 94
4.4.1 Cromatografia líquida de alta eficiência 94
4.4.2 Cromatografia em camada delgada 95
4.5 Análises espectrofotométricas 95
4.5.1 Determinação do espectro de absorção máxima 95
4.5.2 Espectros de infravermelho 96
4.6 Espectrometria de massas por ionização em eletrospray 96

4.7 Produção de β-glicosidase 96
4.7.1 Em meio semi-sólido 97
4.7.2 Em meio líquido 97
4.7.3 Atividade enzimática 98
4.8 Conversão de isoflavonas glicosiladas 101
4.9 Propriedades biológicas 101
4.9.1 Atividade antioxidante 101
4.9.2 Inibição do crescimento bacteriano 102
4.9.3 Inibição da hialuronidase 103
4.10 Efeito da radiação gama sobre as isoflavonas 104
4.11 Efeito do aquecimento sobre as isoflavonas 104
4.12 Microscopia eletrônica de varredura 105
4.13 Análise estatística 109
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 111
5.1 Métodos de extração de isoflavonas de soja 111
5.2 Composição de isoflavonas em cultivares e produtos de soja 130
5.3 Efeito da temperatura na transformação de isoflavonas conjugadas 167
5.4 Efeito da radiação gama na transformação de isoflavonas conjugadas 177
5.5 Efeito da β-glicosidase na transformação de isoflavonas glicosiladas 184
5.6 Atividades biológicas dos extratos de soja 241
5.6.1 Atividade antioxidante do extrato metanólico de soja fermentada ... 241
5.6.2 Atividade anti-inflamatória dos extratos metanólico de soja 244
5.6.3 Atividade antimicrobiana dos extratos metanólico de soja 247
6. CONCLUSÃO 253
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 255

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Planta adulta de soja (*Glycine max*) da família das Fabaceae 15

FIGURA 2: Evolução na produção de soja no Brasil entre 1977 e 1998 19

FIGURA 3: Distribuição, em hectares, das áreas de plantio de soja no Estado de São Paulo 19

FIGURA 4: Biossíntese de flavonóides 25

FIGURA 5: Estrutura básica dos flavonóides 25

FIGURA 6: Mecanismo de ação da isoflavona sintase 27

FIGURA 7: Estruturas de algumas classes de flavonóides 31

FIGURA 8: Esquema das posições de modificações freqüentes observadas em flavonóides 37

FIGURA 9: Via metabólica para a daidzeína 41

FIGURA 10: Biossíntese de p-etilfenol a partir da genisteína 43

FIGURA 11: Transformações ocorridas com isoflavonas em humanos e animais domésticos 45

FIGURA 12: Rotas de absorção de polifenóis e seus metabólitos em humanos 49

FIGURA 13: Mecanismo geral de catálise por glicosidases 53

FIGURA 14: Representação de beta-glicosidases 53

FIGURA 15: Transformação enzimática de glicosil-isoflavonas a agliconas 55

FIGURA 16: Estrutura química de uma isoflavona encontrada em soja 59

FIGURA 17: Desesterificação de malonil-isoflavona à beta-glicosil isoflavona 63

FIGURA 18: Atividade antioxidante de flavonóides a partir de mecanismos de formação de quelatos metálicos e pelo seqüestro de radicais livres . 69

FIGURA 19: Representação esquemática de carcinogênese em múltiplos estágios 73

FIGURA 20: Mecanismo proposto para a diminuição da absorção de lipoproteínas de baixa densidade pelas isoflavonas 83

FIGURA 21: Fórmulas estruturais de fitoestrógenos e do 17β-estradiol 87
FIGURA 22: Hidrólise de p-nitrofenil-β-glicopiranosídeo com β-glicosidase 99
FIGURA 23: Equipamento de microscopia eletrônica de varredura e metalizador de amostras 107
FIGURA 24: Espectros de absorção na região UV-visível dos extratos etanólicos de soja 115
FIGURA 25: Espectros de absorção na região UV-visível dos extratos metanólicos de soja 121
FIGURA 26: Cromatografia líquida de alta eficiência de isoflavonas obtidas dos extratos metanólicos de soja IAC 133
FIGURA 27: Estruturas químicas das principais isoflavonas encontradas nos extratos metanólicos de soja 135
FIGURA 28: Cromatograma do extrato metanólico do cultivar BR-36 produzido em cultivo orgânico em Capanema/PR 145
FIGURA 29: Componentes do grão de soja 147
FIGURA 30: Perfis cromatográficos dos extratos metanólicos dos fragmentos de soja 151
FIGURA 31: Organograma de produção de extrato de soja e de tofu a partir de grãos de soja 157
FIGURA 32: Perfis dos compostos separados dos extratos metanólicos de alfafa na cromatografia líquida de alta eficiência 165
FIGURA 33: Perfis cromatográficos das formas isoméricas de isoflavonas tratadas por aquecimento 173
FIGURA 34: Perfis cromatográficos de farinha de soja tratada por aquecimento..... 175
FIGURA 35: Micrografias de varredura de farinhas desengorduradas de soja tratadas com radiação gama 181
FIGURA 36: Potencial hidrogeniônico ótimo para a atividade de β-glicosidase de *A. oryzae* ATCC 22786 191

FIGURA 37: Temperatura ótima para a atividade de β-glicosidase de *A. oryzae* ATCC 22786 191
FIGURA 38: Temperatura de estabilidade para a atividade de β-glicosidase de *A. oryzae* ATCC 22786 193
FIGURA 39: Produção de β-glicosidase de *A. oryzae* ATCC 22786 por fermentação semi-sólida sobre farinha desengordurada de soja 197
FIGURA 40: Perfis cromatográficos em camada delgada de extrato metanólico de farinha de soja submetida à fermentação fúngica 201
FIGURA 41: Cromatografia em camada delgada de isoflavonas em extrato metanólico de soja fermentada com *A. oryzae* ATCC 22786 por diferentes períodos 201
FIGURA 42: Aspecto físico dos extratos metanólicos da farinha desengordurada de soja submetida à fermentação semi-sólida com *A. oryzae* ATCC 22786 205
FIGURA 43: Perfis cromatográficos dos extratos metanólicos de isoflavonas durante a transformação enzimática 209
FIGURA 44: Cinética de conversão de glicosil-isoflavonas às suas formas agliconas 213
FIGURA 45: Espectros de infravermelho de extrato concentrado de soja e mistura de padrões de isoflavonas 219
FIGURA 46: Espectro de massas de ESI/MS em modo negativo da amostra contendo daidzina (*m/z* 415) 223
FIGURA 47: Espectro de massas de ESI/MS/MS em modo negativo da daidzina padrão (*m/z* 415) e daidzina proveniente do extrato metanólico de soja 223
FIGURA 48: Fragmentação da daidzina pela perda neutra de um grupo glicosil e formação do fragmento de *m/z* 253 225
FIGURA 49: Espectro de massas de ESI/MS em modo negativo da amostra contendo genistina (*m/z* 431) 225

FIGURA 50: Espectro de massas de ESI/MS/MS em modo negativo da genistina padrão (*m/z* 431) e genistina proveniente do extrato metanólico de soja 229
FIGURA 51: Espectro de massas de ESI/MS em modo negativo da amostra e seu padrão (genisteína, *m/z* 431) 229
FIGURA 52: Espectro de massas de ESI/MS/MS em modo negativo do íon de *m/z* 269 proveniente da fragmentação da genisteína padrão e extrato de soja 229
FIGURA 53: Espectro de massas de ESI/MS em modo negativo da amostra e seu padrão (daidzeína, *m/z* 253) 233
FIGURA 54: Espectro de massas de ESI/MS/MS em modo negativo do íon de *m/z* 253 proveniente da fragmentação da daidzeína padrão e extrato de soja 233
FIGURA 55: Estruturas dos compostos malonil-daidzina, malonil-genistina e malonil-glicitina 233
FIGURA 56: Espectro de massas de ESI/MS/MS do extrato contendo malonil-daidzina (*m/z* 501) e seus fragmentos 237
FIGURA 57: Espectro de massas de ESI/MS/MS do extrato contendo malonil-genistina (*m/z* 517) e seus fragmentos 237
FIGURA 58: Espectro de massas de ESI/MS/MS do extrato contendo malonil-glicitina (*m/z* 531) e seus fragmentos 237
FIGURA 59: Mecanismo de fragmentação para os compostos; malonil-daidzina, malonil-genistina e malonil-glicitina 239
FIGURA 60: Antibiograma das amostras de extratos alcoólicos de soja 249

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Alimentos e componentes relacionados a algum dano ou benefício à saúde humana 9

TABELA 2: Efeitos antitumorais de isoflavonas de soja 13

TABELA 3: Classificação de fitoestrógenos 80

TABELA 4: Afinidade relativa de vários compostos aos receptores ER-α e ER-β..... 86

TABELA 5: Denominações dos cultivares de soja 92

TABELA 6: Extração de isoflavonas de farinha desengordurada de soja com solução alcoólica 123

TABELA 7: Efeito da acidificação na extração de isoflavonas de farinha de soja..... 127

TABELA 8: Teores de isoflavonas de diferentes cultivares de soja brasileira 139

TABELA 9: Porcentagem de sólidos solúveis na fração hexânica durante o desengorduramento das farinhas de soja 141

TABELA 10: Teores de isoflavonas de cultivares de soja paranaense 141

TABELA 11: Teores de isoflavonas de cultivar de soja orgânica paranaense 145

TABELA 12: Conteúdos de isoflavonas no hipocotilédone, cotilédone e casca de soja brasileira 153

TABELA 13: Conteúdos de isoflavonas nas etapas de produção de extrato hidrosolúvel de soja 154

TABELA 14: Conteúdos de isoflavonas nas etapas de produção de tofu..... 155

TABELA 15: Composição de isoflavonas presentes em extratos solúveis de soja. 160

TABELA 16: Conteúdo de isoflavonas em cápsulas comerciais de isoflavonas .. 161

TABELA 17: Conteúdos de isoflavonas em sementes e grãos comestíveis 163

TABELA 18: Conteúdo de isoflavonas de farinhas de soja tratadas por aquecimento 168

TABELA 19: Conteúdo de isoflavonas em farinhas de soja tratadas por aquecimento 172
TABELA 20: Conteúdo de isoflavonas em extrato metanólico de soja tratada por radiação gama 178
TABELA 21: Conteúdo de isoflavonas em farinha desengordurada de soja tratada por radiação gama 179
TABELA 22: Atividades enzimáticas para β-glicosidase de alguns fungos filamentosos 185
TABELA 23: Número de colônias desenvolvidas após exposição dos esporos de *A. oryzae* ATCC 22786 a radiação UV 187
TABELA 24: Produção de β-glicosidase por diferentes mutantes de *A. oryzae* ATCC 22786 obtidos após exposição de cultura parental com luz UV por 10, 30 e 60 min 188
TABELA 25: Perfil de isoflavonas durante conversão de glicosil-isoflavonas por β-glicosidase de mutantes morfológicos de *A. oryzae* ATCC 22786 .. 189
TABELA 26: Variação no conteúdo de isoflavonas durante fermentação em estado sólido de farinha de soja com *A. oryzae* ATCC 22786 200
TABELA 27: Características cromatográficas das manchas separadas de extrato metanólico de soja por CCD 203
TABELA 28: Conversão de glicosil-isoflavonas de farinha de soja em agliconas.. 207
TABELA 29: Valores de freqüências no infravermelho dos compostos presentes no extrato metanólico de soja 216
TABELA 30: Atividade antioxidante de extratos metanólicos de isoflavonas 241
TABELA 31: Atividade antioxidante de extratos metanólicos de soja hidrolisados e submetidos a diferentes temperaturas 242
TABELA 32: Atividade anti-inflamatória dos extratos de soja 245
TABELA 33: Atividade anti-inflamatória dos extratos de soja 246

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1: Transformações microbianas de flavonóides 35

LISTA DE PUBLICAÇÕES

Esta Tese de Doutorado foi baseada em dados experimentais originais obtidos ao longo de três anos de estudos, os quais deram origem à publicações em diferentes revistas científicas e de divulgação científica. Estas publicações foram listadas abaixo em ordem cronológica, bem como a citação de uma patente registrada no Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI) e outra em fase de encaminhamento, ambas obtidas pelo Laboratório de Bioquímica de Alimentos da Unicamp.

- ✓ **Aguiar, C.L.**; Baptista, A.S.; Walder, J.M.M.; Haddad, R.; Eberlin, M.N.; Park, Y.K. Changes on isoflavone profiles in soy-based products treated by γ-radiation. Journal of Food Composition and Analysis (Itália), x(x): x-x, 2004. (**submetido**)

- ✓ **Aguiar, C.L.**; Baptista, A.S.; Walder, J.M.M.; Park, Y.K. Isoflavone profiles of γ-irradiated defatted soy flour. Nahrung (Alemanha), x(x): x-x, 2004. (**submetido**)

- ✓ **Aguiar, C.L.**; Park, Y.K. Transformações enzimáticas e microbianas de flavonóides presentes em compostos naturais. Boletim da SBCTA, x(x): x-x, 2004. (**submetido**)

- ✓ **Aguiar, C.L.**; Paredes-Guzmán, J.F.; Alencar, S.M.; Park, Y.K. Transformación de las β-glicosil isoflavonas por fermentación semi-sólida de harina de soja con *Aspergillus oryzae*. Ciencia y Tecnología Alimentaria (Espanha), 4(2): 115-121, 2003.

- ✓ **Aguiar, C.L.**; Paredes-Guzmán, J.F.; Park, Y.K. Decomposición por calentamiento de las isoflavonas de soja. Alimentos (Peru), x(x): x-x, 2003. (**aceito**)

- ✓ Park, Y.K.; **Aguiar, C.L.**; Alencar, S.M. Conversão de malonil-β-glicosil isoflavonas em isoflavonas glicosiladas presentes em soja brasileira. Ciência e Tecnologia de Alimentos (Campinas/SP), 22(2): 130-135, 2002.

- ✓ **Aguiar, C.L.** Isoflavonas de soja e propriedades biológicas. Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos (Curitiba/PR), 20(2): 323-334, 2002.

- ✓ Park, Y.K.; **Aguiar, C.L.**; Alencar, S.M.; Mascarenhas, H.A.A.; Scamparini, A.R.P. Evaluación del contenido de isoflavonas en soja brasileira. Ciencia y Tecnología Alimentaria (Espanha), 3(3): 156-160, 2001.

- ✓ Park, Y.K.; Alencar, S.M.; Nery, I.A.; **Aguiar, C.L.**; Pacheco, T.A.R.C. Enrichment of isoflavone aglycones in extracted soybean isoflavones by heat and fungal β-glucosidase. Food Science and Industry (Coréia do Sul), 34(4): 14-19, 2001.

- ✓ Park, Y.K.; **Aguiar, C.L.**; Alencar, S.M.; Scamparini, A.R.P. Biotransformação de β-glicosil isoflavonas de soja em isoflavonas agliconas por β-glicosidase fúngica. Documentos da Embrapa (Londrina/PR), 169: 33-36, 2001.

- ✓ Park, Y.K.; **Aguiar, C.L.**; Alencar, S.M.; Scamparini, A.R.P. Biotransformação de isoflavonas de soja: aplicação da biotecnologia enzimática na conversão de isoflavonas com maior atividade biológica. Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento (Brasília/DF), 20(3): 12-14, 2001.

- ✓ Park, Y.K.; **Aguiar, C.L.**; Alencar, S.M. Saudável e Natural: estudos na Unicamp abrem caminho para a produção de isoflavonas extraídas de soja e de novos usos da própolis. Pesquisa, 69(10): 55-57, 2001.

- ✓ Processo de recuperação de isoflavonas agliconas a partir de subprodutos e resíduos da produção de proteínas concentradas e isoladas de soja. Patente de Invenção, 2003. (**Encaminhada**).

- ✓ Processo de extração e transformação de isoflavonas glicosiladas de soja em isoflavonas agliconas. Patente de Invenção, INPI nº PI 1111114237 - 4, de 04/set/2000.

ABREVIAÇÕES

ω-3	Ácidos graxos do tipo ômega-3
ϕ	Diâmetro
•R	Representação de um radical livre
AICR	American Institute of Cancer Research
ATCC	American Type Culture Colection
ATP	Adenosina trifosfato
b.s.	Base seca
BRS	Codificação de cultivares da Embrapa
CATI	Coordenadoria de Assistência Técnica Integral
CCD	Cromatografia em camada delgada
cit-P450	Citocromo P 450
CLAE-FR	Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa
CNPSo	Centro Nacional de Pesquisas em Soja
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
DHA	Ácido decasohexanóico
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EC	Enzyme Commission
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agro-pecuária
EPA	Ácido eicosapentanóico
ER-α	Receptor de estrógeno α
ER-β	Receptor de estrógeno β
F_{254}	Fluorescência a 254 nm
FDA	Food and Drug Administration
FTIR	Infra-vermelho com transformada de Fourrier
Gebana	Arbeitsgemeinschaft gerechter Bananenhandel
HDL	Lipoproteínas de alta densidade
Hep-G2	Hepatoma humano
HGC-27	Câncer gástrico humano
HL-60	Leucemia humana
HT-29	Células cancerosas de cólon humano

IAC	Instituto Agronômico de Campinas
IDL	Lipoproteínas de densidade intermediária
IFO	Institute for Fermentation, Osaka
kV	Quilovolts
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
MCF7	Células de adenocarcinoma de mama
MDA-MB-231	Células cancerosas de mama humano
Me^{n+}	Íon metálico de valência n
MOLT-16	Células T de leucemia humana
m/v	Massa por volume
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NRRL	Northern Regional Research Laboratories
ODS	Octadecilsilano
PI	Fosfoinositídeo
PKC	Proteína quinase C
pNP	p-Nitrofenol
pNPG	p-Nitrofenil-β-glicopiranosídeo
PTFE	Politetrafluoroetileno
Q-tof	Quadrupolo - Tempo de vôo (*time of fight*)
RH	Representação de uma fonte potencial de radicais livres
RP	Reverse-phase
t-PA	Ativador plasminogênico
TRH	Terapia de reposição hormonal
UV	Ultra-violeta
VLDL	Lipoproteínas de densidade muito baixa
v/v	Volume por volume

RESUMO

As isoflavonas são conhecidas por suas atividades biológicas tais como, atividades estrogênica, antifúngica, antioxidante e antitumoral (mama e próstata), além de inibir a atividade de enzimas ligadas à divisão celular, sendo estas atividades biológicas mais acentuadas nas formas agliconas que glicosiladas. Sua presença em produtos de soja, tem sido relatada como importante para a saúde humana, além do que o Brasil é o maior exportador de soja no mundo a partir de 2003. O presente trabalho de tese teve como objetivos, avaliar os teores de isoflavonas e seus conjugados presentes em cultivares de soja brasileiros e em alguns produtos à base de soja, bem como, discutir os efeitos associados à presença de isoflavonas, em suas diferentes formas, nas propriedades biológicas (antioxidante, antiinflamatória e antimicrobiana) encontradas em extratos alcoólicos de soja. Analisou-se os teores de isoflavonas em cultivares de soja (*Glycine max* L.) provenientes de diferentes órgãos estaduais e federais de pesquisa em soja e o efeito da temperatura na extração de isoflavonas de soja. As concentrações mais elevadas de isoflavonas foram obtidas principalmente por extração alcoólica em solução 80 ou 90% de metanol e solução 60 ou 70% de etanol. Foi avaliada a composição de isoflavonas presentes em soja, após tratamento térmico e por radiação gama. A farinha de soja foi tratada por aquecimento a 100 e 121ºC por 20, 40 e 60 min; a 121ºC por 40 e 60 min, malonil-isoflavonas em farinha de soja foram completamente transformadas a glicosil-isoflavonas. A radiação gama também promoveu a redução no conteúdo de isoflavonas. O extrato

metanólico de soja tratado por radiação gama apresentou uma perda gradual no conteúdo de isoflavonas totais (perda de 33,5%), mas em farinha de soja, rica em fibras, a radiação gama teve pouco efeito (perda de 9,96%). Por outro lado, o fungo filamentoso *Aspergillus oryzae* ATCC 22786 produziu alta atividade de β-glicosidase, a qual foi capaz de converter glicosil-isoflavonas em agliconas presentes em farinha de soja. Glicosil-isoflavonas (daidzina, glicitina e genistina) foram eficientemente transformadas às suas formas agliconas (daidzeína, gliciteína e genisteína) por fermentação em estado sólido por 48 h a 30ºC com esporos (10^7 esporos/mL) ou pela β-glicosidase de *A. oryzae*, após 30 min a 40ºC. Após o tratamento da farinha de soja com β-glicosidase, 85,5% das glicosil-isoflavonas foram hidrolisadas às formas agliconas. O tratamento térmico a 121ºC seguido da reação enzimática, produziu grande quantidade de isoflavonas agliconas. Portanto, o tratamento combinado de aquecimento a 121ºC e reação com β-glicosidase de *A. oryzae* ATCC 22786 pode transformar eficientemente malonil-isoflavonas a glicosil-conjugados e, posteriormente, a agliconas. Além disso, os extratos metanólicos de farinha de soja tratada com aquecimento e β-glicosidase demonstraram elevadas atividades antioxidantes. No entanto, o tratamento com aquecimento e reação enzimática não mostrou claramente um aumento nas atividades antimicrobiana e antiinflamatória.

ABSTRACT

The isoflavones from soybean are known to have several biological properties such as estrogenic, antimicrobial and antitumoral (breast and prostate) activities, besides inhibiting the activity of enzymes linked to the cellular division. These properties are shown to be more accentuated in the aglycone than glycoside forms. Their presence in soy products have been reported with a number of beneficial health effects. In addition, Brazil is a major soybean producer in the World. The main objectives of this work of Thesis was to evaluate the isoflavone contents, and its conjugate forms, present in different Brazilian soybean cultivars, as well as, in some soy products. Other objective of this work, was to discuss the effects associated to the presence of isoflavones with some biological properties (antioxidant, anti-inflammatory, and antimicrobial) into alcoholic extracts of soybean. The isoflavone contents was analyzed in different soybean cultivars donated by State and Federal Organization on Soy Research, and the effect of the temperature in the extraction of soybean isoflavones. The high isoflavone concentrations were obtained mainly by alcoholic extraction using 80% methanol and 60% ethanol solutions. As a major soybean producer, Brazil finds important to characterize the isoflavone composition of the some Brazilian soybean cultivars, which were treated with heat processing and gamma irradiation. Soybean flour was treated by heating at 100 and 121ºC for 20, 40, and 60 min. At 121ºC for 40 and 60 min, the isoflavone malonate into defatted soybean flour was completely converted to their glycoside conjugates. Gamma irradiation also promoted some

reduction in isoflavone profiles. The methanolic extract of soybean treated by γ-radiation had a gradual decreasing in their isoflavone contents (loss of 33.5%), but on soybean flour, rich in fiber, the γ-radiation had a little effect (loss of 9.96%). On the other hand, the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* ATCC 22786 a high β-glucosidase producer, was found to be able to convert glycoside isoflavones to aglycones forms present into soybean flour. It was observed that the glycoside isoflavones extracted such as, daidzin, glycitin and genistin, were efficiently transformed into their aglycones forms (daidzein, glycitein and genistein) by solid-state fermentation after 48 h at 30ºC with *A. oryzae* spores (10^7 spores/mL) or β-glucosidase after 30 min at 40ºC. After treatment of the methanolic extracts with β-glucosidase, 85.5% of glycoside isoflavones were hydrolyzed by this enzyme to form aglycones. The enzymatic reaction on the methanolic extract from the soybean sample treated at 121˚C indicated that the glycoside isoflavones were efficiently transformed into aglycones. Therefore, combined application of heat treatment at 121˚C and the fungal β-glucosidase could transform efficiently malonylglycoside isoflavones and glycoside isoflavones to aglycones. Furthermore, methanolic extracts of soybean sample treated by heating and with β-glucosidase demonstrated higher antioxidant activity. However, the treatment by heating and enzyme reaction do not show an increasing in the antimicrobial and anti-inflammatory activities

1. INTRODUÇÃO

Tradicionalmente, os alimentos estão associados às características energéticas e nutritivas, como fontes de carboidratos, proteínas e lipídeos, porém recentemente houve um aumento do interesse por alguns ingredientes biologicamente ativos de sua composição química. Estes alimentos, denominados nutracêuticos, podem agir na prevenção de doenças, como tem sido mostrado em diversos estudos científicos. Governos, agências de saúde e grupos de pesquisa ressaltam que os hábitos alimentares estão associados à promoção da saúde e prevenção de doenças.

Entre os vários alimentos que constituem a dieta humana, a soja e seus produtos têm ganhado grande importância na atualidade, devido à possibilidade de prevenção de doenças degenerativas, como tumores de mama e próstata, doenças cardiovasculares e osteoporose. Fato visível é o Japão, onde a expectativa de vida é de 80 anos (76,9 para os homens e 82,9 para as mulheres). Isto se deve a diferentes fatores, como aprimoramento da medicina e, principalmente, à alimentação. Diferentes estudos têm mostrado que a dieta japonesa é a maior responsável pela longevidade e é reconhecida pelo seu balanço nutricional. Apenas a metade das proteínas ingeridas vem de origem animal; sendo o restante de proteína de soja e de outras fontes. A ingestão em grande quantidade de grãos, algas e vegetais é também importante. Desta forma, muitos pesquisadores têm

discutido algumas das propriedades biológicas das isoflavonas e da proteína de soja.

Produtos secundários do metabolismo das plantas, tais como terpenóides, cardenolídios, coumarinas, antraquinonas, glicosilatos, alcalóides e flavonóides, são responsáveis por muitas destas propriedades biológicas e são utilizados como princípios ativos de fármacos, flavorizantes, ingredientes alimentícios ou agroquímicos. Sabe-se que flavonóides de frutas, hortaliças, produtos apícolas e soja (*Glycine max* L.), como as isoflavonas, em suas diferentes formas, têm papel importante no corpo humano, podendo agir como antioxidantes, anti-inflamatórios, antimicrobianos entre outras atividades biológicas, tornando os alimentos que os contém um alimento funcional ou nutracêutico. Eldridge (1982) e Fukutake et al. (1996) afirmam que genistina e daidzina são as principais isoflavonas, constituindo de 50 a 90% dos flavonóides presentes na farinha de soja. Outros compostos derivados destes compostos glicosilados foram identificados e compreendem as formas acetil e malonil. Park et al. (2001a), analisando diferentes cultivares de soja de uma mesma região brasileira, constataram grande variação na concentração total dessas isoflavonas. Segundo Carrão-Panizzi et al. (1998), a concentração de isoflavonas em soja é geneticamente determinada e afetada por fatores ambientais e pela temperatura local. Segundo Genovese e Lajolo (2001b), os fatores que afetam a composição de isoflavonas em soja estão também relacionados à (1) variedade e condições de cultivo; (2) às condições de processamento da soja, ou ainda (3) às metodologias de análise. A metodologia de análise é uma etapa

importante na avaliação do teor de isoflavonas em soja, sendo necessário o estabelecimento de um método eficiente de extração como também de análise, que atualmente se baseia principalmente na análise por cromatografia líquida de alta eficiência.

2. OBJETIVOS DO ESTUDO

A soja, uma leguminosa alta e regularmente consumida em países orientais, contém elevadas concentrações de isoflavonas. Muitos estudos científicos têm mostrado que as isoflavonas são ativas contra diversas doenças humanas, como osteoporose, doenças cardiovasculares e canceres de mama e próstata, mas o processamento dos grãos, usados para preparar alimentos derivados de soja, podem reduzir o conteúdo das isoflavonas e assim as propriedades biológicas associadas a estes compostos fenólicos, tais como: antifúngica, anti-hemolítica, antioxidante e anti-inflamatória.

Na busca de um maior entendimento sobre as isoflavonas de diferentes cultivares de sojas brasileiras, o presente estudo teve como objetivos:

1) Avaliar os teores de isoflavonas em cultivares de soja brasileira.
2) Avaliar sistemas de extração das isoflavonas.
3) Verificar o efeito da temperatura na composição das isoflavonas.
4) Analisar a conversão enzimática das isoflavonas glicosiladas a agliconas.
5) Verificar as atividades antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana dos extratos alcoólicos de isoflavonas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Alimentos Funcionais

As plantas são fontes de diferentes compostos químicos bioativos de grande importância para a medicina, os quais são objeto de inúmeras investigações científicas e uso empírico por pessoas da zona rural, e porque não de pessoas da zona urbana, as quais cultivam pequenos vasos com diferentes plantas medicinais. Muitas destas plantas são amplamente consumidas na dieta humana, podendo ser benéficos à saúde (Maciel et al., 2002). Compostos bioativos incluem um número de compostos químicos com diferentes estruturas químicas tais como carotenóides, ácidos fenólicos, fitoesteróis, ácidos graxos (ω-3), sulfetos de alila, benzopiróis e flavonóides. Estes compostos podem ser benéficos pela ação antioxidante; ativando enzimas hepáticas contra intoxicações; bloqueando a atividade tóxica de bactérias ou vírus; inibindo a absorção de lipoproteína de baixa densidade (LDL); inibindo a agregação de plaquetas; ou ainda, inibindo o desenvolvimento de bactérias gastrointestinais indesejáveis (Herrmann et al., 2001). Por outro lado, o consumo destes alimentos funcionais tem aumentado e as indústrias produzem um número cada vez maior desses produtos. Alimentos funcionais, em linha gerais, são alimentos que promovem algum benefício à saúde ou que tem papel na prevenção de doenças. Para Pacheco e Sgarbieri (2001), alimentos funcionais são aqueles que contêm em sua composição, substâncias nutrientes ou não nutrientes, capazes de

modular as respostas metabólicas do indivíduo, que resultam em maior proteção e estímulo à saúde. Atuam melhorando as condições de saúde, promovendo o bem estar dos indivíduos, prevenindo o aparecimento precoce de doenças degenerativas, permitindo o aumento da longevidade com qualidade de vida. Podem ser classificados como alimentos funcionais, quaisquer alimentos natural ou formulado, que contenham uma ou mais substâncias capazes de atuar no metabolismo ou na fisiologia humana, no sentido de promover benefícios à saúde (Pacheco e Sgarbieri, 2001).

A legislação americana define um alimento funcional como *suplemento dietético, alimento ou alimento medicinal que possui benefícios à saúde e é seguro para consumo humano em quantidade e freqüência requeridas para se alcançar as propriedades sugeridas ao produto*. Muitos alimentos ou componentes de alimentos são ditos nutracêuticos e têm sido adicionados a alimentos industrializados como o suco de laranja enriquecido com cálcio, que tem a propriedade de prevenir a osteoporose. A Food and Drug Administration (FDA) lista doze alimentos ou componentes relacionados à saúde humana, como mostrados na Tabela 1 (Henry, 1999).

Tabela 1: Alimentos e componentes relacionados a algum dano ou benefício à saúde humana.

Alimentos/Componentes	Relação com a saúde
Cálcio	Previne osteoporose
Dieta rica em lipídios saturados	Podem causar câncer
Sódio	Podem causar hipertensão
Dieta rica em gordura saturada e colesterol	Podem causar doenças coronarianas
Grãos, frutas e vegetais ricos em fibras	Previne câncer
Grãos, frutas e vegetais ricos em fibras solúveis	Previne doenças coronarianas
Frutas e vegetais	Previne câncer
Folato	Protege contra defeitos no tubo neural
Polióis	Protege contra cáries dentais
Fibras solúveis de aveia ou vagem	Protege contra doenças coronarianas
Proteína de soja	Previne contra doenças coronarianas
Grãos integrais	Previne certos tipos de câncer, incluindo de intestino, cólon, esôfago e estômago.

Fonte: (Henry, 1999)

Ultimamente tem ocorrido um rápido desenvolvimento científico na prevenção de doenças. Hoje está claro que determinadas proteínas são fontes de peptídeos biologicamente ativos, sendo que estes podem ter atividade similar à de hormônios, e que estes peptídeos são inativos quando incorporados em proteínas. E da mesma forma, a quitina e quitosana têm demonstrado atividades anti-tumorais e aumentado a atividade imunomodulatória (Smacchi e Gobberti, 2000). Por outro lado, os oligômeros de quitina e de quitosana demonstram uma atividade biológica ainda maior do que as formas originais de quitina e quitosana. É também sabido que ácidos graxos poliinsaturados como ômega-3, ácido

eicosapentanóico (EPA) e ácido decasohexaenóico (DHA), são extensamente empregados na melhora da saúde humana. Probióticos como *Lactobacillus* sp. e *Bifidobacterium* sp., e prebióticos como vários oligossacarídeos derivados de sacarose, amido, inulina e lactose também são amplamente utilizados como alimentos funcionais (Rao, 2001; Passos e Park, 2003).

Sabe-se que flavonóides contidos em frutas, hortaliças e soja têm papel importante no corpo humano. Foi comprovado que os flavonóides agliconas apresentam atividades antioxidantes maiores do que suas formas conjugadas (p. ex., as glicosiladas) (Park et al., 2001c). A soja (*Glycine max* L.) contém altas concentrações de daidzina e genistina, que são isoflavonas glicosiladas, sendo estas passíveis de serem transformadas em agliconas por processos enzimáticos.

Um fato visível da associação da alimentação à base de soja e a saúde reside no povo japonês. A expectativa de vida no Japão é de 80 anos, sendo de 76,9 para os homens e de 82,9 para as mulheres. Isto tem sido relacionado a diferentes fatores, como o aprimoramento da medicina, mas diversos estudos têm mostrado que a dieta japonesa é a maior responsável pela longevidade, devido ao seu balanço nutricional. Apenas a metade das proteínas ingeridas é de origem animal, sendo o restante da proteína de soja e outras fontes vegetais e algas (Weisburger, 2000).

Do ponto de vista mercadológico, o consumo de alimentos funcionais tem aumentado e as indústrias têm colocado à disposição dos consumidores um número cada vez maior destes produtos. Em matéria divulgada no "Nutrition

Business Journal" estima-se que o valor do mercado americano para alimentos funcionais foi de US$ 19,6 bilhões em 1999 e que atingiu cerca de US$ 20 bilhões em 2000, o que constituiria 10% do mercado total de alimentos para 2010, quando poderá atingir cerca de US$ 60 bilhões, de acordo com as projeções da revista (Henry, 1999).

Nos Estados Unidos, foi feito um levantamento no ano de 1997 sobre as causas de mortes, ficando estas distribuídas em: 31% por doenças coronarianas; 23% por câncer; 7% por doenças cerebrovasculares; e 5% por doenças obstrutivas do pulmão (Weisburger, 2000). Atualmente, as cardiopatias são uma das principais causas de morte em todo o mundo, seguida pelos vários tipos de câncer. Felizmente, muitos estudos têm mostrado a capacidade de prevenção destas doenças pela adoção de uma dieta rica em soja (Morais, 2001; Maranhão, 2001). A partir dos anos 90, após a constatação científica de que a soja possui compostos biologicamente ativos, tem se verificado um crescente interesse pela soja como fonte alimentar. Inúmeros resultados de estudos dietéticos tem evidenciado os efeitos da soja na redução do colesterol sanguíneo, nos riscos com doenças cardiovasculares e nos sintomas do climatério, quando é uma alternativa à reposição convencional de hormônios. Após análise de mais de 50 estudos clínicos, a FDA aprovou a inclusão, nos rótulos de produtos à base de soja, da informação de que *o consumo diário de 25 g de proteína de soja em dietas com reduzido teor de gorduras saturadas, reduz os riscos de doenças cardiovasculares* (Carrão-Panizzi, 2001).

Na Tabela 2 é possível observar alguns dos componentes de soja e seus efeitos identificados contra certos tipos de tumores.

Tabela 2: Efeitos antitumorais de isoflavonas de soja.

Tipo de Câncer	Composto ou Alimento	Espécie ou Tipo Celular	Efeito ou Resultado
Mama	Genisteína	Células MCF-7 [a]	Competição com estradiol
	Dieta de fitoestrógeno	Mulheres	Baixa excreção em mulheres com alto risco
	Chips de soja	Ratos	Inibição do crescimento tumoral
	Genisteína, Biochanina A	Células MCF-7 [a]	Inibição da proliferação [b]
Cólon	Absorção de soja	Japoneses (as)	Redução do risco
Gástrico	Genisteína	Células HGC-27	Inibição do crescimento
Gástrico, esôfago e cólon	Genisteína, Biochanina A	Muitos tipos de células	Inibição da proliferação [b]
Fígado	Genisteína	Células HepG2	Inibição da proliferação [b]
Próstata	Produtos de soja	Ancestrais de japoneses	Menor incidência
Prostatite	Alimentos de soja	Ratos	Efeito preventivo
Displasia prostática	Alimentos de soja	Cobaias machos	Inibição
Leucemia	Genisteína	Células humanas MOLT-4 e HL-60	Inibição do ciclo celualr, progressão e crescimento
	Genisteína	Células humanas HL-60 e K562	Indução da diferenciação
Leucemia mielóide	Daidzeína	Células HL-60	Indução da diferenciação
Melanoma	Genisteína	Cinco tipos de células	Indução da diferenciação
Tumores pediátricos sólidos	Genisteína	Neuroblastoma, sarcoma humano	Inibição da proliferação [b]
Células endoteliais	Genisteína	Células endoteliais	Inibição da angiogênese

[a] Células cancerígenas de mama. [b] Alguns estudos ressaltam que a genisteína e a biochanina A podem ter efeito bifásico dependendo da concentração, sendo assim definida: inibição (20 e 80 μM) e estímulo (0,1 e 10 μM - ocorre síntese de DNA).

Fonte: Adlercreutz (1995)

Face à importância da soja, não somente para a melhora do *status* nutricional, mas também devido às suas implicações com a prevenção de doenças degenerativas, aliadas à sua grande disponibilidade no Brasil, é evidente a necessidade de promoção e divulgação das suas propriedades.

3.2 Cultura da Soja

A soja é um alimento rico em proteínas, vitaminas, minerais e fibras e que vem sendo utilizada milernamente pelas culturas asiáticas, sendo que os Estados Unidos até 2001 era o maior produtor, e contribuía com cerca de 50% da produção mundial, seguido pelo Brasil e Argentina (Maranhão, 2001). A soja (Figura 1) é uma das mais importantes oleaginosas cultivadas no mundo. Seu alto teor em proteínas a torna fundamental na alimentação animal e humana, além de seus sub-produtos oferecerem uma grande diversidade de uso para a indústria alimentícia. No Brasil, a soja começou a ser cultivada no final do século XIX (1882), embora tenha sido mencionada somente em 1941 nas estatísticas oficiais de produção de grãos do Rio Grande do Sul (Vernetti, 1977). Atualmente (Safra 2002/03), o Brasil é o maior produtor e exportador do mundo, com uma área colhida de 18,1 milhões de hectares, contribuindo com 50,3 milhões de toneladas de grãos produzidos, contra os 41,9 milhões de toneladas da safra 2001/02 (CONAB, 2003). O complexo-soja (grão, farelo e óleo) liderava, em 2002, o balanço comercial brasileiro, com um superávit de quase 5 bilhões de dólares por ano, com cerca de 2/3 da produção destinada ao mercado externo (Agrianual, 2002). Sua composição química, com

base em 100 g de amostra seca, constitui-se de 40 g de proteínas, 30 g de glicídios, 20 g de lipídios, 226 mg de cálcio, 546 mg de fósforo e 8,8 mg de ferro (Wolf e Cowan, 1971; Sgarbieri et al., 1981). Além da proteína, a soja fornece ainda ácidos graxos essenciais como o ácido linoléico e ácido linolênico (Nawar, 1985) e algumas vitaminas (Franco, 1986). O grão intacto de soja pode conter além dos carboidratos, ácidos graxos (83% de ácidos graxos insaturados), proteínas, minerais, saponinas, lecitinas, β-sitosteróis, α-tocoferóis, inibidores de protease, muito embora as isoflavonas, juntamente às proteínas da soja, sejam os componentes com maior interesse atualmente devido às suas propriedades biológicas.

Figura 1: Planta adulta de soja (*Glycine max*) da família das Fabaceae.

A safra de soja no Brasil foi estimada pela CONAB (2002), no mês de fevereiro do corrente ano, em 41,5 milhões de toneladas, 11,6% superior a produção da safra 2000/01. A previsão é de queda de 2,4% na produtividade média comparada ao ano anterior que foi de 2720 kg/ha. Esta redução se deve ao longo período de estiagem na região oeste e noroeste do Rio Grande do Sul, onde a redução na produtividade pode atingir 15%. Pela Figura 2, pode-se verificar que estas regiões são umas das principais produtoras de grãos de soja no Brasil. Ao contrário, no Mato Grosso, maior estado produtor de soja do País, com uma safra estimada de 10410 mil toneladas, o excesso de chuva foi responsável pelo atraso da colheita e por uma esperada queda na produtividade. Segundo estimativas da Embrapa-Soja (2002), o Estado de São Paulo teve uma produção de soja oscilante nas últimas safras, sendo estas distribuídas em: safra 1996/97 com 1322,3 mil toneladas; safra 97/98 com 1113,0 mil ton; safra 98/99 com 1421,0 mil ton; safra 99/2000 com 1172,9 mil ton; safra 00/01 com 1335,9 mil ton; e safra 01/02 com 1456,9 mil ton de grãos de soja. A Figura 3 apresenta as regiões com maior produção de grãos de soja no Estado de São Paulo, segundo a Coordenadoria de Assistência Técnica Integral (CATI).

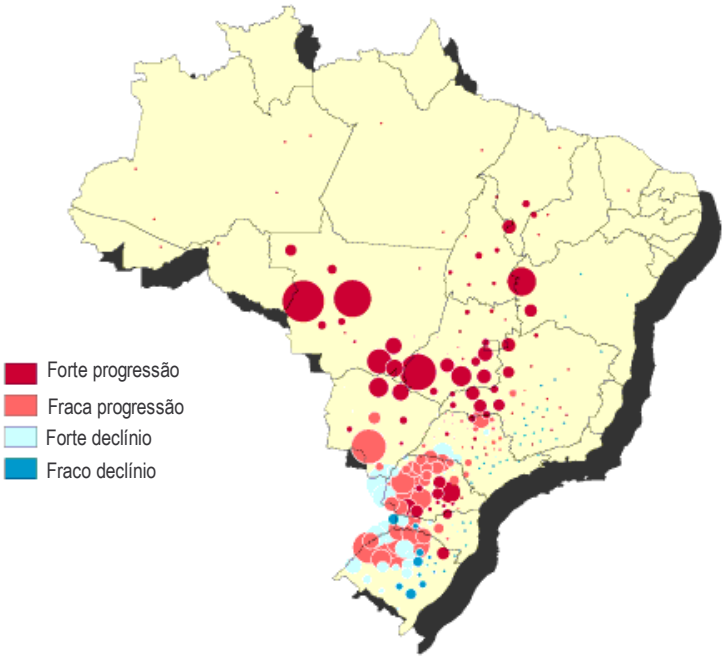


Figura 2: Evolução na produção de soja no Brasil entre 1977 e 1998.

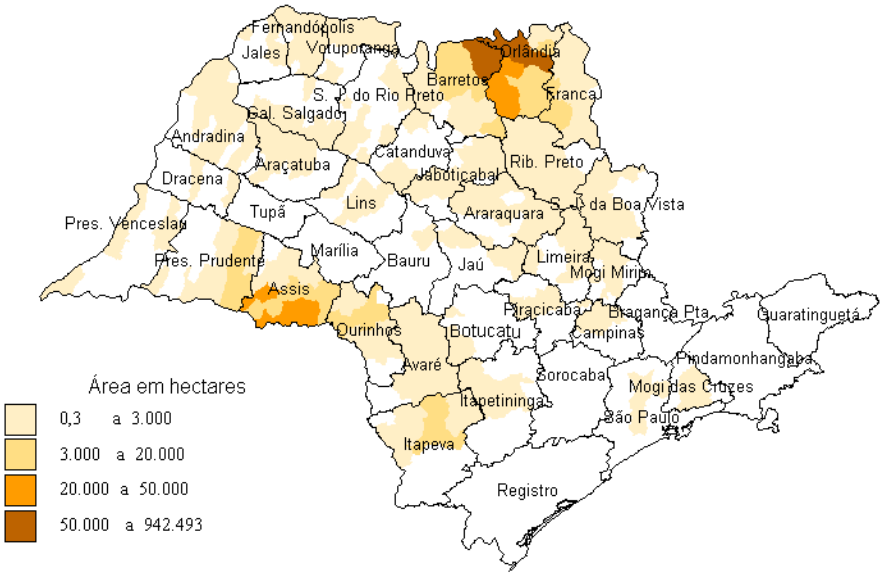


Figura 3: Distribuição, em hectares, das áreas de plantio de soja no Estado de São Paulo (CATI, 2002).

No Brasil, no entanto não há um consumo generalizado da soja. A falta de produtos à base de soja com qualidade, no mercado, e o sabor característico que apresentam, têm limitado a sua aceitabilidade. Mas esta situação está mudando face à disponibilidade de tecnologias que favorecem a melhora do sabor, as quais incluem tratamento térmico dos grãos no processamento, ou o melhoramento genético para eliminação de lipoxigenase, responsável pelo desenvolvimento do sabor característico (Carrão-Panizzi, 2001). Segundo Morais (2001) sua popularização tem sido gradual e lenta, entretanto, devido à comprovação de seu valor na prevenção e no tratamento da desnutrição comunitária, quando suplementada a dieta de populações carentes, tem aumentado, nas últimas décadas, a aceitação dos produtos à base de soja. São oferecidos produtos de melhor qualidade, bom sabor e características adequadas a cada povo. Os americanos desenvolveram muitos produtos de segunda geração como, tofu hot dog, tofu ice cream, veggie burger, tempeh burger, soymilk yogurt, soymilk cheese ou soy flour pancake.

Os benefícios da soja para a saúde humana são geralmente atribuídos às isoflavonas, genisteína e daidzeína, as quais exercem efeitos positivos no organismo humano. As pesquisas atuais sobre os benefícios da soja, ainda não são conclusivas se os efeitos são devido às isoflavonas ou sua combinação com outros de seus componentes, como as proteínas, peptídeos ou outros compostos polifenólicos; no entanto, o Brasil com a grande capacidade produtiva, tem um mercado a ser explorado, e para tal são necessários estudos adicionais tanto na

parte agrícola quanto na parte tecnológica de produção de novos produtos, bem como na divulgação destes ao consumidor.

3.3 Transformações Bioquímicas de Flavonóides

As plantas têm exercido um papel fundamental na vida humana há muitos anos, quando o homem utilizava a madeira de árvores como sustentação para seus abrigos. A importância das plantas vai ainda mais longe, quando se destaca a importância das plantas medicinais, cujo conhecimento sobre elas têm-se destacado e sido objeto de estudos científicos. Maciel et al. (2002) citam que a utilização de plantas medicinais no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto o homem e que em regiões mais pobres do país e até mesmo nas grandes cidades, as plantas medicinais são comercializadas em feiras e encontradas em quintais residenciais.

É bem conhecido que as plantas são fonte de compostos químicos valiosos para a medicina, sendo estes compostos objeto de pesquisa, com o intuito de identificar não somente a planta como o composto químico responsável por uma dada atividade biológica (Park et al., 2002b). Produtos secundários do metabolismo das plantas, tais como terpenóides, cardenolídios, coumarinas, antraquinonas, glicosilatos, alcalóides e flavonóides, são responsáveis por muitas destas propriedades biológicas das plantas e são utilizados como princípios ativos de fármacos, flavorizantes, ingredientes alimentícios ou agroquímicos (Hamada et al.,

1998). Estes compostos são produzidos pelas plantas em vias metabólicas, através de contínuas transformações bioquímicas. Outras transformações podem ocorrer pela ação de microrganismos presentes nas plantas, seja em simbiose ou como parasitas.

3.3.1 Flavonóides

Flavonóides são compostos fenólicos amplamente encontrados em tecidos vasculares de plantas, incluindo frutas, pólen, raízes e caules (Pietta, 2000; Di Carlo et al., 1999; Andlauer e Fürst, 1998). Com mais de 8000 compostos individuais conhecidos, os flavonóides são biossintetizados a partir de um derivado do ácido cinâmico (*trans*-4-coumarato), sintetizado a partir do metabolismo dos aminoácidos, fenilalanina ou tirosina, que age como precursor na síntese de um intermediário ao qual são adicionados três resíduos de malonato, com posterior ciclização da estrutura (Di Carlo et al., 1999) (Figura 4). Através de subseqüentes hidroxilações e reduções, diferentes formas de flavonóides são formados (Pietta, 2000). A estrutura básica dos flavonóides consiste de um núcleo flavano, constituído de quinze átomos de carbono arranjados em três anéis (C_6-C_3-C_6), sendo dois anéis fenólicos substituídos (**A** e **C**) e um pirano (cadeia heterocíclica **B**) acoplado ao anel A, como mostra a Figura 5. Os anéis A e C são hidroxilados e podem conter substituintes metoxílicos (Herrmann et al., 2001; Di Carlo et al., 1999).

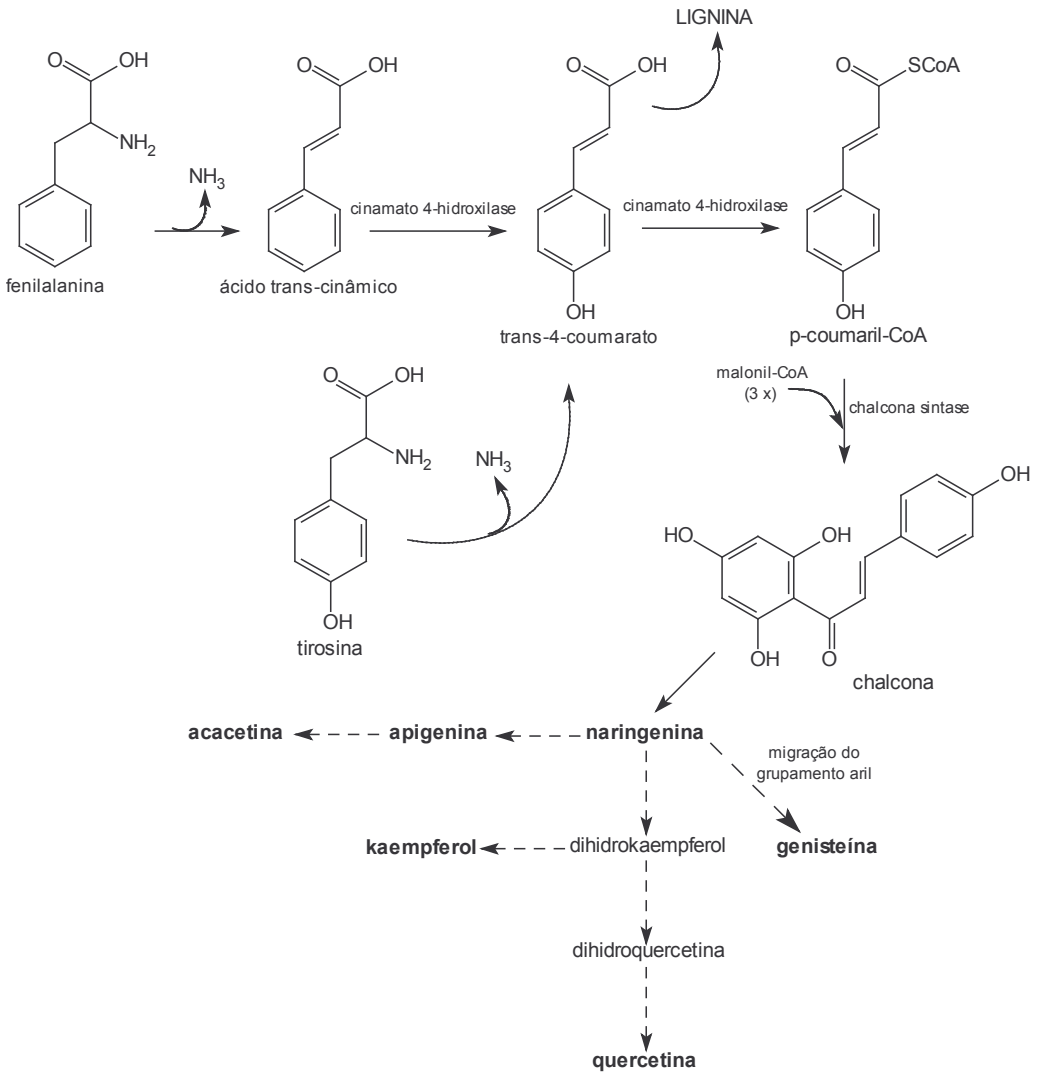


Figura 4: Biossíntese de flavonóides (Adaptado de Di Carlo et al., 1999).

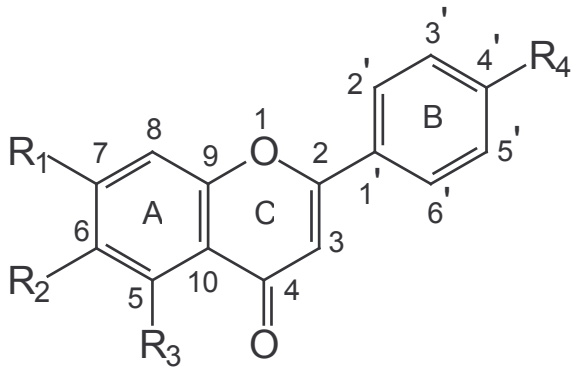


Figura 5: Estrutura básica dos flavonóides.

A formação das isoflavonas está associada à ação de uma enzima denominada isoflavona sintase, a qual transforma substratos como flavanonas (narigenina ou liquiritigenina) em isoflavonas como genisteína e daidzeína, respectivamente. A enzima apresenta características de uma monooxigenase dependente de citocromo P450 (cit-P450), além de requerer NADPH e oxigênio molecular como co-fatores (Dewick, 1993). A formação de isoflavonas ocorre via migração arílica intramolecular a partir de flavanonas (Figura 6).

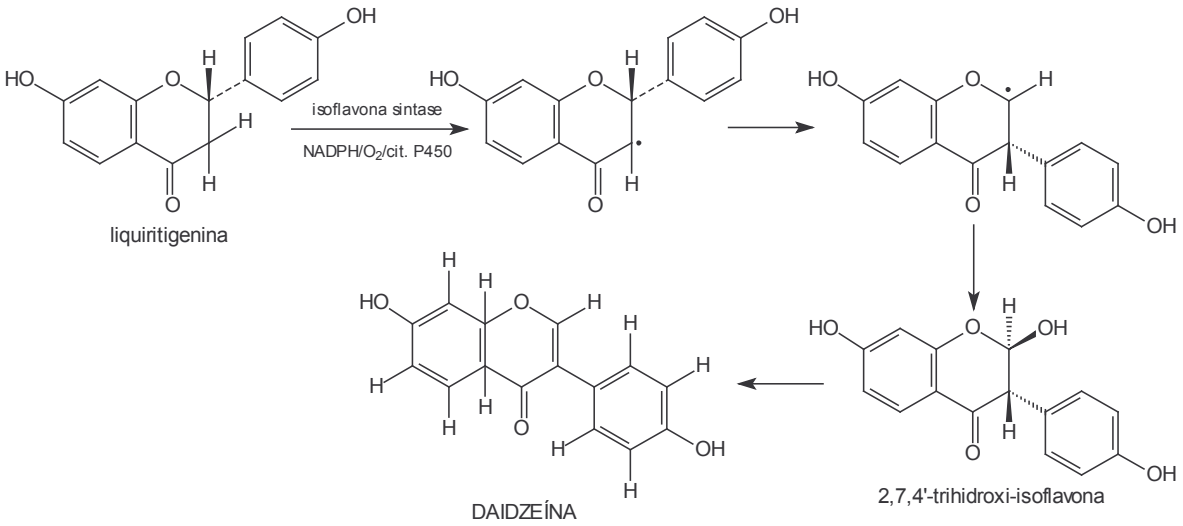


Figura 6: Mecanismo de ação da isoflavona sintase (Dewick, 1993).

As várias classes de flavonóides diferem no nível de oxidação e no modelo de substituição da cadeia heterocíclica C. Algumas classes de flavonóides de interesse são flavonas **(1)**, flavonóis **(2)**, flavanonas **(3)**, flavan-3-ol **(4)**, isoflavonas **(5)**, antocianidinas **(6)** e flavanolol **(7)** (Figura 7) (Pietta, 2000; Di Carlo et al., 1999; Peterson e Dwyer, 1998). Flavonóides geralmente ocorrem em plantas como derivados glicosilados, contribuindo no brilho do azul, do vermelho e do laranja nas folhas, flores e frutos, além de estarem associados a diferentes propriedades biológicas. *Flavanonas* ocorrem predominantemente em frutas cítricas; *flavonas* em ervas aromáticas e grãos de cereais; *isoflavonas* em legumes e sementes oleaginosas, como soja; *antocianidinas* e suas formas glicosiladas (*antocianinas*) são pigmentos naturais encontrados em uvas; as *flavan-3-ol*, como as catequinas, epicatequina e seus galato-ésteres, podem ser encontrados em frutas e folhas de chá-mate; e os *flavonóis* em todas as frutas e hortaliças (Park et al., 2001a; Carrão-Panizzi e Bordingnon, 2000; Pietta, 2000; Di Carlo et al., 1999; Peterson e Dwyer, 1998). Como também, *flavanolol* como a taxifolina, encontrada em frutas cítricas (Pietta, 2000).

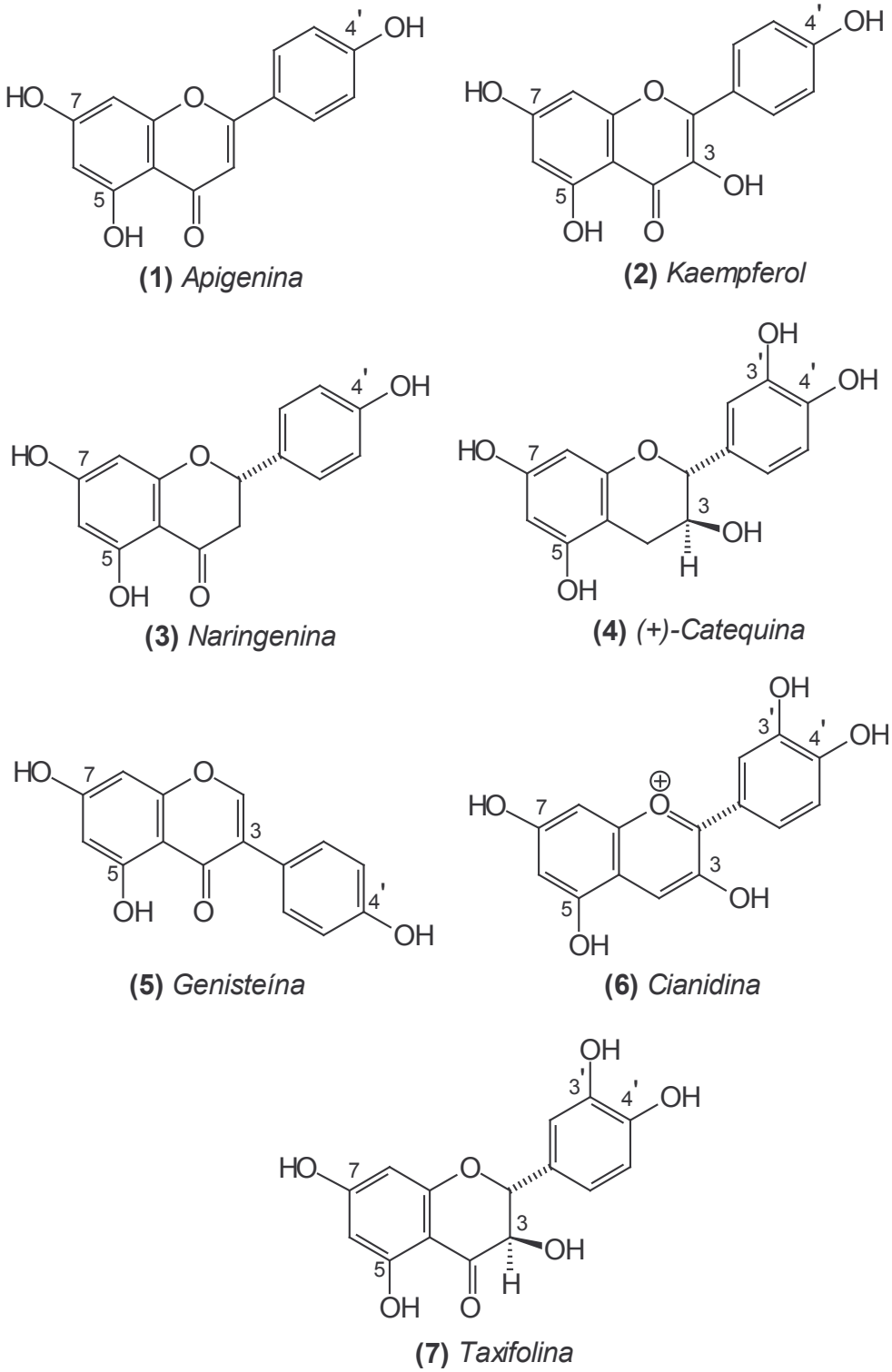


Figura 7: Estruturas de algumas classes de flavonóides.

Apesar da freqüente presença destes compostos em vegetais, o processamento pode reduzir seu conteúdo em até 50% pela lavagem ou remoção de partes da planta, bem como estes compostos estão sujeitos a modificações de suas estruturas, por via química ou enzimática.

3.3.2 Transformações microbianas e enzimáticas

Muitos microrganismos possuem a capacidade de metabolizar flavonóides e suas estruturas modificadas têm sido descritas. Flavonóides podem ser modificados por diferentes reações, sendo que a hidroxilação, metilação, glicosilação e acetilação ocorrem com quase todas as classes de flavonóides, embora algumas modificações, tais como sulfatação e prenilação sejam reações mais restritas a certos grupos de flavonóides (Heller e Forkmann, 1988). O Quadro 1 lista algumas transformações microbianas de acordo com o flavonóide utilizado como substrato.

Tem-se discutido que as transformações microbianas de flavonóides ocorrem com freqüência e que estas transformações podem gerar produtos com maior interesse que seus precursores. Estas transformações são associadas a diferentes enzimas, seja de origem microbiana ou vegetal, ou ainda, associadas ao metabolismo humano. Elas são capazes de transformar os flavonóides utilizando diversos intermediários de sua biossíntese, bem como alguns produtos finais, tais como flavonas, isoflavonas, flavonóis e antocianidinas. Estas enzimas exibem, em geral, alta especificidade pelo substrato, o que implica em um número restrito de

reações. Algumas das enzimas envolvidas em transformações de flavonóides são apresentadas na Figura 8 (Harborne, 1993).

Quadro 1: Transformações microbianas de flavonóides.

Substrato	Organismo	Produto Esperado
Isoflavona	*Gongronella butleri*	4´-hidroxiisoflavona
Isoflavona	*Aspergillus niger*	3´,4´-dihidroxiisoflavona
Biochanina A	*Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*	Genisteína
2,3-dehidrokievitona	*Aspergillus flavus*	Lunatona
2,3-dehidrokievitona	*Botrytis cinerea*	Lunatona
Angustona A	*Aspergillus flavus*	Lupiniisoflavona F
Angustona A	*Aspergillus flavus*	Lupiniisoflavona N
Isoflavanona	*Absidia blakesleeana*	4´-hidroxiisoflavanona
Isoflavanona	*Absidia blakesleeana*	6,4´-dihidroxiisoflavanona
Isoflavanona	*Aspergillus niger*	Isoflavona
Isoflavanona	*Aspergillus niger*	3´,4´-dihidroxiisoflavona
Isoflavanona	*Aspergillus niger*	2-hidroxiisoflavanona
Medicarpina	*Ascochyta rabiei*	Demetilmedicarpina
Medicarpina	*Ascochyta rabiei*	Vestitol
Medicarpina	*Ascochyta rabiei*	Demetilvestitol
Medicarpina	*Ascochyta rabiei*	7,2´-dihidroxi-4´-metoxi-isoflav-3-eno
Medicarpina	*Nectria haematococca*	6a-hidroximedicarpina
Maackiaina	*Ascochyta rabiei*	7,2´-dihidroxi-4´,5´-metileno-dioxiisoflavana
Edunol	*Aspergillus flavus*	Neorautanol
Pisatina	*Nectria haematococca*	6a-hidroximaackiaina
Daidzina	*Bifidobacterium* sp. Int-57	Daidzeína
Genistina	*Bifidobacterium* sp. Int-57	Genisteína
Daidzina	*Aspergillus oryzae*	Daidzeína
Genistina	*Aspergillus oryzae*	Genisteína
Isoflavona prenilada	*Botrytis cinerea*	Dihidropirano e dihidrofurano isoflavona
Daidzeína	*Aspergillus oryzae* IFO 4206	Shoyuflavona A
Genisteína	*Aspergillus oryzae* IFO 4206	Shoyuflavona B
Rutina	Bactérias metanogênicas	Quercetina
Hesperidina	Bactérias metanogênicas	Hesperitina
Quercetina	Bactérias metanogênicas	3,4-dihidroxifenilacetato Floroglicinol
Hesperitina	Bactérias metanogênicas	4-hidroxi-3-metoxifenilpropionato Floroglicinol
Naringenina	*Cunninghamella elegans*	Naringenina-7-sulfato
Genisteína	*Micrococcus* sp. *Arthrobacter* sp.	5,6,7,4´-tetrahidroxiisoflavona 5,8,4´-tetrahidroxiisoflavona
Biochanina A	*Micrococcus* sp. *Arthrobacter* sp.	4´-metoxi-5,7,8-trihidroxiisoflavona
Biochanina A	*Micrococcus* sp.	4´-metoxi-5,6,7-trihidroxiisoflavona
Gliciteína	*Brevibacterium epidermides* *Micrococcus luteus*	6,7,4´-trihidroxiisoflavona
Glicosil-isoflavonas	*Lactobacillus casei*	Isoflavonas agliconas
Rutina	*Penicillium rugulosum* IFO 7242	Quercetina

Fonte: Harborne (1993)

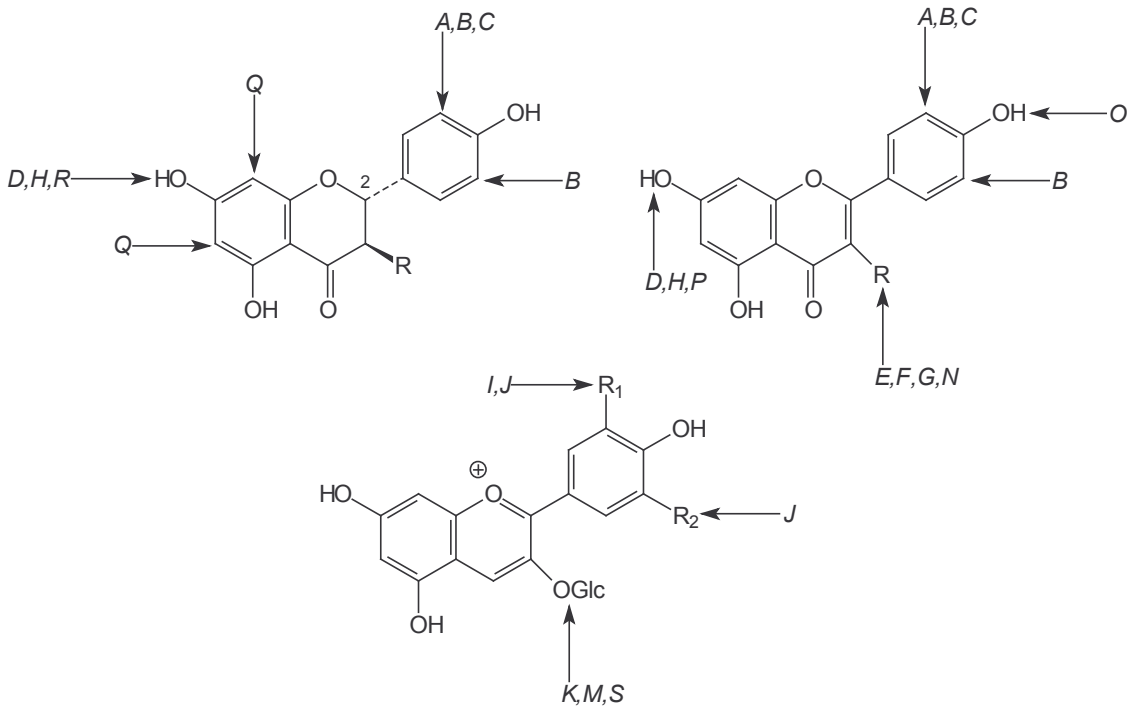


Figura 8: Esquema das posições de modificações freqüentes observadas em flavonóides (Harborne, 1993).

Enzimas: (A) flavonóide 3'-hidroxilase, (B) flavonóide 3',5'-hidroxilase, (C) flavonóide 3'-O-metiltransferase, (D) flavonóide 7-O-glicosiltransferase, (E) flavonol 3-O-glicosiltransferase, (F) flavonol 3-O-metiltransferase, (G) flavonol 3-O-glicosil-6''-maloniltransferase, (H) flavonóide 7-O-glicosil-6''-maloniltransferase, (I) antocianidina 3'-O- metiltransferase, (J) antocianidina 3',5'-O-metiltransferase, (K) antocianidina 3-O-glicosiltransferase, (L) antocianidina 3-O-glicosil-5-O-glicosiltransferase, (M) antocianidina 3-O-glicosil-aciltransferase, (N) flavonol 3-O-sulfotransferase, (O) flavonol 4'-O-sulfotransferase, (P) flavonol 7-O-sulfotransferase, (Q) 2-hidroxiflavanona-C-glicosiltransferase, (R) flavanona 7-O-glicosil-2''-O-ramnosiltransferase e (S) antocianidina 3-glicosil-aciltransferase.

Sabe-se que o consumo estimado de flavonóides na dieta humana varia entre 23 a 1000 mg/dia; e não existe uma estimativa precisa do consumo de todos flavonóides numa dieta tradicional (Di Carlo et al., 1999; Andlauer e Fürst, 1998). No entanto, Skibola e Smith (2000) reportaram que populações com menores riscos de doenças degenerativas foram as asiáticas e vegetarianas. A absorção média diária de flavonóides numa dieta asiática, sem causar nenhum efeito co-lateral, era de 68 mg de flavonóis e de 20 a 240 mg de isoflavonas. O consumo médio de flavonóides em países ocidentais foi menor que 5 mg/dia, enquanto no Japão foi de aproximadamente 2000 mg/dia. Flavonóides variam na maneira de absorção e suas vias metabólicas não são totalmente esclarecidas. Alguns autores descrevem que eles são conjugados no fígado ou rim e excretados pela bile ou urina. A absorção de flavonóides glicosilados no intestino delgado tem sido pouco pesquisada. De fato, até recentemente, tinha-se a concepção que a absorção não ocorresse nesta porção do intestino, e que a clivagem da cadeia glicosídica somente ocorresse via microflora do intestino grosso (Lambert et al., 1999). Realmente, algumas bactérias são capazes de romper as ligações heterocíclicas e degradar os flavonóides a ácidos fenólicos, os quais podem ser absorvidos, conjugados e excretados, ou ainda, metabolizados química ou enzimaticamente (Peterson e Dwyer, 1998). O metabolismo destes compostos pode influenciar sua biodisponibilidade e absorção através do intestino delgado. Tem sido relatado que enzimas citosólicas, como a β-glicosidase (EC 3.2.1.21), podem romper a ligação β-glicosídica de certos flavonóides glicosilados (Lambert et al., 1999). Ioku et al.

(1998) também relataram que glicosil-flavonóides são hidrolisados liberando flavonóides agliconas no jejuno. A Figura 9 sugere uma via metabólica para a daidzeína, um flavonóide muito consumido na dieta oriental, segundo os estudos feitos por Heinonen et al. (1999). Nesta ilustração pode-se notar que ocorre a formação de equol a partir da daidzeína, que por sua vez é formada pela hidrólise da daidzina ou da desmetoxilação da formononetina. A formação do *p*-etil fenol, a partir da genisteína, apresenta reações similares, onde a genisteína é obtida a partir da hidrólise da genistina ou pela desmetoxilação da biochanina A (Figura 10).

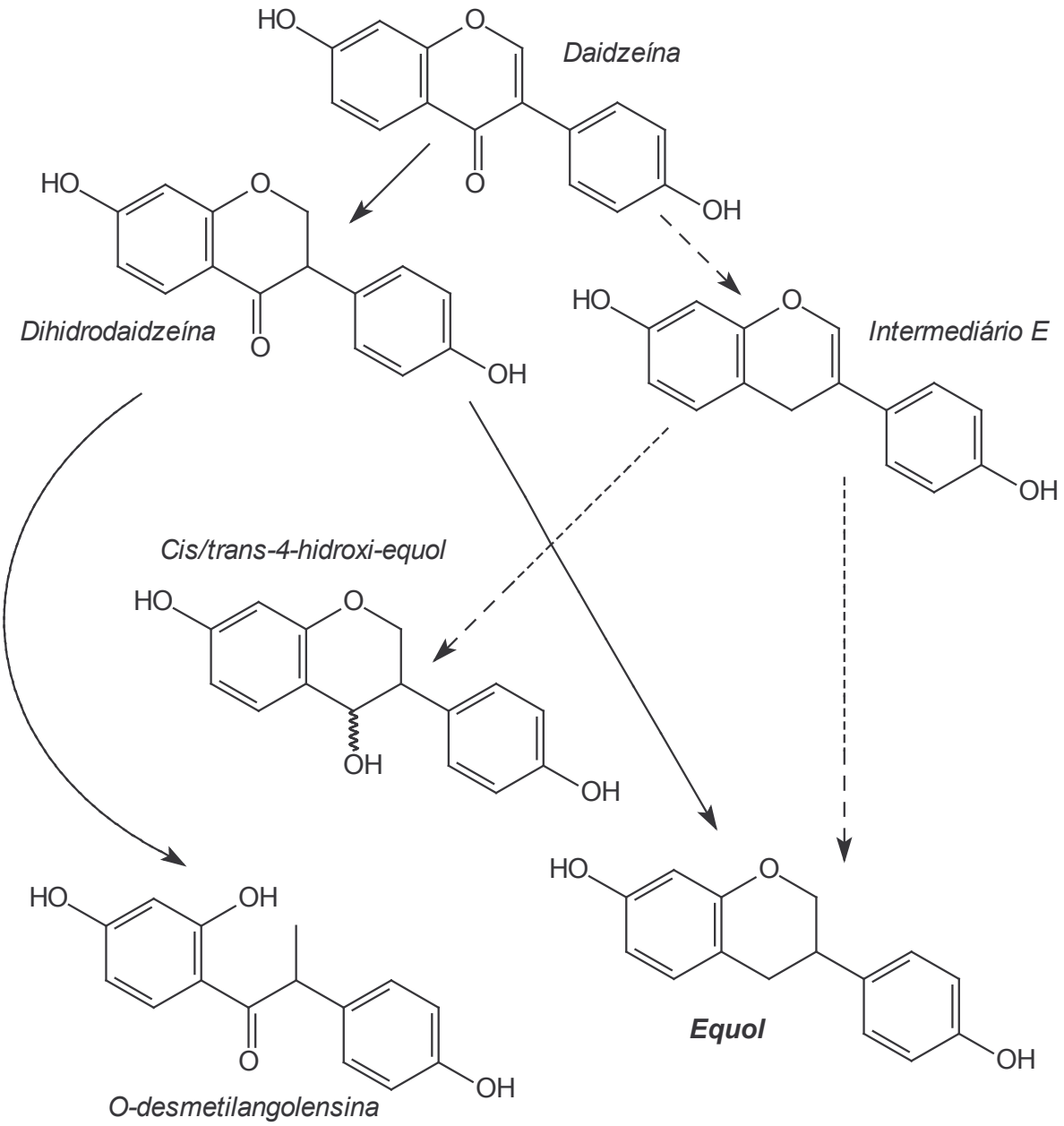


Figura 9: Via metabólica para a daidzeína (Heinonen et al., 1999).

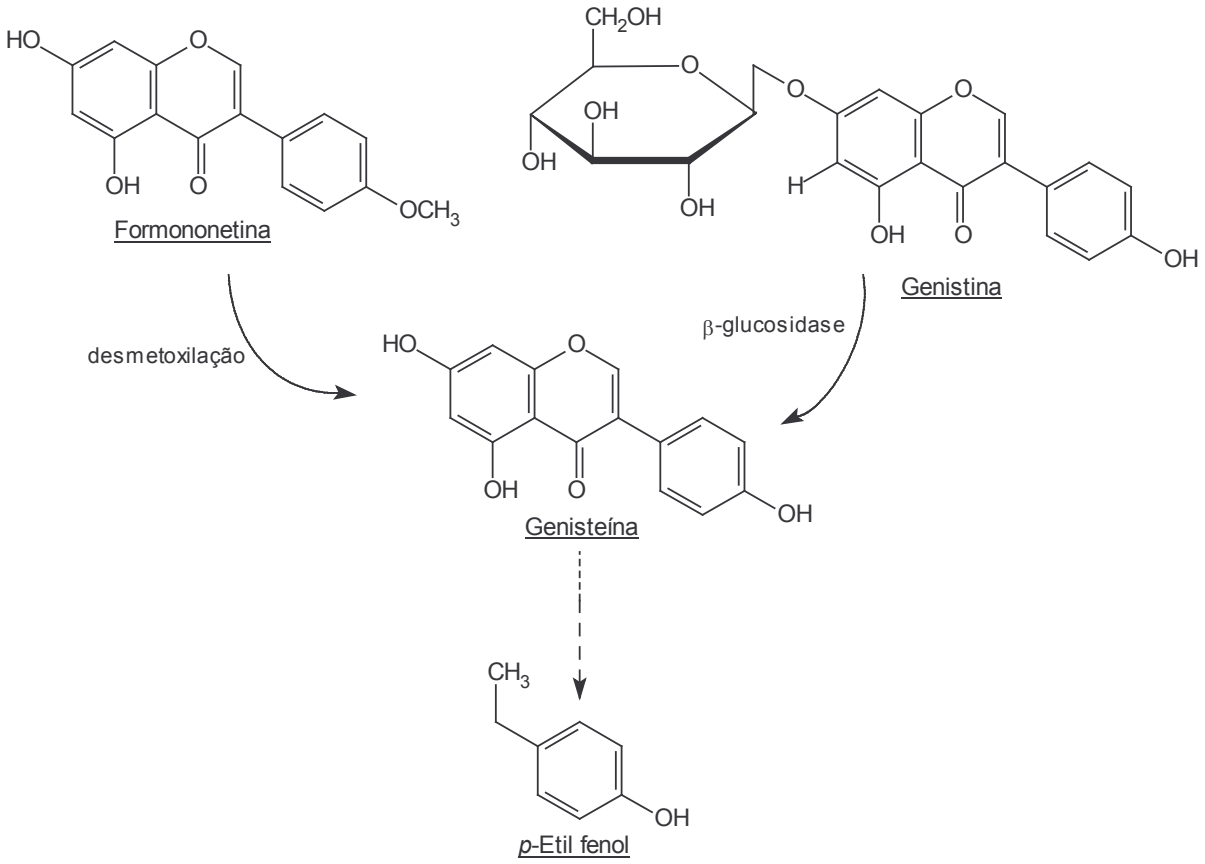


Figura 10: Biossíntese de *p*-etil fenol a partir da genisteína.

Do ponto de vista medicinal, os metabólitos de degradação das isoflavonas, daidzina e genistina, de maior interesse são a O-desmetilangolensina e o equol (Wang et al., 2002).

Sugere-se que a completa degradação de flavonóides ocorre pela clivagem do pirano (Figura 5) pela ação de enzimas produzidas por microrganismos intestinais, produzindo ácidos fenilacético e fenilpropiônico, e outros sub-produtos inertes (Gugler et al., 1975). Entretanto, o uso de técnicas rápidas para analisar flavonóides e produtos de degradação, em amostras de fezes e urinas humanas, tem evidenciado que ocorrem reações como metilação, hidroxilação, sulfatação ou glicuronidação, as quais ocorrem no fígado e pela transformação microbiana no intestino (Piskula e Terao, 1998; Manach et al., 1998). A Figura 11 mostra esquematicamente as transformações ocorridas no metabolismo de isoflavonas em humanos e outros animais (Setchell e Cassidy, 1999).

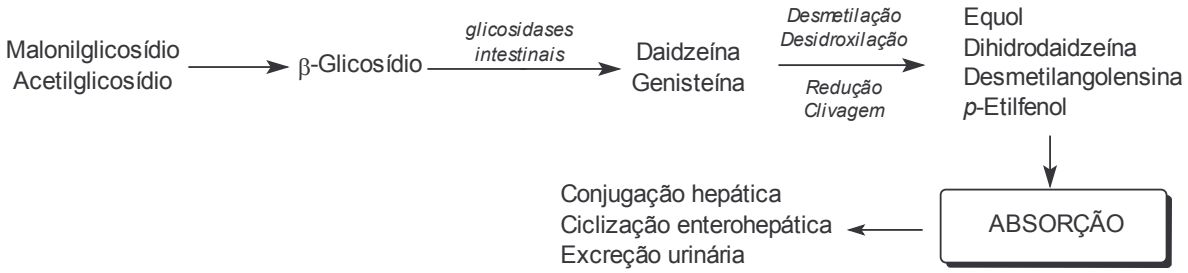


Figura 11: Transformações ocorridas com isoflavonas em humanos e animais domésticos (Setchell e Cassidy, 1999).

Outros estudos têm mostrado que há uma evidência indireta da absorção de flavonóides através do intestino, e está relacionada ao aumento da capacidade antioxidante no plasma após o consumo de alimentos ricos em flavonóides. Isto tem sido observado para um grande número de alimentos ricos em polifenóis (Fuhrman et al., 1995; Maxwell et al., 1994). Polifenóis são extensivamente metabolizados pelos tecidos e pela microflora intestinal (Figura 12), e alguns poucos estudos em humanos têm mostrado que a quantidade de polifenóis encontrados na urina, por exemplo, varia de acordo com o tipo de composto fenólico. Flavonóides como a quercetina e a rutina (glicosil-quercetina) são particularmente pouco recuperados na urina, enquanto catequinas (de chá verde), isoflavonas (de soja), flavanonas (de frutas cítricas) ou antocianinas (de vinhos tintos) são recuperados em maiores quantidades (Scalbert et al., 2002).

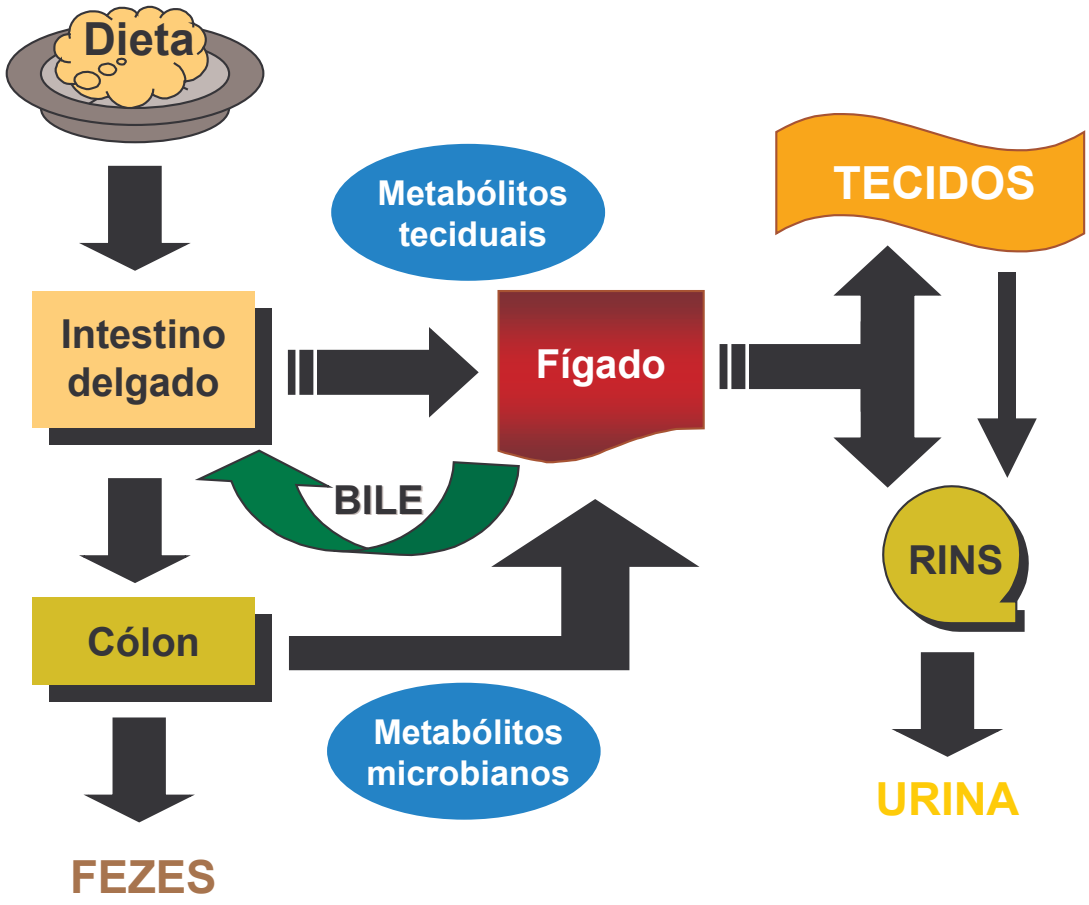


Figura 12: Rotas de absorção de polifenóis e seus metabólitos em humanos (Adaptado de Scalbert et al., 2002).

❖ **Hidrólise**

Muitas glicosidases vegetais e microbianas podem catalisar a hidrólise de glicosil-flavonóides e, esta transformação tem sido objeto de estudo de diversos pesquisadores (Park et al., 2001b; Park et al., 2001c; Carrão-Panizzi e Bordingnon, 2000; Esaki et al., 1999a), principalmente a hidrólise de glicosil-isoflavonas de soja. Acil e glicosil hidrolases estão envolvidas na biossíntese de flavonóides, tais como as β-1,4-glicosidases (β-glicosidase, aril-β-1,4-glicosidase) são muitas vezes consideradas enzimas celulolíticas, devido ao importante papel que elas exercem na hidrólise de produtos celulósicos (celobiose) a glicose. Há dois tipos de β-glicosidases, uma é aril-β-glicosidase e a outra é a β-glicosidase. Elas são consideradas duas enzimas diferentes devido às diferenças na especificidade de substrato, propriedades físicas e controle genético da biossíntese enzimática (Gong e Tsao, 1975). Nos vegetais, a atividade de β-glicosidase está envolvida em processos como a compartimentalização e atividade de fito-hormônios; mecanismos de defesa contra micróbios, insetos ou parasitas; desenvolvimento floral e pigmentação; e atividade na lignificação e decomposição da parede celular (Hsieh e Graham, 2001). Basicamente, dois tipos de mecanismos têm sido propostos para a hidrólise de compostos glicosilados, sendo o primeiro via um íon oxocarbônio estabilizado, ou por um intermediário enzima-glicosilato, covalentemente ligado (Wong, 1995). Na Figura 13 é possível observar o mecanismo geral de catálise por glicosidases (Blanchard e Withers, 2001) e na Figura 14 é mostrada a representação de algumas β-glicosidases.

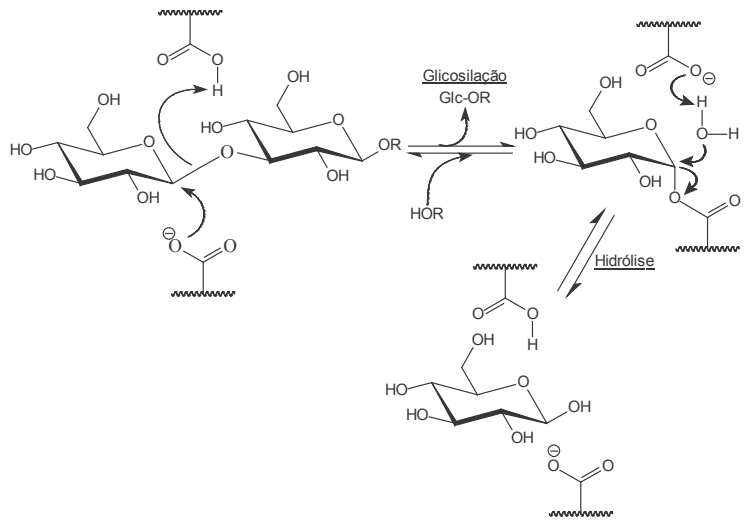


Figura 13: Mecanismo geral de catálise por glicosidases. O primeiro passo (glicosilação) resulta na formação de um intermediário covalente com conseqüente formação de hidrólise (Blanchard e Withers, 2001).

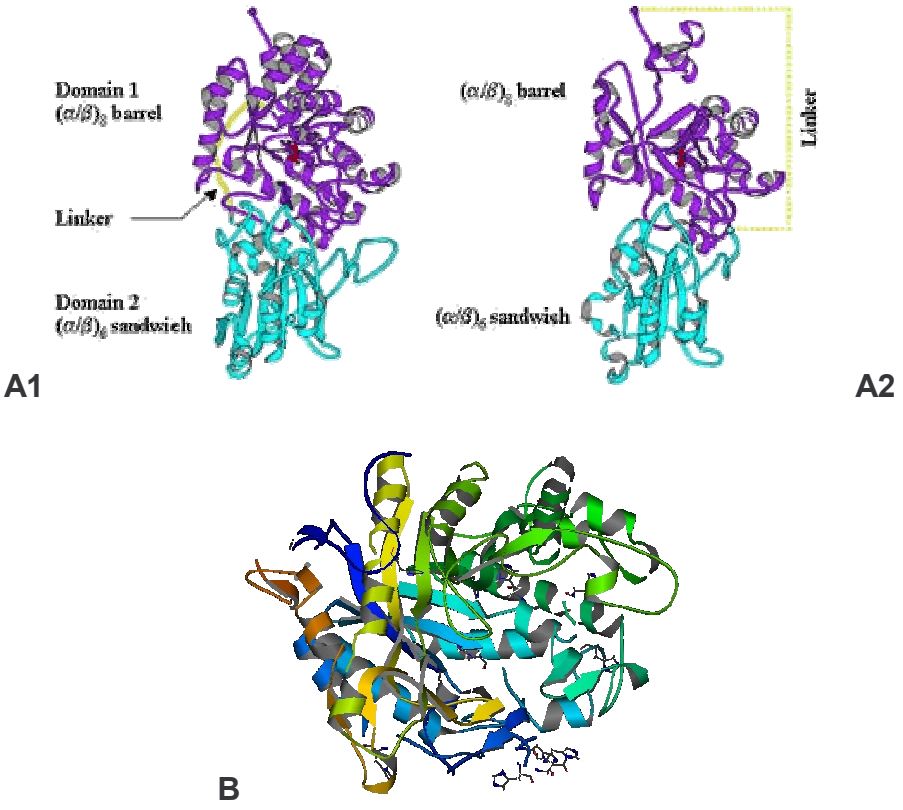


Figura 14: Representação de β-glicosidases. **A1:** aveia (*Avena sativa*), **A2:** bacteriana (*Butirivibrio fibrisolvens*), e **B**: vegetal (*Glycine max*).

No Brasil, a transformação de isoflavonas torna-se ainda mais interessante pelo fato do Brasil ser grande produtor de soja (*Glycine max*), a qual contém grandes quantidades destes flavonóides glicosilados passíveis de hidrólise enzimática produzindo formas agliconas, as quais mostraram ser mais ativas contra radicais livres, tumores da mama e próstata, entre outras atividades biológicas (Park et al., 2001c; Setchell e Cassidy, 1999).

Em grãos de soja podem ser encontradas isoflavonas, predominantemente nas formas glicosilada, malonilglicosilada e acetilglicosilada, mas durante processos térmicos e fermentativos, estes compostos fenólicos glicosilados são transformados às suas formas agliconas, que são acumulados no produto fermentado final (Klus e Barz, 1998). A Figura 15 mostra a transformação enzimática de uma glicosil-isoflavona (genistina) amplamente encontrada em grãos de soja à genisteína, sua forma aglicona (Park et al., 2001c).

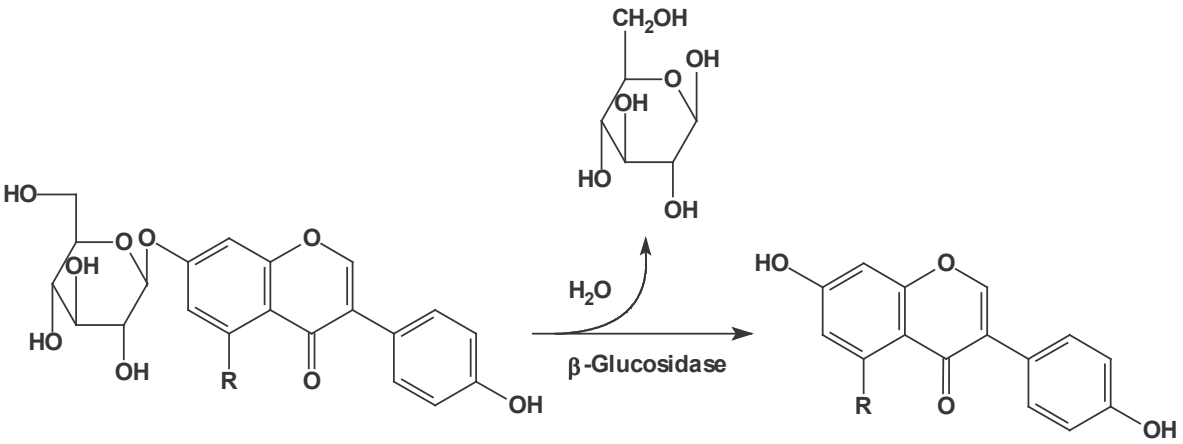


Figura 15: Transformação enzimática de glicosil-isoflavonas a agliconas (Park et al., 2001c).

Park et al. (2001c) reportaram que β-glicosidase produzida por *Aspergillus oryzae* foi capaz de hidrolisar as isoflavonas glicosiladas a agliconas, quando esta enzima foi aplicada sobre farinha desengordurada de soja durante fermentação semi-sólida. A associação da atividade de β-glicosidase com a hidrólise de glicosil-isoflavonas apresentada por Park et al. (2001b), foi confirmada por outros pesquisadores como Ibe et al. (2001) quando perceberam que uma bactéria isolada de palhas de arroz e identificada por IFO 9916, foi capaz de converter grande quantidade de glicosil-isoflavonas às suas correspondentes formas agliconas, pela produção de β-glicosidase. Da mesma forma, Matsuda et al. (1992) reportaram que a β-glicosidase de *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* IFO 3425, mostrou grande capacidade hidrolítica de glicosil-isoflavonas em xarope cozido de soja. Tem-se notado que produtos não-fermentados de soja contém menor teor de isoflavonas agliconas do que aqueles fermentados. Nestes produtos fermentados, como "misso" e "tempeh", a conversão de 7-D-glicosil-isoflavonas está associada à β-glicosidase bacteriana. No entanto, em outro produto fermentado denominado "natto", os teores de isoflavonas agliconas foram similares àqueles de glicosilados, podendo-se presumir que *Bacillus natto* (bactéria responsável pela fermentação) não produziu β-glicosidase. Outro fato observado, foi o alto teor de glicosil-isoflavonas em leite fermentado de soja em relação às agliconas. A causa seria a ineficiente fermentação do leite de soja pelas bactérias ácido-lácticas (*Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*), ou ainda, a não produção de β-glicosidase por estas bactérias (Kiyosawa et al., 1995). De acordo com Carrão-Panizzi e

Bordingnon (2000), β-glicosidase endógena de soja foi também capaz de hidrolisar glicosil-isoflavonas a agliconas.

A conversão de glicosil-isoflavonas à agliconas, tem sido feita principalmente pela utilização de β-glicosidase, como pôde-se observar, embora diferentes trabalhos tenham mostrado que podem ocorrer outras enzimas, que agem diferentemente. Matsuura e Obata (1993), por exemplo, purificaram três isoenzimas de β-glicosidase de soja com capacidade de hidrolisar glicosil-isoflavonas presentes em leite de soja. Em outro estudo, Matsuura et al. (1995) observaram que a β-glicosidase C foi capaz de hidrolisar daidzina e genistina, produzindo daidzeína e genisteína. Além das diferentes isoformas de β-glicosidase, outra enzima denominada lactase florizina hidrolase (EC 3.2.1.62), encontrada no intestino de mamíferos, foi capaz de hidrolisar alguns tipos de isoflavonas e flavonóis glicosilados à formas agliconas (Day et al., 2000). A hidrólise de flavonóides como rutina, forma glicosilada da quercetina (6-O-α-L-raminopiranosil-β-D-glicopiranosídio) foi avaliada por Narikawa et al. (2000). Anteriormente, Narikawa et al. (1998) reportaram que algumas glicosidases foram produzidas em cultura líquida contendo rutina como indutor. *Penicillium rugulosum* IFO 7242 produziu β-rutinosidase capaz de hidrolisar rutina em rutinose e quercetina. É importante ressaltar que esta glicosidase não possuía atividade sobre 4-nitrofenil β-glicosídeo ou celobiose, os quais são usados geralmente em ensaios enzimáticos de β-glicosidase.

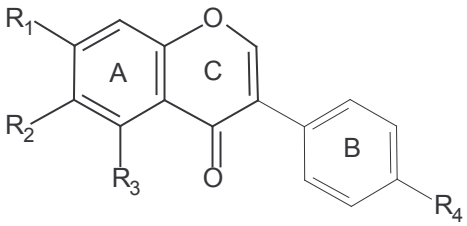
Estas propriedades catalíticas foram utilizadas neste estudo de Tese para a conversão de β-glicosil-isoflavonas de soja para suas formas agliconas, as quais apresentaram uma maior atividade antioxidante, por exemplo.

3.4 Isoflavonas

Sabe-se que flavonóides de frutas, hortaliças e soja, como as isoflavonas, em suas diferentes formas, têm papel importante no corpo humano, podendo agir como antioxidantes, anti-inflamatórios, antimicrobianos entre outras atividades biológicas, tornando os alimentos que os contém um alimento funcional ou nutracêutico.

As isoflavonas são compostos pertencentes ao grupo dos flavonóides, que se caracterizam por apresentar estrutura polifenólica, com dois anéis benzenos (A e C) ligados a um terceiro anel (B) na posição do carbono 3 (Figura 16).

Estrutura molecular plana



Isoflavona	R1	R2	R3	R4
Daidzina	O-glicosil	H	H	OH
Daidzeína	OH	H	H	OH
Glicitina	O-glicosil	OCH_2	H	OH
Gliciteína	OH	OCH_2	H	OH
Genistina	O-glicosil	H	OH	OH
Genisteína	OH	H	OH	OH

Figura 16: Estrutura química de uma isoflavona encontrada em soja.

O total de isoflavonas encontrado em soja distribuí-se basicamente em isoflavonas glicosiladas e isoflavonas agliconas (Ahluwalia et al., 1953). Eldridge (1982) e Fukutake et al. (1996), afirmam que genistina e daidzina são as principais isoflavonas e constituem de 50 a 90% dos flavonóides em farinha de soja. Outros compostos derivados destes compostos glicosilados foram identificados e compreendem as formas acetil e malonil. Park et al. (2001a), analisando diferentes cultivares de soja de uma mesma região brasileira, puderam observar grande variação da concentração destas isoflavonas (considerando o teor de isoflavonas totais). Segundo Carrão-Panizzi et al. (1998) a concentração de isoflavonas em soja é geneticamente determinada e afetada por fatores ambientais e pela temperatura local. Segundo Genovese e Lajolo (2001b), os fatores que afetam a composição de isoflavonas em soja estão também relacionados à (1) variedade e condições de cultivo; (2) às condições de processamento da soja, ou ainda (3) às metodologias de análise. A metodologia de análise é uma etapa importante na avaliação do teor de isoflavonas em soja, tanto na elaboração de um método eficiente de extração quanto na própria análise, que atualmente se baseia principalmente na análise por cromatografia líquida de alta eficiência.

Atualmente existem muitos produtos como bolos, chocolates, biscoitos produzidos com farinha de soja, que possuem na sua composição isoflavonas glicosiladas (Barnes et al., 1994; Nawar, 1985), ou ainda, na forma de acetil- ou malonil-isoflavonas. A forma malonil-isoflavona é transformada a glicosil isoflavona durante o processamento da soja para extração do óleo a temperaturas

acima de 100°C. Kudou et al. (1991b) relataram que a extração alcoólica à quente promove a transformação de malonil-isoflavona através da desesterificação às formas β-glicosiladas (Figura 17). Park et al. (2002a) da mesma forma observaram que à temperatura de 120ºC, parte das malonil-isoflavonas foram convertidas a seus conjugados glicosilados.

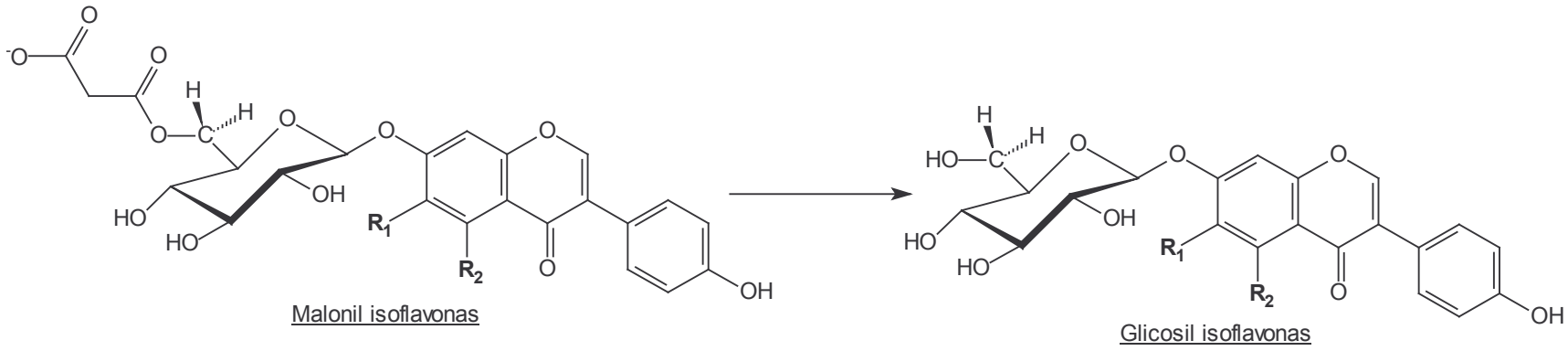


Figura 17: Desesterificação de malonil-isoflavona à β-glicosil-isoflavona (Kudou et al. (1991b).

Como as técnicas de processamento empregadas na manufatura de derivados de soja podem afetar a concentração das isoflavonas (Park et al., 2002a; Makris e Rossiter, 2001; Wang et al., 1998), as condições de processamento devem ser apropriadas para se manter a composição dos alimentos (Porte e Maia, 2001). Entretanto, existem poucos estudos sobre os impactos do processamento sobre a composição de flavonóides em alimentos (Makris e Rossiter, 2001). Muitos processos como ebulição, fritura, cozimento em microondas e radiação gama, podem ser aplicados no processamento de alimentos, mas estes podem alterar o conteúdo de isoflavonas em alimentos à base de soja. De acordo com Park et al. (2001c) a extração de isoflavonas de farinha desengordurada de soja à temperatura ambiente, apresentou um maior conteúdo de 6"-O-malonildaidzina e 6"-O-malonilgenistina, com menores quantidades de seus glicosil-conjugados (daidzina e genistina). Durante tratamento térmico, aproximadamente a metade das formas 6"-O-malonilglicosiladas foram transformadas a β-glicosil isoflavonas. Em geral, os teores de flavonóides em alimentos processados são 50% menores que naqueles alimentos frescos (Andlauer e Fürst, 1998). Usualmente, alguns processos utilizam refluxo em álcool, resultando em completa conversão de 6"-O-malonil- e 6"-O-acetilglicosiladas às formas β-glicosil isoflavonas ou agliconas. Park et al. (2001d) reportou que o aquecimento de alimentos de soja, durante sua fabricação, contêm em sua maioria β-glicosil isoflavonas. Radiação ionizante emitida por ^{60}Co ou ^{137}Cs, fornecem altas energias aos elétrons das moléculas presentes na matéria, provocando uma situação de instabilidade nestas moléculas. Estas entidades

instáveis, chamadas radicais livres, são responsáveis por diversas reações em sistemas biológicos (Sokhey e Hanna, 1993). A exposição à radiação gama inibe o rápido amadurecimento e a senescência, prolongando a vida-de-prateleira, e reduz a contaminação de muitas frutas e vegetais (Oufedjikh et al., 1998). O uso comercial da irradiação para aumentar a vida-de-prateleira de frutas e vegetais tem sido limitada por causa das possíveis alterações na qualidade nutricional dos alimentos e disponibilidade de outras tecnologias disponíveis, no entanto, como outras técnicas de processamento esta também possui vantagens e desvantagens. Muitos estudos tem sido conduzidos com a finalidade de identificar os efeitos da radiação sobre a textura, cor e outros parâmetros de frutas (Fan et al., 2001), tais como a concentração de constituintes químicos ativos, seja compostos de aroma, fontes protéicas ou flavonóides. Entretanto, as informações relativas aos impactos da radiação sobre o conteúdo de isoflavonas e proteínas de soja e seus produtos são limitados. Diferenças qualitativas e quantitativas em compostos fenólicos e outros constituintes tem sido mostradas em vegetais (Oufedjikh et al., 1998) e torna-se necessário um estudo científico que ressalte as mudanças na composição química de compostos fenólicos e proteínas, bem como a qualidade funcional e tecnologia dos produtos obtidos de farinhas de soja irradiada, visto que esta matéria-prima tem sido extensivamente aplicada em diferentes alimentos embutidos. A aplicação eminente da radiação gama na indústria alimentícia brasileira, desperta o interesse no estudo dos efeitos desta nova tecnologia de processamento, sobre componentes ativos (proteínas e isoflavonas) presentes em alimentos nutracêuticos, como a soja.

Por outro lado, as transformações entre os isômeros de isoflavonas, pode ser observado, pela aplicação de enzimas específicas como são os casos da β-glicosidase ou da lactase phorizina hidrolase, encontrada em intestino delgado de mamíferos. Ikeda et al. (1995), Park et al. (2001b) e Park et al. (2001c), reportaram que concentrações de isoflavonas agliconas em soja fermentada foram maiores quando comparadas com soja não-fermentada; isto provavelmente se deve ao fato que as glicosil-isoflavonas foram hidrolisadas a agliconas durante fermentação através da transformação enzimática com β-glicosidase.

3.4.1 Atividades biológicas

Isoflavonas são conhecidas por suas propriedades biológicas incluindo, atividade estrogênica (especialmente sobre os sintomas da menopausa e da osteoporose) (Murphy, 1982), antifúngica (Naim et al., 1974), bactericida, antimutagênica (Miyazawa et al., 1999) e antitumoral, especialmente canceres de mama e próstata (Coward et al., 1993; Peterson e Barnes, 1993; Denis et al., 1999; Hirota et al., 2000). São essenciais para a sobrevivência de plantas leguminosas, protegendo-as contra fitopatógenos, pela sua ação antifúngica. De acordo com outros estudos, as isoflavonas ainda teriam atividade anti-hemolítica e atividade antioxidante, a qual é observada em diversos trabalhos encontrados na literatura (Esaki et al., 1999a; Esaki et al., 1998; Shahidi et al., 1992).

❖ **Atividade antioxidante**

Os produtos de soja tradicionalmente usados no Japão, tais como "misso", "natto" e "tempeh" são ativos contra a peroxidação lipídica devido à presença de isoflavonas que estariam ligadas à atividade antioxidante. Além disso, foi reportado que a atividade antioxidante de genisteína ou outras isoflavonas agliconas foram superiores àquelas de glicosil-isoflavonas (Onozawa et al., 1998). As isoflavonas glicosiladas podem ser transformados por processos enzimáticos em agliconas como daidzeína e genisteína, cujas atividades antioxidantes têm sido superiores às das formas glicosiladas (daidzina e genistina), como demonstrado por Park et al. (2001c). Muitos trabalhos reportaram que os fatores que influenciam na atividade antioxidante de flavonóides seriam a ausência de ligações duplas nas posições 2 e 3, bem como na posição 4-oxo do núcleo da isoflavona, no entanto, a posição das hidroxilas na estrutura do flavonóide seria a maior responsável pela capacidade de seqüestrar radicais livres. Segundo Pietta (2000) e Cuppett et al. (1997), os flavonóides podem apresentar atividade antioxidante através de dois mecanismos básicos: 1) formação de quelatos metálicos (Figura 18a), e 2) seqüestro de radicais livres (como doadores de hidrogênios) (Figura 18b).

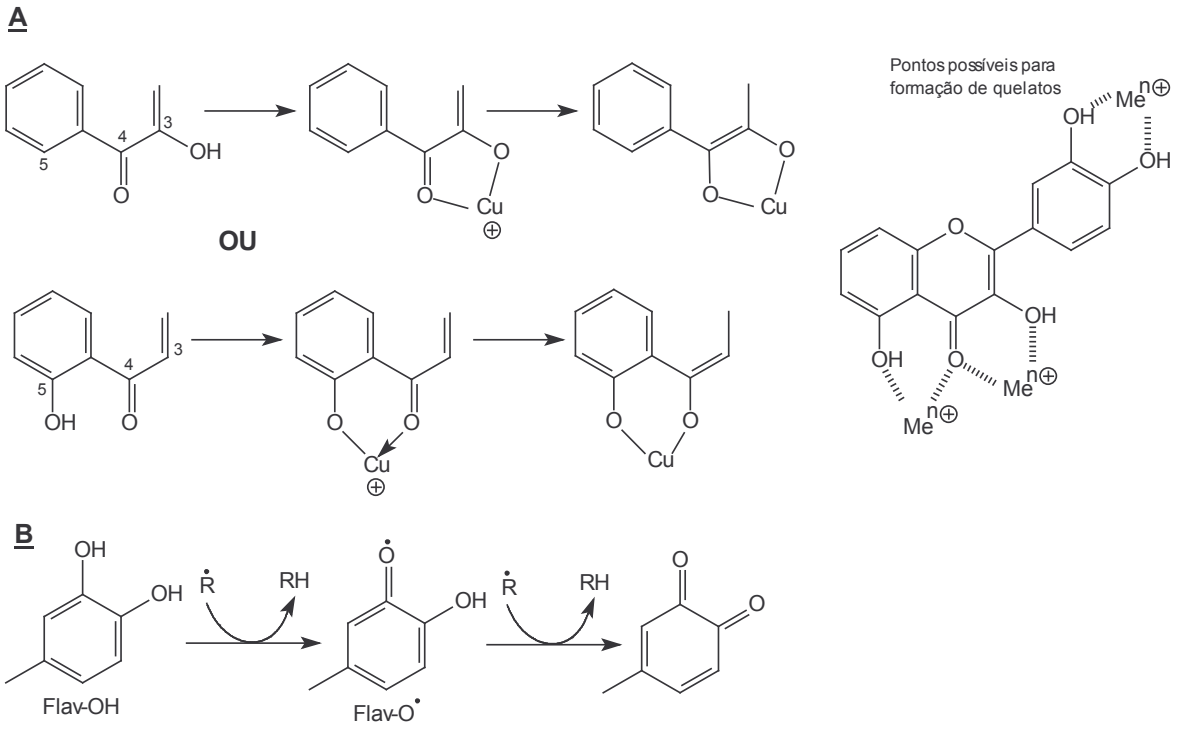


Figura 18: Atividade antioxidante de flavonóides a partir de mecanismos de formação de quelatos metálicos (**A**) e pelo seqüestro de radicais livres (**B**) (Pietta, 2000; Cuppett et al., 1997).

Cuppett et al. (1997) citam que a posição e grau de hidroxilação é importante na atividade antioxidante de flavonóides. Uma *o*-dihidroxilação do anel **C** contribui para a atividade antioxidante do flavonóide. Outro fato observado, é que uma estrutura *p*-quinol no anel **C** produz grande atividade ao contrário da estrutura *o*-quinol; entretanto, não é amplamente notada a ocorrência de *p*- e *m*-hidroxilações na natureza.

Esaki et al. (1999b) afirmaram que um potente complexo antioxidante, 6-hidroxidaidzeína, 8-hidroxidaidzeína e 8-hidroxigenisteína, foi isolado de grãos de soja fermentada com *Aspergillus saitoi* e *Aspergillus oryzae*. Estas isoflavonas, as quais possuem uma estrutura *o*-dihidroxil entre as posições 7 e 8 ou posições 7 e 6, foram obtidas de daidzeína e genisteína, respectivamente, por reação de hidroxilação durante o processo fermentativo. Foi também observada, que estas formas apresentaram atividade antioxidante superior àquela apresentada por daidzeína e genisteína. De forma similar, ainda nos anos 60, György et al. (1964) identificaram uma isoflavona trihidroxilada (6,7,4'-trihidroxiisoflavona) em tempeh, a qual apresentava significativa atividade antioxidante.

❖ **Atividade antitumoral**

Antioxidantes em frutas e hortaliças são um dos fatores que contribuem para a prevenção do câncer. De acordo com o AICR (American Institute of Cancer Research, Estados Unidos), dietas contendo quantidades variadas de hortaliças e frutas preveniriam mais de 20% dos casos de câncer. Entre 30 e 40% dos casos de

câncer poderiam ser prevenidos facilmente pela adoção de dietas apropriadas, atividades físicas e mantendo um peso corporal adequado (Ohr, 2002).

É evidente que o entendimento dos mecanismos de carcinogênese é essencial para a prevenção do câncer. Muitas pesquisas sobre prevenção do câncer é baseado no conceito da carcinogênese em multi-estágios: iniciação → promoção → progressão (Murakami et al., 1996). Na Figura 19 é mostrado esquematicamente um modelo do processo tumoral em multíplos estágios, de acordo com Murakami et al. (1996).

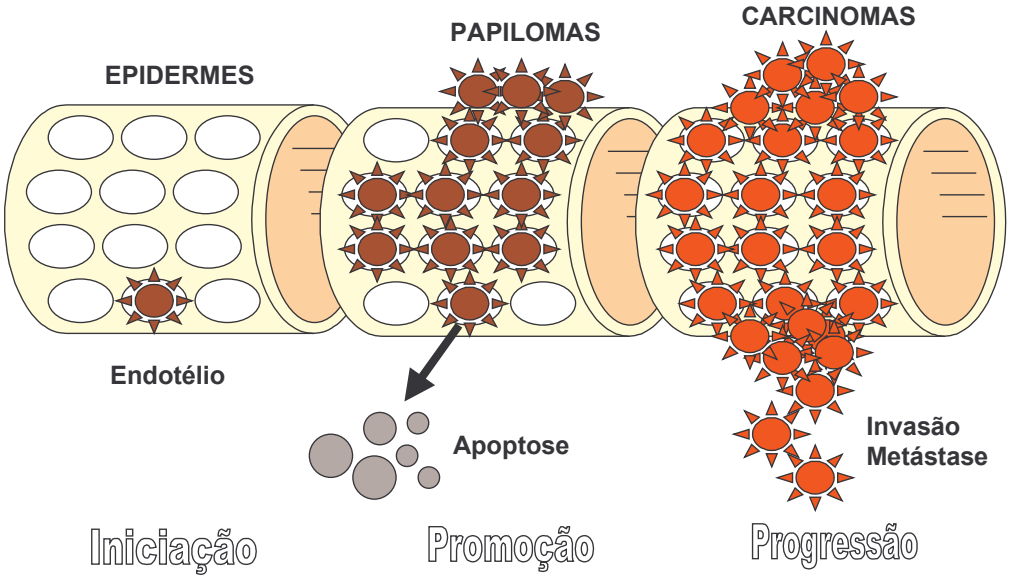


Figura 19: Representação esquemática de carcinogênese em múltiplos estágios (Murakami et al., 1996).

Carcinoma: câncer de tecidos epiteliais (pele ou mucosa).

No entanto, a atividade antitumoral não é apresentada por todos flavonóides. Alguns flavonóides como, quercetina e epigalocatequina, inibem o crescimento tumoral pela inibição de fases do ciclo celular e pelo bloqueio ou competição por receptores hormonais. Outros flavonóides podem inibir o crescimento tumoral pela: 1) estabilização do colágeno (catequinas e antocianinas podem inibir o catabolismo do colágeno, diminuindo assim a invasão e a metástase), 2) alteração da expressão gênica (inibição da expressão da proteína P53 (proteína supressora de tumores) da membrana plasmática, quando esta foi mutada), e 3) redução de radicais livres (os flavonóides possuem a capacidade para seqüestrar radicais livres capazes de induzir mutações celulares) (Bracke et al., 1999). Outros trabalhos científicos têm descritos com profundidade os mecanismos de prevenção à agentes mutagênicos através de compostos polifenólicos como as isoflavonas. Entre eles, Ferguson (2001) descreve que estes mecanismos de proteção podem estar associados: 1) à síntese do DNA, 2) ao reparo de DNA, 3) inibição do contato de agentes mutagênicos com o DNA, 4) inibição da topoisomerase I ou II, 5) à adsorção de agentes mutagênicos, 6) prevenindo a nitrosilação (compostos N-nitrosos são mutagênicos), 7) ao efeito antioxidante de flavonóides (principalmente, genisteína e quercetina), e finalmente, 8) à regulação de enzimas que metabolizam compostos xenobióticos.

Soja contém diversos compostos fitoquímicos, alguns dos quais apresentaram em estudos epidemiológicos e experimentais, atividade antitumoral. Estes efeitos anti-cancerígenos da soja são associados ao elevado teor de

isoflavonas na soja (Ohr, 2002). Isoflavonas são conhecidos por sua atividade antitumoral (mama e próstata), sendo que esta atividade biológica é mais acentuada nas formas agliconas que glicosiladas, da mesma forma que ocorre na atividade antioxidante. Muito embora os mecanismos pelos quais as isoflavonas inibam a carcinogênese não sejam conhecidos (Shertzer et al., 1999), seus efeitos citotóxicos podem estar relacionados à inibição de enzimas, como a topoisomerase II (Skibola e Smith, 2000). As isoflavonas ainda interferem na ação da topoisomerase II, S6-quinase ribossomal, fosfoinositídeo 3-quinase (PI 3-quinase) e proteína quinase C (PKC), enzimas ligadas ao ciclo, diferenciação e proliferação das células (Gamet-Payrastre et al., 1999). Genisteína, em particular, é um potente inibidor da tirosina quinase. A inibição destas enzimas resultaria na proteção contra diversos cânceres do intestino, da próstata e da mama. Genisteína tem grande poder de controle de células cancerosas, inibindo o crescimento de células tumorais da próstata humana quando comparada à sua forma glicosilada (Matsuda et al., 1994).

O câncer de mama é o câncer mais comum entre as mulheres americanas, sendo que a incidência em mulheres asiáticas é relativamente menor, devido ao consumo de alimentos à base de soja, principalmente pela ingestão de genisteína. Segundo Li et al. (1999), genisteína inibiu o crescimento de células cancerosas MDA-MB-231 de mama, regulou a expressão de genes relacionados à apoptose e induziu apoptose. Sendo assim os autores sugerem que genisteína pode ser um eficiente quimioterápico contra o câncer de mama. Pool-Zobel et al. (2000)

mencionam que genisteína também reprimiu a proliferação de células cancerosas humanas HT29.

Em seus estudos, Barnes (1995) observou que genisteína reduziu significativamente o risco de cânceres de pele e cólon e, que seu efeito no controle da proliferação celular depende do tipo de célula cancerosa.

❖ **Inibição enzimática**

Algumas enzimas, como colagenase e elastase, estão associadas à formação de aneurisma e outras doenças vasculares. Nestes casos, foi percebido em testes *in vitro*, que flavonóides podem diminuir a ação de proteases sobre proteínas fibrosas e o acúmulo de proteoglucanas e hialuronanas, os quais estão ligadas à formação de placas que levam às lesões arteroscleróticas. Extratos vegetais contendo flavonóides inibiram a atividade de elastase, tripsina e α-quimotripsina (Schramm e German, 1998).

Desde que esteróides estrogênicos são importantes fatores na evolução de câncer de mama, os quais são derivados principalmente da via da esterol sulfatase, Wong e Keung (1999) observaram o efeito inibitório de isoflavona (daidzeína) sobre esta enzima. Foi constatado que daidzeína não afetou a esterol sulfatase, no entanto, seus sulfoconjugados, daidzeína-4'-O-sulfato e daidzeína-7,4'-di-O-sulfato, foram potentes inibidores desta enzima.

Segundo Nagao et al. (2000), flavonóides como luteolina, quercetina, ramnetina e floretina, inibiram profundamente a atividade de β-caroteno-15,15'-

dioxigenase enquanto isoflavonas tiveram pouco efeito inibitório sobre esta enzima, a qual é responsável pelo fornecimento de vitamina A através da catálise oxidativa do β-caroteno em duas moléculas de retinal.

Outra enzima de grande importância, a F0F1-ATPase/ATP sintase, a qual sintetiza ATP durante a fosforilação oxidativa mitocondrial, pode ser inibida por diferentes isoflavonas, como genisteína, biochanina A, daidzeína, genistina. Genisteína também foi capaz de inibir a Na^+/K^+-ATPase. Este efeito inibitório para Zheng e Ramirez (2000), poderia ser associado a propriedades citotóxicas. Segundo Wong e Keung (1999), daidzeína, genisteína, biochanina A e formononetina inibiram potencialmente a atividade de álcool desidrogenase, que é responsável pela oxidação de 3-β-hidroxiesteróides e a conversão de 5-pregnen-3,20-diona em progesterona.

Estudos cinéticos mostraram que H^+/K^+-ATPase gástrica, enzima ligada à secreção gástrica, foi inibida por diferentes flavonóides, incluindo algumas isoflavonas e, que o potencial inibitório depende do número de hidroxilas da molécula (Murakami et al., 1999).

❖ **Efeito sobre o colesterol e atividade estrogênica**

Fitoestrógenos são substâncias originárias de plantas que exercem efeitos estrogênicos, ou são estrutural ou funcionalmente similares ao 17β–estradiol (Nevala, 2001). Estes compostos reduzem o colesterol total em

humanos, são benéficos no tratamento da osteoporose e têm efeitos anticarcinogênicos (Nevala, 1998).

Os efeitos estrogênicos de fito-hormônios foi inicialmente percebido na Austrália pela redução da fertilidade de ovelhas alimentadas com alfafa fresca (Moule et al., 1963). Segundo Korpela (1995) citada por Nevala (2001), os fitoestrógenos são classificados em lignanas, isoflavonas e coumestanas (Tabela 3).

Tabela 3: Classificação de fitoestrógenos.

Classes	Compostos	Fontes vegetais
Lignanas	Enterolactona	Oleaginosas
	Enterodiol	Linho
		Fibras de cereais
		Cereais *in natura*
		Legumes
		Frutas
Isoflavonas	Genisteína	Soja
	Daidzeína	Alfafa
	Equol	
Coumestanas	Coumestrol	Alfafa

Fonte: Korpela (1995) citada por Nevala (2001).

Em cobaias a administração de fitoestrógenos previne a aterogênese, sendo que em macacas ovariotomizadas a reposição hormonal com estrógeno reduz em cerca de duas vezes a aterosclerose, comparada com macacas ovariotomizadas sem reposição hormonal. Em humanos, dados epidemiológicos têm mostrado que o risco relativo de desenvolver doenças cardiovasculares em usuários de estrógeno é de 0,56 comparada com não-usuários. Os estrógenos podem inibir a progressão da aterosclerose pela diminuição de lipoproteínas, prevenindo a oxidação lipídica, aumentando a razão HDL/LDL no sangue, inibindo a síntese de colágeno, prevenindo a agregação de plaquetas, promovendo a dilatação de veias, entre outras hipóteses (Schramm e German, 1998). Flavonóides e estrógeno têm a habilidade de inibir a oxidação lipídica, agregação de plaquetas e promover a vasodilatação (Miksicek, 1993). Estes fatores podem retardar o desenvolvimento de doenças ateroscleróticas. A expressão de receptores de estrógeno (tipo ER-

β, detalhes a seguir) em tecidos vasculares e outros não-reprodutivos, é um mecanismo pelo qual fitoestrógenos podem exercer atividades sobre o sistema arterial (Tikkanen e Adlercreutz, 2000).

Testes clínicos realizados por Gardner et al. (2001) sugerem o efeito hipocolesterolêmico da proteína de soja, muito embora o efeito possa ser parcialmente atribuído às isoflavonas em soja, já que poucos estudos têm verificado seus efeitos isoladamente. Dietas à base de soja são particularmente atrativas para Vigna et al. (2000), dado ao seu potencial efeito na redução do colesterol e seus efeitos anti-cancerígenos, além da possível modificação dos sintomas da menopausa. Por exemplo, no estudo realizado por Lucas et al. (2001), cinqüenta e quatro mulheres com elevado teor de colesterol foram submetidas a dietas à base de proteína de soja suplementadas ou não com isoflavonas. Os resultados obtidos sugerem que a redução do teor de colesterol foi independente da suplementação com isoflavona. Lucas et al. (2001) ainda sugerem que o consumo de proteína de soja possa estar ligado à redução da hipercolesterolemia, um risco às doenças coronárias. Entretanto, outros componentes como isoflavonas e saponinas, também podem estar ligados à redução do colesterol, sendo neste caso necessário estudos detalhados a este respeito. Segundo Messina (2000), proteína de soja rica em isoflavonas supostamente inibe a oxidação de lipoproteína de baixa densidade (LDL) e teria um maior efeito na redução de colesterol que aquelas proteínas de soja com baixo teor de isoflavonas. Wangen et al. (2001) afirmam que o consumo de isoflavonas como um constituinte da proteína de soja resulta em um

pequeno, mas significativo, aumento da atividade contra a hipercolesterolemia pós-menopausa em mulheres. Embora os efeitos sejam pequenos, é possível que as isoflavonas possam contribuir na diminuição de doenças coronárias se o consumo for contínuo por alguns anos em conjunção a outras estratégias para a redução do colesterol, ou melhor, relação HDL/LDL (lipoproteínas de alta densidade por lipoproteínas de baixa densidade). Para Lovati et al. (2000) é comum associar as isoflavonas pelo maior efeito fisiológico na redução do colesterol total sangüíneo em animais e humanos. Segundo Clarkson et al. (1998) a incidência de coronariopatias na população asiática, comparada com a população dos Estados Unidos, é dez vezes menor.

Diferentes trabalhos investigativos, utilizando modelos animais, têm mostrado que o abaixamento dos níveis de colesterol e mecanismo antiaterosclerótico da soja pode incluir: 1) a redução na absorção de colesterol da dieta; 2) o aumento na quantidade e atividade de receptores de LDL; 3) a redução na permeabilidade arterial do LDL; e 4) a redução na concentração arterial e transporte de LDL. Messina (2000) confirma que as isoflavonas estão associadas à redução na absorção arterial de LDL e triglicerídios. Na Figura 20, o mecanismo pelo qual as isoflavonas agem na redução da hipercolesterolemia pode ser observado. As isoflavonas agiriam bloqueando os receptores de LDL, diminuindo assim sua absorção arterial.

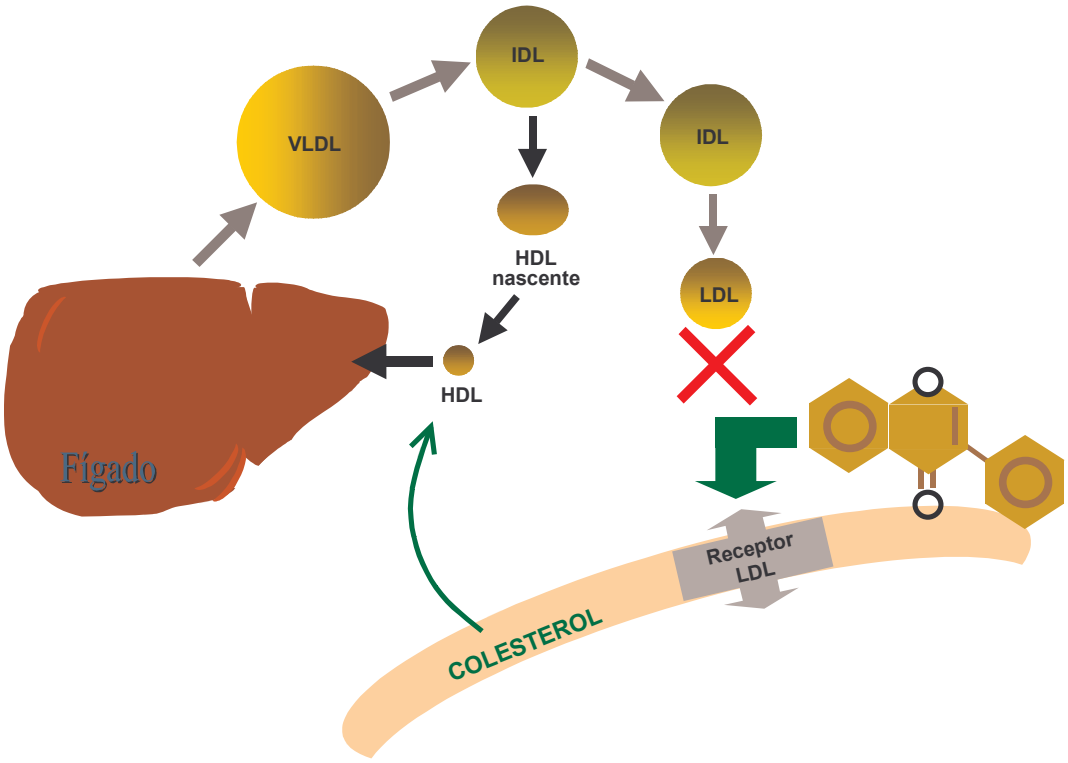


Figura 20: Mecanismo proposto para a diminuição da absorção de lipoproteínas de baixa densidade pelas isoflavonas (Messina, 2000).

A propriedade estrogênica dos fitoestrógenos, como as isoflavonas, segundo Han et al. (2001) decorre da interação com os receptores de estrogênios, e que estudos demonstraram que a genisteína tem afinidade por receptores de estrogênio de 100 a 1000 vezes superior ao 17β-estradiol e ao dietiletilbestrol. Genisteína tem de 5 a 20 vezes maior afinidade pelos receptores β (ER-β) do que receptores α (ER-α). Esta maior afinidade pelos ER-β sugere que as isoflavonas podem ter efeito seletivo por alguns tipos de tecidos (Messina, 2000), e por outro lado, a estrutura do fitoestrógenos está intimamente ligada a esta afinidade pelos receptores. Como foi visto, a genisteína tem uma elevada afinidade pelo ER-β, no entanto, sua forma metoxilada, biochanina A, não apresenta qualquer afinidade pelos ER-β. O mesmo ocorre com a daidzeína, a qual também apresenta considerável afinidade pelos ER-β, ao passo que seu derivado metoxi, formononetina, não se liga aos ER-β. Tem sido sugerido que a hidroxilação é um passo necessário para o flavonóide ter atividade estrogênica (Miksicek, 1995). Kuiper et al. (1997) descreveram as afinidades relativas de vários compostos com os receptores ER-α e ER-β humanos (Tabela 4).

Tabela 4: Afinidade relativa de vários compostos aos receptores ER-α e ER-β.

Compostos	ER-α	ER-β
Estradiol-17β	100	100
Estrona	60	37
Estriol	14	21
Progesterona	< 0,001	< 0,001
Testosterona	< 0,01	< 0,01
Coumestrol	94	185
Genisteína	**5**	**36**
β-Sitosterol	< 0,001	< 0,001
Tamoxifeno	7	6

Fonte: Kuiper et al. (1997)

Os receptores ER-α são denominados receptores clássicos, ao passo que os receptores ER-β somente há poucos anos foram descritos e caracterizados (Mosselman et al., 1996). É fascinante observar que os ER-β são encontrados no cérebro, ossos, bexiga e epitélio vascular; tecidos que estão intimamente ligados à terapia de reposição hormonal (TRH). Em outros tecidos como, mamários, uterinos, ovarianos, próstaticos e pulmonares também foram encontrados receptores ER-β (Setchell e Cassidy, 1999).

Embora Messina (2000) sugere que a incidência das ondas de calor em mulheres asiáticas é menor que em mulheres ocidentais, Greenwood et al. (2000) expõem que existem dados inadequados na avaliação dos efeitos benéficos das isoflavonas sobre o câncer de mama, a perda de cálcio e a secura vaginal. Isoflavonas de soja têm atenuado a perda de cálcio ósseo em mulheres na menopausa. Isto pode ser devido à maior taxa na formação óssea que na reabsorção de cálcio pelo organismo. Embora genisteína e daidzeína sejam efetivas

na prevenção da perda óssea, daidzeína tem se mostrado mais potente que genisteína (Picherit et al., 2000).

Apesar dos efeitos na saúde humana não possam ser claramente atribuídos às isoflavonas, é nítido que alimentos ou suplementos contendo isoflavonas têm algum efeito fisiológico. Van der Schouw et al. (2000) e Setchell e Cassidy (1999), de forma complementar, avaliaram os benefícios e riscos cardiovasculares associados a fitoestrógenos (isoflavonas, coumestanas e lignanas), e notaram que estes compostos desempenham atividade similar a do estrogênio (17β-estradiol), visto que com base na estrutura química destes fitoestrógenos, não é supreendente que estes possam exercer funções estrogênicas, ligando-se aos receptores ER-β (Figura 21).

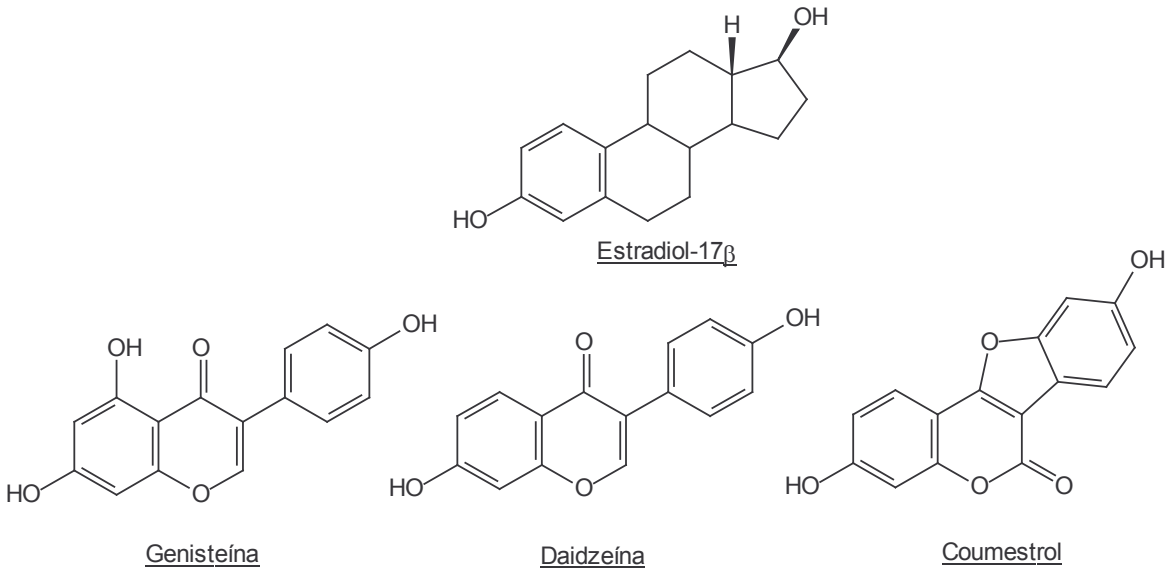


Figura 21: Fórmulas estruturais de fitoestrógenos e do 17β–estradiol (Tikkanen e Adlercreutz, 2000).

As isoflavonas são agentes que podem seqüestrar radicais livres, participar da regeneração de agentes antioxidantes como a vitamina E, proteger constituintes celulares contra danos oxidativos, e estão associadas ao abaixamento dos riscos de doenças hormônio-dependentes. Logo, os benefícios que podem ser atingidos pelo consumo de uma dieta à base de soja são inúmeros, e neste trabalho buscou-se definir o perfil das isoflavonas encontradas nos principais cultivares de soja cultivados no Brasil, além de estabelecer características de termoestabilidade e frente a radiação gama, e algumas propriedades biológicas *in vitro* das isoflavonas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes

A água utilizada nas análises cromatográficas foi deionizada em colunas de troca-iônica (Simplicity®, Millipore do Brasil) e filtrada através de membranas de 0,22 μm (Millipore do Brasil). O ácido acético e metanol empregados na fase móvel cromatográfica foram de grau cromatográfico. Os solventes orgânicos usados nos estudos de extração das isoflavonas foram de grau analítico. Daidzeína, genisteína, daidzina e genistina foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA). Os reagentes para determinação da atividade enzimática de β-glicosidase foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA).

4.2 Cultivares de Soja

Os cultivares de soja foram doados por duas Instituições Governamentais, a Embrapa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (CNPSo, Londrina - PR) e o Instituto Agronômico de Campinas (IAC, Campinas - SP). Outro cultivar de soja analisado foi obtido de uma fazenda de cultivo orgânico, o qual é distribuído na região de Curitiba/PR. Outros grãos de soja foram utilizados, porém sem uma identificação precisa do cultivar, bem como foram feitas análise de produtos à base de soja, como extrato de soja, proteínas concentrada e isolada de soja e suplementos (cápsulas) de isoflavonas de soja, sendo duas de origem americana, uma canadense e outra brasileira. Na Tabela 5 são descritas as denominações dos cultivares utilizados neste estudo.

Tabela 5: Denominações dos cultivares de soja.

Instituição	Local de Plantio	Cultivares de Soja
Embrapa	Londrina, PR	BRS-184, BRS-183, BRS-181, BRS-157, BRS-156, BRS-155, BRS-154, BRS-153, BRS-136, BRS-135, BRS-134, BRS-133, BRS-132, Embrapa-62, Embrapa-61, Embrapa-59, Embrapa-58, Embrapa-48, Embrapa-47, Embrapa-46
IAC	Campinas, SP	IAC-8, IAC-8-1, IAC-8-2, IAC-15, IAC-15-1, IAC-15-2, IAC-17, IAC-18, IAC-19, IAC-20, IAC-22, IAC-31MN, IAC-PRMN, IAC-Foscarin-31
Cefet-PR	Pato Branco, PR	ICA-SC1, ICA-3, ICA-4, ICA-987, ICA-95302
Gebana Co. [a]	Capanema, PR	BR-36 (Cultivo orgânico)

[a] A empresa Arbeitsgemeinschaft Gerechter Bananenhandel (Gebana) mantém campos de cultivo de soja orgânica no Estado do Paraná, e gentilmente forneceu o cultivar para análise.

Além da soja foram analisadas outras sementes de oleaginosas e cereais da mesma família da soja (Fabaceae), sendo elas: Grão-de-bico (*Cicer arientinum*; Chickpeas); Ghandu (*Cajanus cajan*; Pigeonpeas); Feijão-Carioca (*Phaseolus vulgaris*; Snapbean); Feijão-Fava (*Phaseolus lunatus*; Baby Butter Lima Bean); Fava (*Vicia faba*; Favabean); Pallar (*Phaseolus limensis*; Giant Peruvian Lima); Ervilha (*Pisum sativum*; English peas); Kiwicha (*Amaranthus caudatus*); e Kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*), sendo as duas últimas amostras não-pertencentes à família das Fabaceae, as quais foram colhidas no Peru, juntamente com Pallar e Fava, em campos de plantio nos

Andes, há mais de 3500 metros de altitude e temperatura média de 15ºC, e com baixa umidade relativa.

4.3 Extratos de Isoflavonas

4.3.1 Extratos alcoólicos de isoflavonas

As isoflavonas de soja e de outros grãos foram extraídas de acordo com o método descrito por Fukutake et al. (1996, modificado). Uma quantidade de cada grão foi triturada e selecionada através de peneiras de 100-200 *mesh* (Série *Tyler*), sendo a farinha submetida ao desengorduramento com hexano por 30 minutos a temperatura ambiente (~26ºC), mantendo uma proporção de 1:10 (p/v). Em seguida, a suspensão obtida foi centrifugada e os sólidos (10 g) foram separados do sobrenadante e secos sob ventilação forçada a 26ºC. Amostras de 1 g de cada farinha desengordurada, foram submetidas à extração alcoólica com 10 mL de soluções alcoólicas (etanol ou metanol, com diferentes proporções em água deionizada) durante 60 minutos a 26ºC. As amostras foram centrifugadas a 5000 × g por 10 minutos, e os sobrenadantes foram utilizados no estudo. Alíquotas de cada extração foram filtradas através de microfiltros de PTFE com porosidade de 0,22 μm (Millipore do Brasil, São Paulo) e os filtrados estocados a 4ºC até análise quantitativa das isoflavonas presentes por instrumental analítico adequado.

4.3.2 Extrato concentrado de isoflavonas

As isoflavonas de soja extraídas (item 4.3.1) foram concentradas por evaporação à vácuo, empregando rota-evaporador Buchler (LabConco Co., Estados

Unidos). A temperatura de evaporação foi mantida em 50ºC durante a extração do metanol utilizado na extração das isoflavonas da farinha desengordurada de soja (100-200 *mesh*; Série *Tyler*). O material obtido foi mantido sob refrigeração a 4ºC para ser utilizado nas análises de conversão enzimática das isoflavonas glicosiladas.

4.4 Análises Cromatográficas

4.4.1 Cromatografia líquida de alta eficiência

As análises das amostras por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR), foram feitas de acordo com Koo et al. (2000) e modificado por Park et al. (2001c). Alíquotas de vinte microlitros foram injetadas em cromatógrafo de fase líquida equipado com coluna YMC Pack ODS-A (RP-18; comprimento de 4,6 x 250 mm; partículas de 5 μm e 120 Å) e detector de arranjo de diodos (SPD-M10A, Shimadzu Co., Japão). A coluna foi eluída com um gradiente linear de água-ácido acético (solvente A; 19:1, v/v) e metanol (solvente B), iniciando com 20% de B (0-15 min) e aumentando até 80% (15-75min), sendo mantido em 80% (75-95 min) e diminuindo até 20% de B (95-105 min) com um fluxo de 0,5 mL/min. As isoflavonas eluídas foram detectadas por absorbância a 254 nm. Análise quantitativa de daidzina, glicitina, genistina, e suas formas agliconas foram obtidas por comparação com padrões autênticos (Sigma Co., USA e Funakoshi Co., Japão). As concentrações dos malonatos de isoflavonas (6"-O-malonildaidzeína e 6"-O-malonilgenisteína) foram calculadas pelas curvas-padrão dos correspondentes β-

glicosilados, e os resultados expressos em μg de isoflavonas por g de farinha desengordurada em base seca (b.s.). A normalização da massa molecular das formas conjugadas, foi calculada multiplicando-se a massa de cada conjugado pela razão entre a massa molecular da respectiva aglicona e a massa molecular da forma conjugada, conforme descrito por Song et al. (1998) e Kudou et al. (1991b).

4.4.2 Cromatografia em camada delgada

As análises em cromatografia em camada delgada (CCD) foram realizadas segundo método proposto por Kudou et al. (1991b). Alíquotas do extrato alcoólico de soja foram aplicadas em cromatoplacas (10 × 10 cm) Kieselgel 60 F_{254} (Merck Co., Alemanha), usando como sistema de solventes clorofórmio-metanol-água (7:3:1, v/v), em fluxo ascendente. Após 45 minutos de desenvolvimento do cromatograma, as placas foram observadas sob luz ultra-violeta nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm, utilizando iluminador UV Cole Parmer, modelo UVP-UVGL 58.

4.5 Análises Espectrofotométricas

4.5.1 Determinação do espectro de absorção máxima

Alíquotas de 18 μL de cada extrato, obtidos de acordo com o item 4.3, foram diluídas em 15 mL de solução de etanol a 80%, e o espectro de absorção na região UV-Visível foi determinado na faixa de 200–600 nm (*UV scanning*) utilizando espectrofotômetro Beckman Coulter DU–70 (USA).

4.5.2 Espectros de infra-vermelho

Alíquotas de 10 μL de cada extrato, obtidos de acordo com o item 4.3, foram aplicadas em pastilhas de sódio, em ambiente anidro, e os espectros de absorção foram determinados na região do infra-vermelho (650–4000 cm^{-1}), em modo *streching*, utilizando espectrofotômetro de infra-vermelho Perkin Elmer FTIR Modelo Spectrum One (USA), com transformada de Fourrier.

4.6 Espectrometria de Massas por Ionização em Eletrospray

Os espectros de massas por ionização em eletrospray foram obtidos em espectrômetro de massas quadrupolo Micromass® Q-Tof (fonte de íons Z-Spray). As amostras foram preparadas em solução de metanol:água (1:1, v/v), com adição de solução a 0,1% de hidróxido de amônio, para análises em modo negativo. As amostras foram injetadas na fonte a um fluxo contínuo de 15 μL/min, e a agulha do eletrospray foi operada à diferença de voltagem de 3,2 kV. As condições de operação foram: temperatura da fonte de ionização, 70ºC; gás de colisão, argônio a 17 psi; tempo de aquisição de espectro, 2 s.

4.7 Produção de β-Glicosidase

Diferentes cepas dos fungos filamentosos, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus awamori*, foram avaliados quanto à produção de β-glicosidase. A produção desta enzima também foi avaliada com mutantes de *Aspergillus oryzae* ATCC 22786 induzidos por luz UV.

4.7.1 Em meio semi-sólido

Para a fermentação semi-sólida foram utilizados frascos de Erlenmeyer de 500 mL contendo 20 g de farelo de trigo ou soja, de acordo com o objetivo do experimento. Os frascos com o farelo foram esterilizados, inoculados com um mililitro de suspensão de esporos (~10^7 esporos/mL) do microrganismo, sendo em seguida incubados em estufa a 30ºC, por um período de até 96 horas. Após a incubação, foram adicionados 100 mL de água destilada aos frascos e o meio de cultura foi triturado com auxílio de bastão de vidro. A suspensão obtida foi filtrada em lã de vidro para remoção do micélio fúngico. O filtrado obtido foi mantido em refrigerador a 4ºC até realização das análises.

4.7.2 Em meio líquido

O meio basal para fermentação submersa foi Czapeck-Dok composto por: 0,2% de nitrato de sódio, 0,1% de fosfato de potássio dibásico, 0,05% de sulfato de magnésio, 0,05% de cloreto de potássio, 0,001% de sulfato ferroso e 2% de glicose. Aos frascos com meio esterilizado, foram inoculados um mililitro de suspensão de esporos (~10^7 esporos/mL) do microrganismo. Para fermentação foram utilizados frascos de 250 mL, em agitador rotativo a 150 rpm e 30ºC, durante 96 horas. A suspensão obtida foi filtrada em papel de filtro, para remoção do micélio fúngico. O filtrado obtido foi mantido em refrigerador a 4ºC até realização das análises.

4.7.3 Atividade enzimática

A atividade de β-glicosidase foi determinada como descrito por Matsuura et al. (1995). Uma mistura de 2 mL de solução 1 mM de pNPG (*p*-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo) em tampão fosfato-citrato 0,1 M e pH 5,0 foi incubada a 40ºC por 5 minutos. Após a adição de 0,5 mL de extrato enzimático, a mistura foi incubada a 40ºC por 20 minutos. A reação foi interrrompida pela adição de 2,5 mL de carbonato de sódio 0,5 M. A absorbância do sistema reacional foi medida a 420 nm. A quantidade de *p*-nitrofenol liberada que forma um íon de coloração amarelada (Figura 22) pode ser determinada usando-se uma curva-padrão preparada da mesma maneira com 5-300 μmol de *p*-nitrofenol.

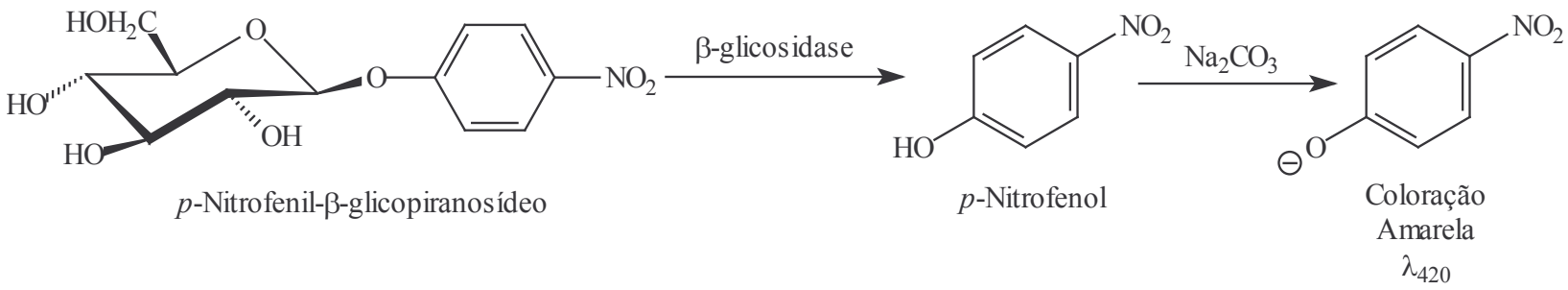


Figura 22: Hidrólise de *p*-nitrofenil-β-glicopiranosídeo com β-glicosidase.

4.8 Conversão de Isoflavonas Glicosiladas

A hidrólise da ligação glicosil de daidzina, glicitina e genistina foi realizada usando β-glicosidase fúngica. O extrato concentrado de isoflavonas foi obtido após evaporação (50ºC) à vácuo, do metanol utilizado na extração das isoflavonas da farinha desengordurada de soja. Em seguida, uma mistura contendo, 10 mL de extrato concentrado de isoflavonas, em tampão citrato-fosfato 50 mM, pH 5,5 e 1 mL de solução de β-glicosidase foi incubada a 40±1,0ºC. Após intervalos de tempo previamente estabelecidos, a conversão das isoflavonas glicosiladas foi avaliada por cromatografia em fase líquida, conforme descrito no item 4.4.1.

4.9 Propriedades Biológicas

4.9.1 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi determinada pela oxidação acoplada do β-caroteno e do ácido linoleico, de acordo com o método descrito por Park & Ikegaki (1998). Em um balão de fundo redondo, foram adicionados 60 mg de ácido linoleico, 200 mg de Tween 40 e 5 mg de β-caroteno, os quais foram redissolvidos em 5 mL de clorofórmio, posteriormente removidos utilizando-se um rota-evaporador a 45ºC. Após a remoção do clorofórmio, o resíduo foi dissolvido com a adição de 50 mL de água deionizada e oxigenada sob vigorosa agitação. Alíquotas de 1 mL desta emulsão, foram transferidas para tubos de ensaio contendo 0,05 mL do extrato metanólico contendo os isoflavonóides antes e após o tratamento enzimático (1:10, v/v) e 2 mL de água deionizada e oxigenada. A leitura da

absorbância foi feita em espectrofotômetro a 470 nm, no tempo inicial e em intervalos de 60 minutos com incubação a 40ºC, para a reação de oxidação, durante período de 3 horas. Os tubos controle, lidos a cada intervalo de tempo, não continham o extrato metanólico contendo os isoflavonóides (1:10, v/v).

4.9.2 Inibição do crescimento bacteriano

❖ **Preparo dos discos**

Aos discos de papel de filtro Whatman n°3 (ϕ 5 mm) foram aplicados 24 μL dos extratos alcoólicos de isoflavonóides, que foram incubados a 60°C por 2 horas para eliminar o excendente alcoólico dos discos. Em seguida, os discos foram acondicionados em dessecadores durante 24 horas a temperatura ambiente, e aplicados sobre placas de Petri contendo a suspensão de células bacterianas em meio nutriente-ágar.

❖ **Análise da atividade inibitória**

A atividade inibitória dos extratos de isoflavonas sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, coagulase positiva, foi realizada de acordo com método descrito por Park et al. (1998). Culturas bacterianas ativas, foram inoculadas por espalhamento com *swabs* estéreis (Difco Co., Estados Unidos) em placas de Petri contendo nutriente-ágar (Difco Co., Estados Unidos). Os discos contendo os extratos de isoflavonas foram colocados sobre as placas e incubadas a 37°C por aproximadamente 18 horas. A atividade inibitória para *S. aureus* foi determinada pela formação de halo inibitório ao redor dos discos e expressa em milímetros.

4.9.3 Inibição da hialuronidase

A inibição da enzima hialuronidase está associada à inibição de processos inflamatórios em diferentes tecidos do organismo humano. Portanto, a atividade anti-inflamatória dos extratos de isoflavonas de soja foi determinada através da atividade da enzima hialuronidase de acordo com Reissing et al. (1955) e Aronson e Davidson (1967). Foram adicionados 50 μL de cada extrato de isoflavonas aos tubos de reação enzimática. Em seguida, adicionou-se 0,5 mL da solução de ácido hialurônico (Sigma Co.) (1,2 mg de ácido hialurônico por mL de solução tampão acetato 0,1 M, pH 3,6, contendo 0,15 M de NaCl) nos tubos de reação e no tubo controle. Os tubos foram incubados a 37ºC, e após 5 min foram adicionados 50 μL (350 Unidades) da enzima hialuronidase (Tipo IV-S de testículos bovinos, Sigma Co.), dissolvida no mesmo tampão do substrato, na concentração de 6,5 mg/mL. Os tubos foram incubados a 37ºC por 40 min. A reação foi interrompida pela adição de 10 μL de solução 4 N de hidróxido de sódio. A adição dos extratos de isoflavonas de soja nos tubos-controle foi feita após decorrido o tempo de reação enzimática. Após a incubação, 0,1 mL de solução 0,8 M de tetraborato de potássio foi adicionada na mistura de reação e aquecida sob ebulição por 3 min. Em seguida, os tubos foram adicionados 3 mL de *p*-dimetilaminobenzaldeído (solução de 10% em ácido acético glacial contendo 12,5% de ácido clorídrico 10 N), e os tubos incubados novamente a 37ºC por 20 min. As leituras de absorbância foram medidas em espectrofotômetro Beckman Coulter DU-70 (Estados Unidos) a 585 nm, utilizando-se água como controle da leitura do equipamento.

4.10 Efeito da Rradiação Gama sobre as Isoflavonas

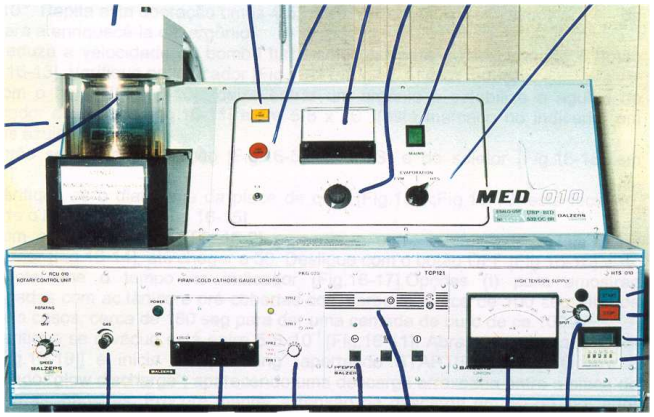
O efeito da radiação gama sobre as isoflavonas de soja foi avaliado num trabalho de cooperação com Prof. Dr. Júlio M. M. Walder do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) da Universidade de São Paulo (Piracicaba, SP). As amostras de farinha desengordurada de soja e extrato concentrado de isoflavonas (item 4.3.2), foram tratadas com uma taxa de irradiação de 1284 Gy/h (irradiador de ^{60}Co GammaCell 220 Excel (MDS Nordion, Canadá) e as amostras receberam doses acumulativas durante 48 horas. Os materiais tratados foram acondicionados em recipientes de polietileno, e durante a irradiação foram mantidos a temperatura ambiente. Cada dose de radiação usada foi considerada como um tratamento e as doses empregadas foram de 2, 5, 10, 25 e 50 kGy. Após os tratamentos, as amostras foram estocadas a 4ºC, para análise cromatográfica posterior de sua composição química contra amostras de controle (sem tratamento com radiação gama).

4.11 Efeito do Aquecimento sobre as Isoflavonas

O efeito do aumento da temperatura sobre a estabilidade das estruturas de malonil-isoflavonas de soja foi avaliada empregando-se farinha desengordurada de soja. Dez gramas de farinha de soja foram colocados em frascos de Erlenmeyer de 250 mL juntamente com água destilada, numa proporção de 1:10 (v/v). Os frascos foram incubados em banho-maria a diferentes temperaturas (26, 80, 100 e 121ºC) em diferentes intervalos de tempo (20, 40 e 60 min), conforme tratamento avaliado.

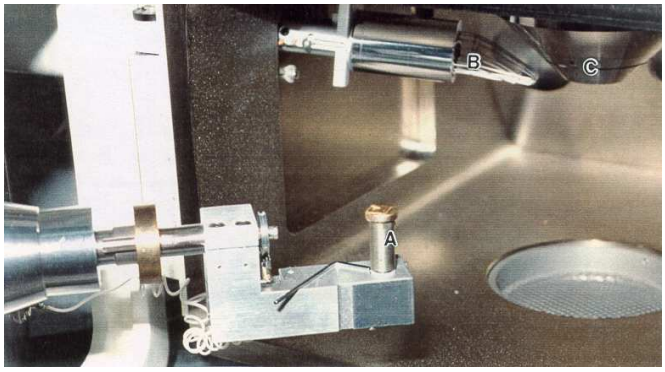
4.12 Microscopia Eletrônica de Varredura

As amostras de farinha de soja tratadas por radiação gama foram observadas por microscopia eletrônica de varredura, num trabalho de cooperação com Prof. Dr. Elliot W. Kitajima do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Pesquisa (NAP/MEPA) da Universidade de São Paulo (Piracicaba, SP). Amostras de farinha de soja foram recobertas com uma película de outro de 100 Å usando um metalizador MED 010 (Balzers) (Figura 23a) com uma corrente de 50 mA por 180 s. Os *stubs* (Figura 23b) assim preparados foram observados com uma magnitude de 2500 vezes em um microscópio eletrônico de varredura DSM 940A (Zeiss) (Figura 23c) com uma voltagem de 10 kV.



(a)

Foto: E. W. Kitajima (ESALQ/USP)



(b)

Foto: E. W. Kitajima (ESALQ/USP)

(c)

Foto: C. L. Aguiar (FEA/Unicamp)

Figura 23: Equipamento de microscopia eletrônica de varredura e metalizador de amostras. **(a)** Vista frontal do metalizador MED 010 Blazers; **(b)** Vista interna da câmara porta-espécimes, com um *stub* em detalhe (A); e **(c)** Vista panorâmica do microscópio eletrônico de varredura Zeiss DSM 940A.

4.13 Análise Estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, sendo os dados analisados pelo programa MSTAT-C (MSTAT, 1988) para a determinação da análise de variância. A separação entre as médias dos tratamentos foi realizada usando o teste de Tukey com um nível de confiança de 95%.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Métodos de Extração de Isoflavonas de Soja

Por mais de 2000 anos, povos do leste asiático utilizam a soja como ingrediente básico em suas culinárias, produzindo alimentos como *nimame*, *edamame*, *tofu*, *kori-tofu*, *abura-age*, *sufu*, extrato de soja, molho de soja (*shoyu*), *miso*, *natto*, *tempeh* e entre outros produtos. Esta leguminosa originária das planícies do Norte da China, foi levada à diversas partes do mundo pelo comércio marítimo no século XIX, sendo que um século se passou até que ganhasse importância comercial no ocidente (Barnes, 1998). Atualmente, a soja tem recebido grande atenção por promover benefícios à saúde, devido ao seu potencial na prevenção de câncer, doenças coronarianas e osteoporose (Andersson et al., 1995). O fato mais recente que confirma a tendência mundial de crescimento da utilização de derivados de soja, com base nos benefícios para a saúde, é que o FDA permitiu a inclusão nos rótulos de alimentos processados que contenham derivados de soja, a informação que a ingestão diária de certos derivados de soja podem reduzir riscos de doenças coronarianas pela redução dos níveis de colesterol no sangue, desde que seja mantida uma dieta com baixos níveis de gorduras saturadas e colesterol.

Sabe-se que os benefícios que a soja pode promover à saúde humana, estão relacionados a dois componentes: as proteínas da soja e as isoflavonas. As isoflavonas, enfoque deste estudo, apresentam diferentes formas conjugadas, e para uma utilização segura, em alimentos processados, a padronização é necessária

para garantir a autenticidade dos alimentos e que o conteúdo de princípios ativos corresponda aos parâmetros de qualidade. Uma técnica bastante empregada na análise do conteúdo de isoflavonas em produtos de soja, são os métodos cromatográficos, devido à sua alta eficiência, rapidez e possibilidade de utilização de sistemas automatizados (Celeghini et al., 2001).

As isoflavonas são metabólitos encontrados nas células dos grãos de soja, sendo necessário sua extração para uma adequada quantificação. A análise preliminar dos extratos alcoólicos de soja, pela observação dos espectros de absorção na região do UV-Visível (200-600 nm), demonstrou que metanol e etanol apresentaram capacidade de extrair compostos que absorvem na região próxima a 260 nm, tal como as isoflavonas absorvem. Segundo Nurmi et al. (2002) os valores de comprimentos de onda para as isoflavonas glicosiladas, daidzina, glicitina, genistina, são 260, 262 e 262 nm, respectivamente. Por outro lado, Jackson et al. (2002) analisaram seis padrões de isoflavonas, as quais apresentaram os seguintes valores de absorção máxima: daidzina (258 nm), glicitina (262 nm), genistina (262 nm), daidzeína (250 nm), gliciteína (262 nm), e genisteína (262 nm). Os valores de absorção máxima para as soluções-padrão de isoflavonas com as quais pudemos trabalhar apresentaram valores similares aos obtidos por Nurmi et al. (2002).

A Figura 24 apresenta os espectros de absorção na região do UV-Visível para os extratos alcoólicos de soja. Os valores de absorção máxima para os extratos de soja preparados com etanol variaram de 254 a 284 nm, para as amostras de 10 a 100% de etanol em água deionizada. As amostras de 10 e 100% de etanol não

apresentaram espectros de absorção bem definidos, o que impossibilitou a determinação confiável dos valores de absorção máxima na região de 200 a 600 nm. Os espectros de absorção máxima se apresentaram bem definidos apenas para os extratos etanólicos de 50 a 90%, faixa de concentrações as quais apresentaram concentrações mais elevadas de isoflavonas totais (50, 60 e 70%).

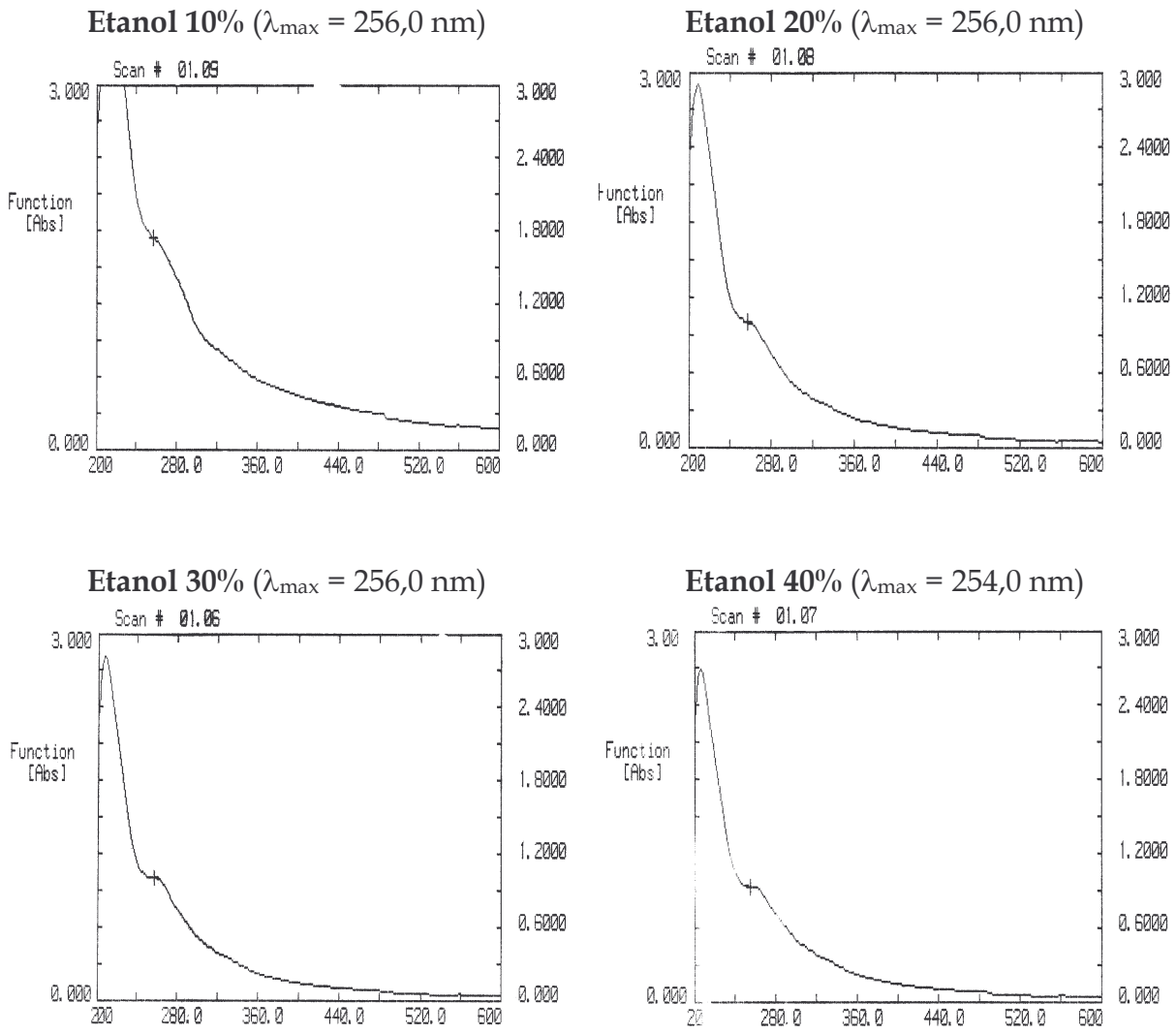
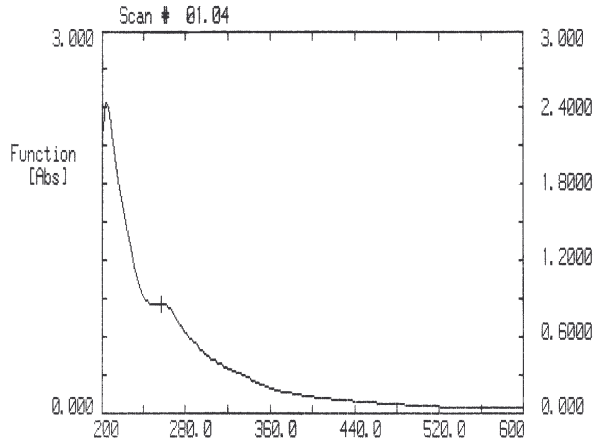
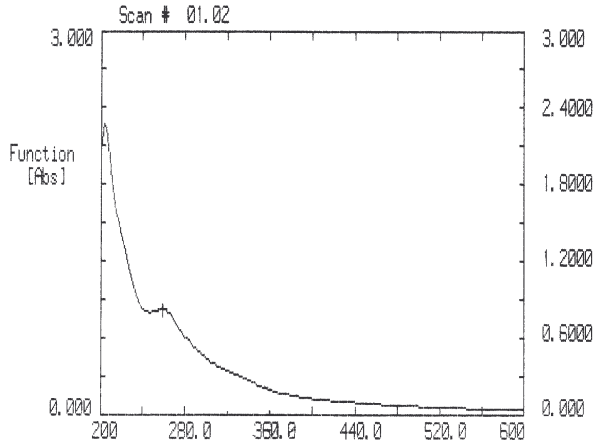


Figura 24: Espectros de absorção na região UV-Visível dos extratos etanólicos de soja.

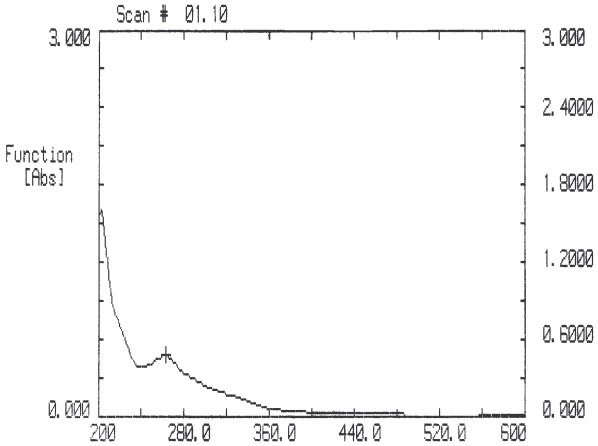
Etanol 50% (λ_{max} = 256,0 nm)



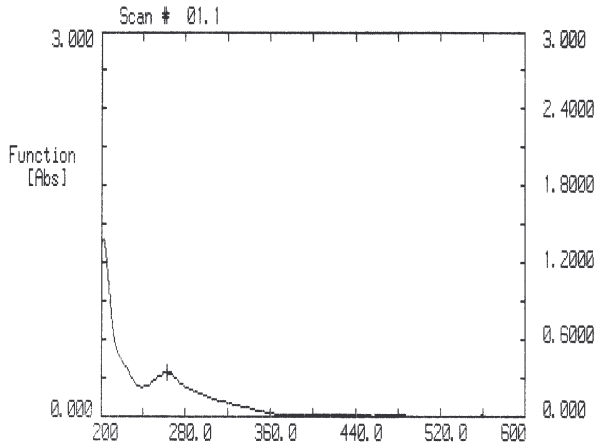
Etanol 60% (λ_{max} = 258,0 nm)



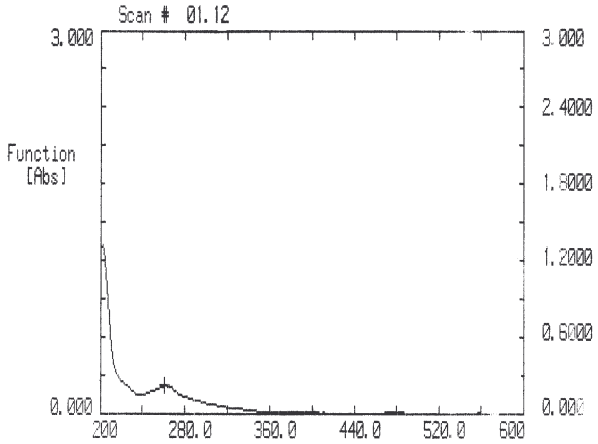
Etanol 70% (λ_{max} = 262,0 nm)



Etanol 80% (λ_{max} = 262,0 nm)



Etanol 90% (λ_{max} = 260,0 nm)



Etanol 100% (λ_{max} = 284,0 nm)

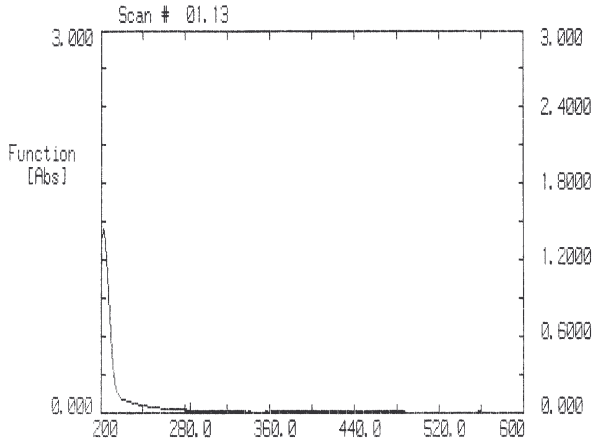
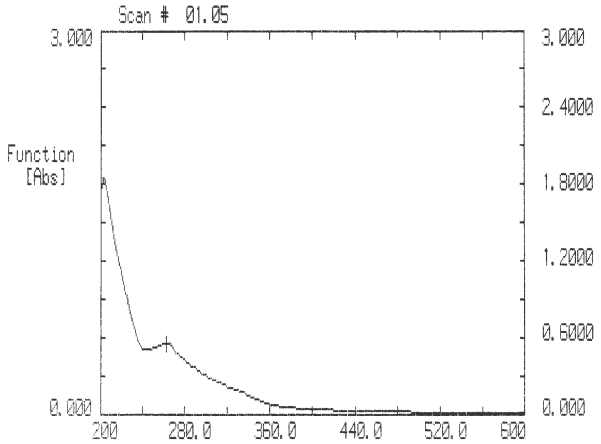


Figura 24: Espectros de absorção na região UV-Visível dos extratos etanólicos de soja (continuação).

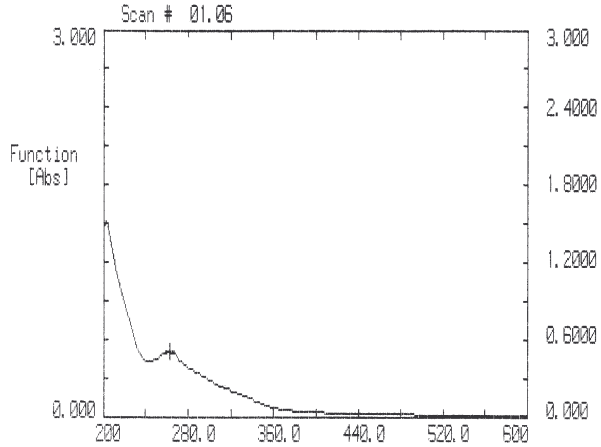
Por outro lado, soluções com metanol apresentaram valores de absorção máxima muito próximas àquelas descritas na literatura científica (260-262 nm). Em todas as amostras de extratos metanólicos (50 a 100% de metanol em água deionizada), os valores de absorção máxima foram de 262 nm (Figura 25).

Portanto, pela análise preliminar dos extratos alcoólicos de soja, tanto soluções de etanol quanto metanol, podem promover uma adequada extração de isoflavonas de soja. Para quantificar o conteúdo de isoflavonas isoladas e totais extraídas em cada sistema de extração estudado foram realizadas análises cromatográficas em CLAE-FR dos extratos alcoólicos de soja. Na Tabela 6 são apresentados os resultados obtidos nos dois sistemas de solventes, em diferentes proporções com água, para extração de isoflavonas de farinha desengordurada de soja. Esta farinha, após desengorduramento com hexano a 25ºC e 30 minutos, foi passada por um jogo de peneiras da Série *Tyler*, sendo que a porção retida entre 100-200 *mesh* foi utilizada nas análises.

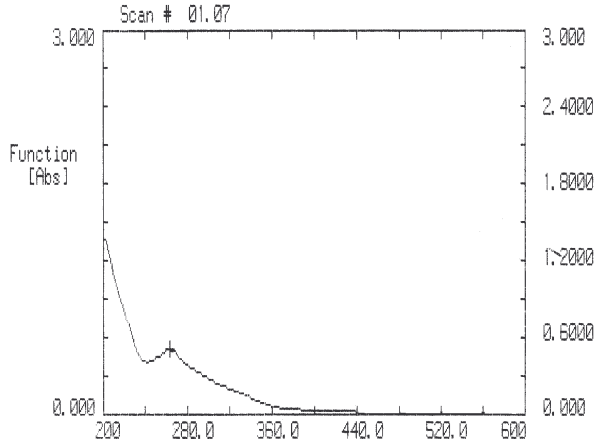
Metanol 50% (λ_{max} = 262 nm)



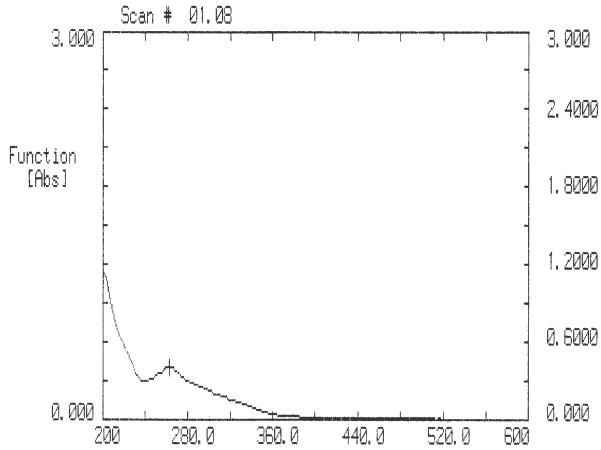
Metanol 60% (λ_{max} = 262 nm)



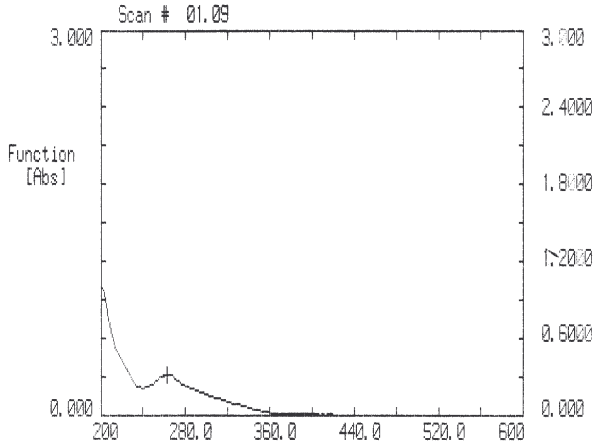
Metanol 70% (λ_{max} = 262 nm)



Metanol 80% (λ_{max} = 262 nm)



Metanol 90% (λ_{max} = 262 nm)



Metanol 100% (λ_{max} = 262 nm)

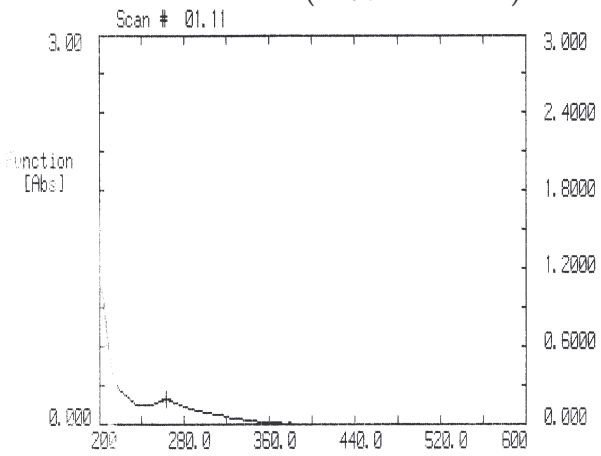


Figura 25: Espectros de absorção na região UV-Visível dos extratos metanólicos de soja.

Tabela 6: Extração de isoflavonas de farinha desengordurada de soja com solução alcoólica.

Sistema de Solventes	μg de isoflavonas/g de farinha de soja						
	Daidzina	Glicitina	Genistina	Daidzeína	Gliciteína	Genisteína	Isoflavona total
Etanol 30%	289,4 ± 11.0	82,22 ± 3,0	303,96 ± 5,5	13,5 ± 1,0	0,0	12,0 ± 0,5	701,08[F]
Etanol 40%	303,4 ± 15.0	79,48 ± 3,5	304,08 ± 5,5	13,4 ± 1,0	0,0	20,5 ± 0,2	720,86[F]
Etanol 50%	338,8 ± 10.0	116,61 ± 3,0	353,33 ± 7,2	20,3 ± 2,0	0,0	30,3 ± 3,5	859,34[AB]
Etanol 60%	338,3 ± 9.0	101,71 ± 3,5	374,7 ± 11,5	22,4 ± 1,1	0,0	33,6 ± 4,5	870,71[AB]
Etanol 70%	319,7 ± 5.0	85,15 ± 4,5	373,39 ±16,1	21,3 ± 0,6	0,0	33,7 ± 3,0	833,24[BC]
Etanol 80%	310,0 ± 4,0	42,92 ± 1,5	363,01 ± 4,5	22,1 ± 1,5	0,0	32,4 ± 2,6	770,43[DE]
Etanol 90%	195,1 ± 13,0	28,59 ± 1,5	269,84 ± 6,5	25,7 ± 2,6	0,0	35,4 ± 3,1	554,63[G]
Etanol 100%	31,7 ± 1,5	6,69 ± 0,6	91,61 ± 2,5	10,0 ± 0,2	0,0	18,0 ± 0,4	158,0[H]
Metanol 70%	307,8 ± 25,0	107,76 ± 3,5	332,45 ± 6,5	19,8 ± 0,3	0,0	27,4 ± 4,0	759,21[CD]
Metanol 80%	339,7 ± 10,0	105,4 ± 3,5	382,01 ±11,6	19,3 ± 0,3	0,0	32,3 ± 3,0	878,71[A]
Metanol 90%	348,6 ± 6,5	118,14 ± 1,5	353,45 ± 5,0	21,5 ± 0,3	0,0	29,8 ± 2,5	871,49[A]
Metanol 100%	295,8 ± 10,5	95,02 ± 4,0	315,39 ± 6,5	21,1 ± 0,3	0,0	27,9 ± 2,6	755,21[EF]

Os dados representam microgramas de isoflavonas por grama de farinha desengordurada de soja ± desvio padrão da média de três determinações. A média seguida do mesmo caracter não diferencia significativamente para teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

O total de isoflavonas encontrado em soja distribuí-se basicamente em isoflavonas glicosiladas e isoflavonas agliconas (Ahluwalia et al., 1953). Eldridge (1982) e Fukutake et al. (1996) afirmam que genistina e daidzina são as principais isoflavonas e constituem de 50 a 90% dos flavonóides em farinha de soja. Outros compostos derivados destes compostos glicosilados foram identificados e compreendem as formas acetil e malonil. Park et al. (2001a), analisando diferentes cultivares de soja de uma mesma região brasileira, puderam observar grande variação da concentração destas isoflavonas (considerando o teor de isoflavonas totais). Segundo Carrão-Panizzi et al. (1998) a concentração de isoflavonas em soja é geneticamente determinada e afetada por fatores ambientais e pela temperatura local. Segundo Genovese e Lajolo (2001a), os fatores que afetam a composição de isoflavonas em soja estão também relacionados à (1) variedade e condições de cultivo; (2) às condições de processamento da soja, ou ainda (3) às metodologias de análise. A metodologia de análise é uma etapa importante na avaliação do teor de isoflavonas em soja, tanto na elaboração de um método eficiente de extração quanto na própria análise, que atualmente se baseia principalmente na análise por cromatografia líquida de alta eficiência.

As proporções de solventes orgânicos, em água, adequadas à extração das isoflavonas da farinha desengordurada de soja foram investigadas, e foi encontrado que as soluções aquosas de metanol a 80 e 90%, bem como as soluções

aquosas de etanol a 50 e 60%, foram estatisticamente semelhantes e capazes de extrair uma maior quantidade de isoflavonas de farinha desengordurada de soja, muito embora todos os sistemas empregados fossem capazes de extrair quantidades significativas das isoflavonas (Tabela 6). É aparente que as soluções aquosas de etanol a 50% e 60% extraíram elevadas quantidades de isoflavonas (859,34 e 870,71 μg/g, respectivamente), entretanto metanol 80% e 90% extraíram as maiores quantidades destes compostos, com valores de 871,49 e 878,71 μg/g, respectivamente. A diferença entre estas concentrações de isoflavonas totais foram estatisticamente semelhantes pela comparação de média dos valores através de análise do teste de Tukey, em nível de significância de 5%.

Métodos de extração de isoflavonas de produtos de soja foram estudados por Hutabarat et al. (2001), quando foi verificado que eficiente extração destes compostos fenólicos levemente polares requeria o uso de solventes polares. De acordo com estudos anteriores, Eldridge (1982), Barbuch et al. (1989) e Ikeda et al. (1995) mostraram que solução aquosa de metanol a 80% foi eficiente na extração de isoflavonas conjugadas e agliconas; no entanto, acetonitrila, etanol e metanol puros não apresentaram uma boa capacidade de extração. O mesmo fato foi observado neste estudo, visto que os menores teores de isoflavonas totais extraídos foram para os sistemas de solventes compostos por etanol e metanol puros, com concentrações totais de 158,0 μg/g e 755,21 μg/g, respectivamente. Cabe ressaltar que embora metanol puro tenha apresentado um rendimento de extração baixo dentre os sistemas testados com metanol, este sistema de solventes foi muito

superior à outros utilizados com etanol. Efetivamente, o sistema de solventes que demonstrou pouca eficácia na extração de isoflavonas foi o composto por etanol a 100%.

De acordo com Genovese e Lajolo (2001a) e Barnes et al. (1994), solução de metanol a 80% é um extrator eficiente para as isoflavonas de soja. Por outro lado, tem sido declarado que solução aquosa de acetonitrila a 80% seria mais eficiente que solução de metanol a 80% (Farmakalidis e Murphy, 1985; Griffith e Collison, 2001). Por este fato, o presente estudo propôs não somente verificar a capacidade de extração de isoflavonas de soja empregando várias concentrações de etanol (30-100%) e metanol (70-100%), mas também estudar o potencial de extração de sistemas compostos por acetonitrila (ACN), dimetilsulfóxido (DMSO), etanol acidificado e metanol acidificado. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7: Efeito da acidificação na extração de isoflavonas de farinha desengordurada de soja.

Isoflavona (μg/g) [b]	Sistema de Solventes para Extração [a]					
	Etanol 60%	Etanol 60% HCl	Metanol 80%	Metanol 80% HCl	Acetonitrila HCl	Acetonitrila DMSO [c]
Daidzina	609,86	671,60	836,38	836,10	557,24	645,69
Glicitina	62,27	62,81	89,72	83,33	52,04	70,71
Genistina	547,77	608,58	753,29	757,12	503,22	590,92
Malonil daidzina	786,60	917,85	629,27	766,90	847,75	991,52
Malonil glicitina	77,81	83,67	60,53	74,70	66,23	97,97
Malonil genistina	697,17	825,44	567,52	671,91	777,32	883,17
Daidzeína	31,73	40,62	32,93	37,66	54,10	49,43
Gliciteína	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Genisteína	26,31	35,31	25,50	31,43	39,27	38,17
Isoflavonas totais	2839,51	3245,89	2995,14	3259,15	2897,18	3367,58

[a] Os sistemas de extração compostos por HCl e DMSO representam soluções que contêm ácido clorídrico e dimetilsufóxido, respectivamente. [b] Os valores expressos em microgramas de isoflavonas por grama de farinha de soja, foram obtidos de análises em duplicata. [c] A composição dos solventes que compunham o sistema foi de 60,6% de acetonitrila e 3,03% de dimetilsufóxido.

Park et al. (2001a) demonstraram que naturalmente ocorre uma variação no conteúdo de isoflavonas de acordo com o cultivar de soja analisado. Neste trabalho, Park e colaboradores utilizaram uma solução de metanol a 80%, numa proporção de um grama de farinha de soja para 10 mL de solução metanólica a 25ºC. Vários trabalhos científicos têm apresentado diferentes formas e sistemas de extração de isoflavonas de soja ou seus derivados, no entanto, dentre estes a grande maioria utiliza sistemas de extração compostos com metanol, em diferentes proporções, com prevalência para proporção de 80% em água destilada. Genovese e Lajolo (2001b) testaram diferentes sistemas de extração de isoflavonas em farinhas e isolados de soja, e puderam verificar que solução acidificada de metanol

80% foi o mais eficiente. Outros sistemas testados foram metanol 70%, acetonitrila 60% e acetonitrila 80%; e estes foram combinados com ácido clorídrico (0,1 N) e água destilada para se alcançar as concentrações descritas.

A solução de metanol a 80% é sem dúvida a mais empregada para a extração das diferentes formas de isoflavonas, seja da farinha de soja ou de outros produtos derivados da soja, sendo isto observado em diversos trabalhos (Genovese e Lajolo, 2002; Park et al., 2002a; Park et al., 2001d; Grün et al., 2001; Kulling et al., 2001; Mikkonen et al., 2001; Nyman e Kumpulainen, 2001; Chu et al., 2000; Katagiri et al., 2000; Liggins et al., 2000; Lugasi e Hóvári, 2000; Pandjaitan et al., 2000a; Aussenac et al., 1998; Liggins et al., 1998; Fukutake et al., 1996; Coward et al., 1993).

Outros sistemas têm sido empregados na extração de isoflavonas de soja e seus produtos, sendo a solução de etanol a 96%, em banho-maria a 80-90ºC por 2-4 h (Rupp et al., 2000; Hui et al., 2001; Hutabarat et al., 2001), um dos sistemas empregados, seguido de acetonitrila pura (Griffith e Collison, 2001) e acetonitrila com ácido clorídrico 0,1 N (Wang e Murphy, 1994; Ravelo e Sánchez, 2001). Sabe-se que amostras extraídas com acetonitrila (60 ou 80%) quando submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência para análise dos perfis de isoflavonas, apresentam cromatogramas distorcidos, não permitindo a identificação correta dos picos. Tais alterações não são observadas quando a extração com acetonitrila é realizada em meio ácido, como sugerido por Genovese e Lajolo (2001a), Song et al. (1998) e Wang e Murphy (1994). É importante ressaltar que o mesmo foi observado para as amostras extraídas com soluções etanólicas com concentrações superiores a

80% em água destilada, muito embora, fosse possível a definição dos picos cromatográficos. Com maiores proporções de etanol em água, a resolução dos picos obtidos foi prejudicada, ao contrário com proporções menores de etanol, geraram picos bem definidos e estreitos.

Até mesmo água quente (80ºC por 1 h) tem sido empregada na extração de catequinas de chá verde (Amarowicz e Shahidi, 1996). Pelo menos um concenso há na proporção entre o solvente e o produto de soja, e este é de 1 grama da farinha ou outro derivado de soja para cada 10 mL do sistema solvente.

Muitos autores preferem utilizar sistemas acidificados na extração destes compostos fenólicos, o que se justifica pela maior extração como visto na Tabela 7. Os sistemas alcoólicos acidificados promoveram maior extração das isoflavonas da farinha desengordurada de soja, muito embora este sistema não tenha sido empregado durante este trabalho de tese, devido à maior complexidade em seu preparo e ajuste do potencial hidrogeniônico (~pH 3,5). Considerando-se que a maioria das proteínas de soja possuem ponto isoelétrico na faixa de pH 4,0-4,5, torna-se inviável a aplicação de uma solução a pH 3,5, sem que haja precipitação das proteínas da soja analisada. Genovese e Lajolo (2001a) reportaram que extrações com metanol a 80% estão menos sujeitas ao aparecimento de picos contaminantes, e que o emprego de meio acidificado se justificaria quando é desejável fazer a hidrólise ácida de compostos glicosilados presentes na soja, como por exemplo, isoflavonas glicosiladas (daidzina, glicitina e genistina). Considerando-se que neste trabalho, o objetivo foi avaliar o perfil das isoflavonas

presentes em diferentes cultivares e produtos de soja, naturalmente presentes nestes, não seria prudente o emprego de substâncias que viessem alterar a composição inicial destes flavonóides, como por exemplo, a hidrólise das formas glicosiladas.

Apesar de outros sistemas de extração, como a combinação acetonitrila-dimetilsulfóxido (5:0,25, para cada grama de farinha desengordurada de soja), terem apresentado maior capacidade de extração das isoflavonas, este sistema emprega solventes com alta toxicidade, o que acarretaria em maior impedimento comercial de seu emprego na indústria de alimentos. Por outro lado, podemos verificar que o rendimento obtido com etanol a 60% acidificado (3245,89 μg/g) foi muito próximo ao obtido pelo sistema acetonitrila-dimetilsulfóxido (3367,58 μg/g). O etanol por sua vez tem sido empregado na indústria alimentícia, seja como sistema de extração, limpeza ou até mesmo como ingrediente, se formos considerar bebidas alcoólicas como as aguardentes, com graduação alcoólica de 38-54%.

Neste trabalho foi empregado para extração das isoflavonas de soja, o sistema composto por solução aquosa de metanol a 80%, para se manter uma correlação com a maioria dos trabalhos realizados nesta área do conhecimento.

5.2 Composição de Isoflavonas em Cultivares e Produtos de Soja

Certos fitoquímicos encontrados em frutas, hortaliças e grãos, como as isoflavonas, possuem propriedades preventivas contra o câncer, podendo inibir a fase de iniciação do tumor, prevenir os efeitos oxidativos em nível celular, ou

afetar o metabolismo de prostaglandinas ou de hormônios-esteróides, bloqueando a progressão do tumor.

Foram avaliados os teores de isoflavonas, agliconas e conjugadas, em vinte cultivares de soja provenientes do CNPSo-Embrapa (Londrina, PR), quatorze cultivares do IAC (Campinas, SP), cinco cultivares do Cefet-PR (Pato Branco, PR) e um cultivar da Gebana Co. (Capanema, PR). Os cultivares foram anteriormente preparados como descrito no Item 4.3.1, e o conteúdo de isoflavonas foi analisado em CLAE-FR com detector de arranjo de diodo, após eluição em sistema gradiente de metanol e água acidificada, como descrito no Item 4.4.1.

Em todos os cultivares analisados neste trabalho, o conteúdo de malonato de isoflavonas foi superior ao das outras formas substituídas de isoflavonas ou mesmo, de formas agliconas. As formas agliconas foram encontradas em menor quantidade em relação às outras formas substituídas de isoflavonas, e estes resultados podem ser vistos na Tabela 8. Pela Figura 26, pode-se confirmar que os resultados corroboram com o apresentado na Tabela 8. As isoflavonas extraídas de alguns cultivares de soja do IAC (Figura 26) demonstraram em sua maioria conter as formas malonil e glicosil das isoflavonas, além de um menor teor das formas agliconas, quando analisados após extração à temperatura ambiente.

É importante observar que o último parâmetro mencionado neste parágrafo foi a temperatura de extração das isoflavonas de farinha de soja, pois

num momento oportuno discutiremos que a temperatura é um fator importante na manutenção das formas isoméricas originais das isoflavonas conjugadas.

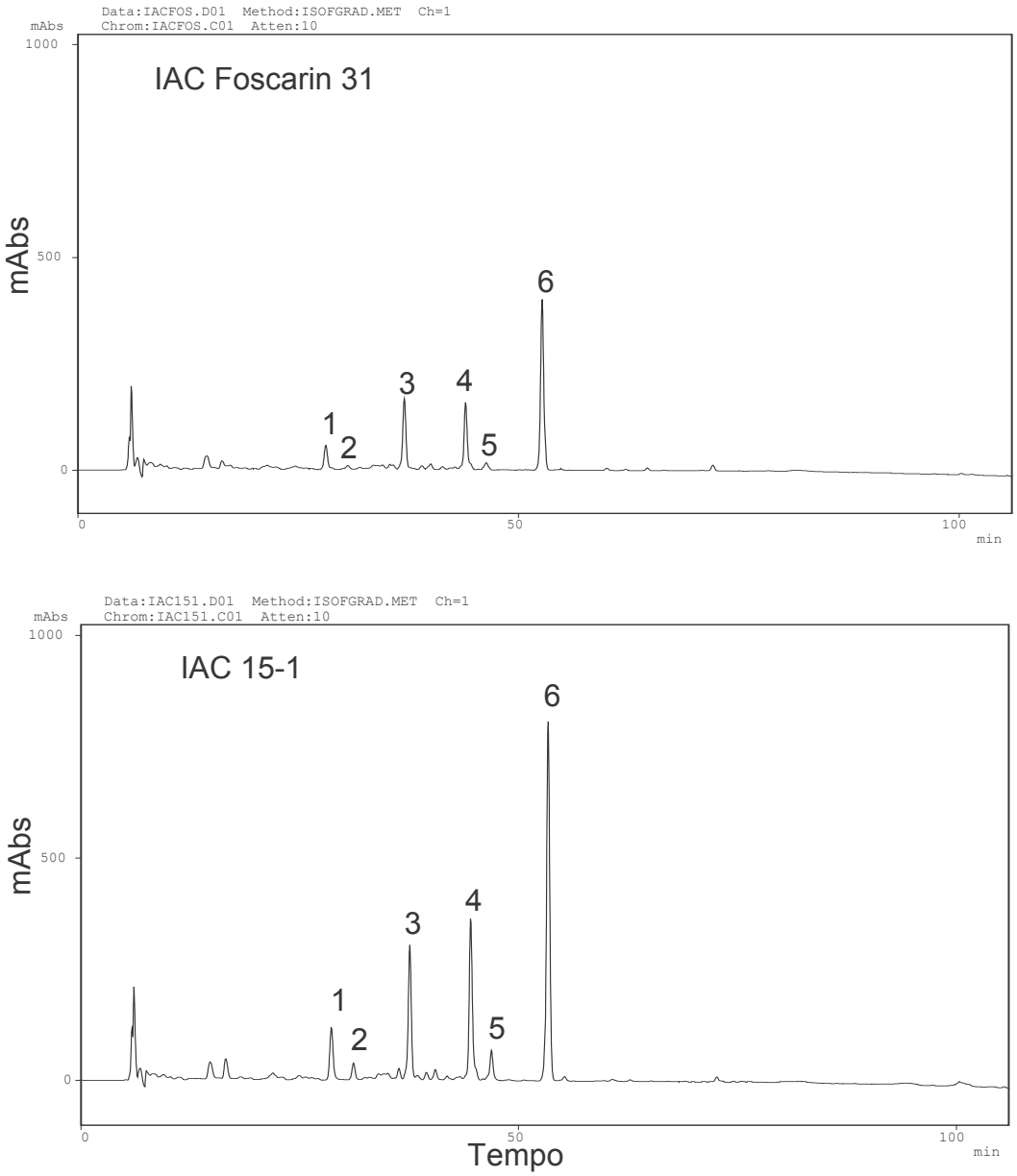


Figura 26: Cromatografia líquida de alta eficiência de isoflavonas obtidas dos extratos metanólicos de soja IAC. Cultivares: IAC 15-1 e IAC Foscarin-31. Isoflavonas: **1**: daidzina; **2**: glicitina; **3**: genistina; **4**: malonil-daidzina; **5**: malonil-glicitina e **6**: malonil-genistina.

Na Figura 27, estão ilustradas as estruturas químicas planares das principais isoflavonas encontradas após extração alcoólica, à temperatura ambiente, das farinhas desengorduradas dos cultivares analisados neste trabalho.

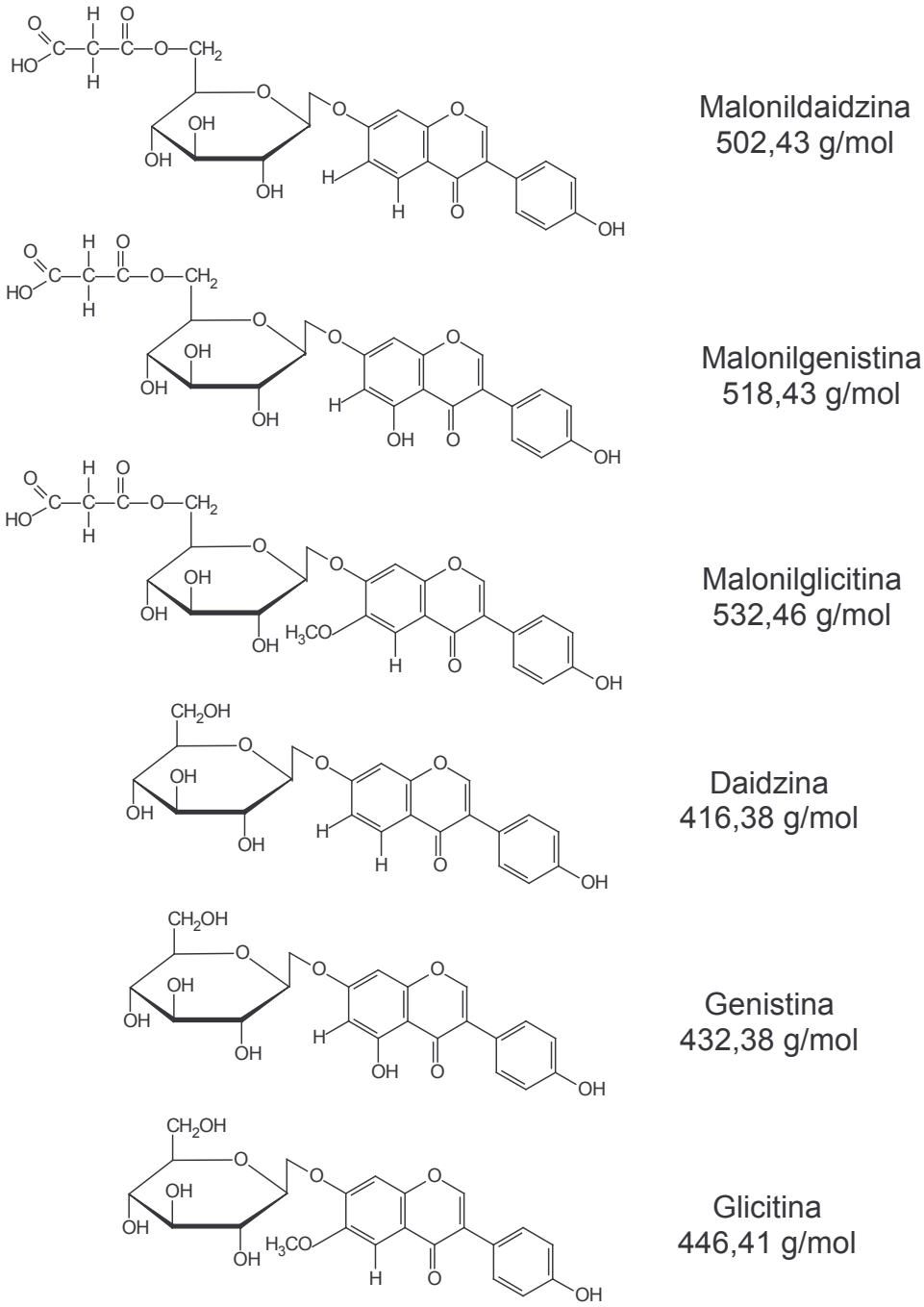


Figura 27: Estruturas químicas das principais isoflavonas encontradas nos extratos metanólicos de soja.

A análise completa dos teores de isoflavonas nos diferentes cultivares de soja estudados como apresentada na Tabela 8, pode-se verificar que foi possível avaliar um grande número de cultivares de soja produzidos no Brazil, tanto para comercialização nacional quanto para exportação na forma de grãos ou derivados, como o farelo de soja e óleo de soja. Como descrito por Carrão-Panizzi et al. (1998), a concentração das isoflavonas no grão de soja é afetada por fatores ambientais e pelo localização da área de plantio, muito embora, pesquisadores como Tsukamoto et al. (2001) têm demonstrado que o tipo de solo de plantio afeta diretamente no conteúdo de isoflavonas, independentemente do cultivar empregado para o plantio.

Com o intuito de contribuir para o entendimento, será descrita a posição geográfica (latitude e longitude) dos locais de plantio dos cultivares empregados neste estudo. Os cultivares IAC foram colhidos na Fazenda Santa Elisa no município de Campinas (SP), que está localizada a 22º 53' 20" latitude S e 47º 04' 40" longitude W, à 680 m de altitude. Os cultivares BRS e Embrapa foram coletados de campos experimentais do CNPSo-Embrapa no município de Londrina (PR), que está localizada a 23º 18' 37" latitude S e 51º 09' 46" longitude W, à 585 m de altitude. Os cultivares ICA foram doados pelo Dr. S. M. Alencar do Centro Federal de Educação Tecnológica, os quais foram coletados de campos experimentais localizados no município de Pato Branco (PR), cujas posições geográficas são: 26º 11' 00" latitude S e 52º 36' 00" longitude W, à 760 m de altitude. Por último, foi analisada uma amostra de soja obtida de campos de cultivo orgânico, com o intuito

de verificar se há alguma alteração nos teores de isoflavonas frente ao cultivo orgânico. O cultivar BR-36 após cultivo no município de Capanema (PR), localizada à 53º 48' 32" longitude W, 25º 40' 19" latitude S, e 882 m de altitude, foi coletado e analisado por CLAE-FR, como já descrito na metodologia.

Durante os estudos de doutoramento de Carrão-Panizzi (1996), a pesquisadora pode observar que os resultados da análise individual para o total de isoflavonas (daidzina, malonil-daidzina, genistina e malonil-genistina), mostraram que o efeito do local de semeadura foi significativo para os cultivares IAS-5, FT-Abyara e BR-4, analisados naquele estudo.

Nas Tabelas 8, 10 e 11, podem ser observados os teores de isoflavonas extraídas de diferentes cultivares de soja. Estes cultivares foram obtidos junto ao Instituto Agronômico de Campinas (IAC), cujos cultivares recebem a codificação de IAC seguido do número de ordem, e outros cultivares foram obtidos junto à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa-CNPSo), cujos cultivares receberam as codificações de Emb (Embrapa) e BRS, seguido do número de ordem. Da mesma forma, os cultivares ICA do CEFET/PR estão seguidos de um número de ordem que correspondem ao sistema de plantio no qual o cultivar de soja foi desenvolvido (Tabela 10). Para a "soja orgânica" o cultivar analisado foi o BR-36, fornecido pela Embrapa, Unidade de Pesquisa de Londrina (Figura 28).

Tabela 8: Teores de isoflavonas de diferentes cultivares de soja brasileira[a].

Cultivares[b]	Daidzina	Glicitina	Genistina	Mal. Daid.	Mal. Glic.	Mal. Gen.	Daidzeína	Gliciteína	Genisteína	Total (μg/g)
BRS184	783,56	91,43	685,56	452,72	47,12	391,38	22,71	0,00	20,45	2494,93
BRS183	720,18	77,21	874,78	481,17	32,58	571,97	13,46	0,00	20,08	2791,43
BRS181	850,52	92,73	593,44	531,27	55,68	395,89	14,68	0,00	13,24	2547,45
BRS157	715,07	89,34	429,18	553,46	57,76	360,50	15,14	0,00	10,38	2230,83
BRS156	845,62	192,29	596,16	739,26	123,45	562,00	14,19	0,00	13,30	3086,27
BRS155	277,54	149,00	262,95	125,19	38,17	117,54	11,91	0,00	17,81	1000,11
BRS154	444,73	68,77	451,08	390,11	52,33	411,79	7,29	0,00	9,78	1835,88
BRS153	317,14	135,85	478,36	299,55	85,91	435,87	7,08	0,00	15,66	1775,42
BRS136	768,32	141,18	642,33	448,20	62,21	375,53	12,60	0,00	11,53	2461,90
BRS135	435,85	116,32	364,10	262,94	57,95	225,79	7,50	0,00	8,49	1478,94
BRS134	557,55	131,36	446,75	372,07	70,06	303,43	12,62	0,00	10,60	1904,44
BRS133	859,99	117,41	649,36	452,52	49,89	361,09	10,32	0,00	9,36	2509,94
BRS132	480,14	134,84	458,29	305,81	57,13	312,69	10,62	0,00	10,17	1769,69
Emb62	829,25	168,59	629,76	545,61	78,10	437,50	23,36	0,00	21,17	2733,34
Emb61	615,54	116,01	528,08	292,67	44,37	261,56	12,75	0,00	12,78	1883,76
Emb59	739,08	158,43	450,62	717,84	109,48	480,85	15,67	0,00	11,63	2683,60
Emb58	409,95	84,82	428,13	255,08	39,27	271,21	41,91	0,00	54,46	1584,83
Emb48	680,67	147,83	535,94	337,68	53,97	279,84	13,83	0,00	13,67	2063,43
Emb47	535,59	108,37	508,04	288,45	47,08	271,19	24,22	0,00	26,11	1809,05

Emb46	598,91	100,53	483,12	446,73	62,88	382,76	17,47	0,00	17,45	2109,85
IAC 8	660,07	89,63	508,78	487,75	49,99	415,88	28,30	7,91	24,51	2272,82
IAC 8-1	650,82	66,14	598,92	416,84	34,65	405,22	20,96	7,09	18,14	2218,78
IAC 8-2	664,02	81,49	554,01	469,13	51,73	443,56	44,39	14,47	38,46	2361,26
IAC 15	312,89	91,03	407,34	259,14	56,21	345,31	11,86	0,00	17,82	1501,60
IAC 15-1	368,15	139,10	516,95	268,74	72,58	374,02	5,79	0,00	10,39	1755,72
IAC 15-2	298,17	125,31	331,69	284,58	79,16	328,79	7,99	0,00	10,61	1466,30
IAC 17	354,65	64,49	311,97	330,50	44,51	314,60	17,72	0,00	14,28	1452,72
IAC 18	480,33	87,79	444,91	369,64	57,79	368,10	13,30	0,00	14,24	1836,10
IAC 19	520,53	87,77	533,24	405,16	51,92	474,97	33,44	0,00	35,77	2142,80
IAC 20	403,82	76,11	281,00	286,73	41,53	216,97	95,98	11,21	64,11	1477,46
IAC 22	470,68	95,70	368,64	393,00	60,90	336,38	13,02	0,00	11,44	1749,76
IAC 31MN	360,10	125,60	325,40	29,10	0,00	26,93	0,00	0,00	52,64	919,77
IAC PRMN	794,20	203,90	629,20	64,35	14,11	61,72	111,32	0,00	116,99	1995,80
IAC Fos31	270,26	59,77	343,28	176,42	29,42	224,30	9,36	4,07	14,72	1131,60

[a]Os valores representam a média de duas repetições. [b]As abreviações **Fos** e **Emb** representam os cultivares Foscarin e Embrapa, respectivamente.

Fato marcante a ser observado é o baixo teor, senão inexistência, de gliciteína nos cultivares de soja brasileiros analisados neste trabalho. A presença desta isoflavona foi observada apenas em alguns cultivares provenientes do IAC,

em especial, os cultivares IAC 20 e IAC 18-2, que apresentaram os maiores teores, e com um teor reduzido, os cultivares IAC Foscarin-31, IAC 8 e IAC 8-1.

O conteúdo total de isoflavonas nos cultivares foi elevado, considerando as exigências mercadológicas, que preferem cultivares de soja com teores de cerca de 3,0 mg/g de soja. Os teores totais foram sempre superiores a 1,0 mg/g, e com uma variação de aproximadamente 1,0 a 3,1 mg de isoflavonas totais por grama de farinha desengordurada de soja. Pode-se observar, no entanto, uma grande variação dos teores de isoflavonas totais conforme o cultivar analisado. De acordo com Genovese e Lajolo (2001b) e Carrão-Panizzi e Bordingnon (2000), os teores de isoflavonas em soja são influenciados por aspectos genéticos do cultivar, ou ainda, às condições climáticas e de solo durante o plantio.

Em relação ao conteúdo de sólidos solúveis na fração hexânica, extraídos durante o desengorduramento das farinhas de soja daqueles cultivares estudados, pôde-se observar grande variação nos valores de porcentagens obtidos após 30 min a 25ºC, empregando uma proporção de 1:10 (p/v) de farinha de soja para hexano puro. Considerando as condições de desengorduramento dos cultivares de soja, definidas para este estudo, a Tabela 9 apresenta as porcentagens de sólidos solúveis encontradas para diferentes cultivares de soja.

Tabela 9: Porcentagem de sólidos solúveis na fração hexânica durante o desengorduramento das farinhas de soja[a].

Cultivar	**% de sólidos**	**Cultivar**	**% de sólidos**
IAC 8	15,3	Embrapa 62	7,1

IAC 8-1	9,0	Embrapa 61	10,5
IAC 8-2	2,6	Embrapa 59	13,1
IAC 15	13,6	Embrapa 58	10,5
IAC 15-1	10,3	Embrapa 48	10,1
IAC 15-2	12,6	Embrapa 47	12,7
IAC 17	8,7	Embrapa 46	14,3
IAC 18	1,8	BRS 183	10,4
IAC 19	3,6	BRS 133	13,8
IAC 20	13,6	BRS 154	15,4
IAC 22	13,4	BRS 184	14,3
IAC Fos-31	16,4	BRS 155	9,9
BRS 136	11,7	BRS 134	10,4
BRS 156	9,9	BRS 135	11,3
BRS 153	12,7	BRS 157	12,4

[a]Os valores representam a média de três repetições.

Tabela 10: Teores de isoflavonas de cultivares de soja paranaense[a].

Isoflavonas (μg/g)	ICA-SC1	ICA-3	ICA-4	ICA-987	ICA-95302
Daidzina	152,30	91,80	129,94	193,27	91,24
Glicitina	0,00	86,96	75,90	55,22	15,76
Genistina	112,76	89,97	160,01	164,16	92,43
Malonil-daidzina	170,99	95,06	178,62	231,28	152,73
Malonil-glicitina	35,43	62,48	58,18	34,66	16,24
Malonil-genistina	130,49	118,32	214,72	207,16	155,06
Daidzeína	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Gliciteína	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Genisteína	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

[a]Os valores representam a média de duas repetições da medida das isoflavonas, expresssas em microgramas de isoflavonas por grama de soja.

O conteúdo de isoflavonas também foi avaliado em cultivares de soja provenientes de Pato Branco/PR (26º11'00" latitude S, 52º36'00" longitude W e 760 m de altitude), os quais foram identificados com o código ICA seguido de número de série. Na Tabela 10 foram expressos os teores de isoflavonas extraídas em solução 80% de metanol dos cultivares ICA-SC1, ICA-3, ICA-4, ICA-987 e ICA-95302.

Em todos os cultivares ICA foi notada a ausência completa de qualquer forma de isoflavonas agliconas (daidzeína, gliciteína e genisteína). Como a maioria dos cultivares de soja analisados, os cultivares ICA apresentaram um maior teor das formas malonil-conjugadas, principalmente malonil-daidzina e malonil-genistina.

De caráter ilustrativo foi analisado o teor de isoflavonas em cultivar de soja BR-36, produzido em cultura orgânica na cidade de Capanema/PR. A produção de culturas orgânicas é o resultado de um sistema de produção agrícola que busca manejar de forma equilibrada o solo e demais recursos naturais (água, plantas, animais e insetos), conservando-os em longo prazo e mantendo a harmonia desses elementos entre si e com os seres humanos. O solo é importante porque fornece nutrientes e suporte às plantas, e é como um "organismo vivo e complexo", que ao interagir com outros elementos como o ar, a água e a matéria orgânica, proporciona às culturas além de uma nutrição balanceada, o reforço às suas defesas naturais contra doenças e ataques de insetos. O intuito deste projeto foi avaliar se as condições geradas pelo sistema orgânico alterariam negativamente no

conteúdo de isoflavonas na soja produzida neste sistema. Na Tabela 11 os teores de isoflavonas encontrados para o cultivar BR-36 são listados, e percebe-se que não houve inibição da produção destes flavonóides pela mudança do sistema de plantio. A concentração de isoflavonas totais extraídas foi cerca de 674,6 μg por grama de farinha desengordurada de soja. A Figura 28 ilustra o perfil cromatográfico do extrato metanólico do cultivar BR-36.

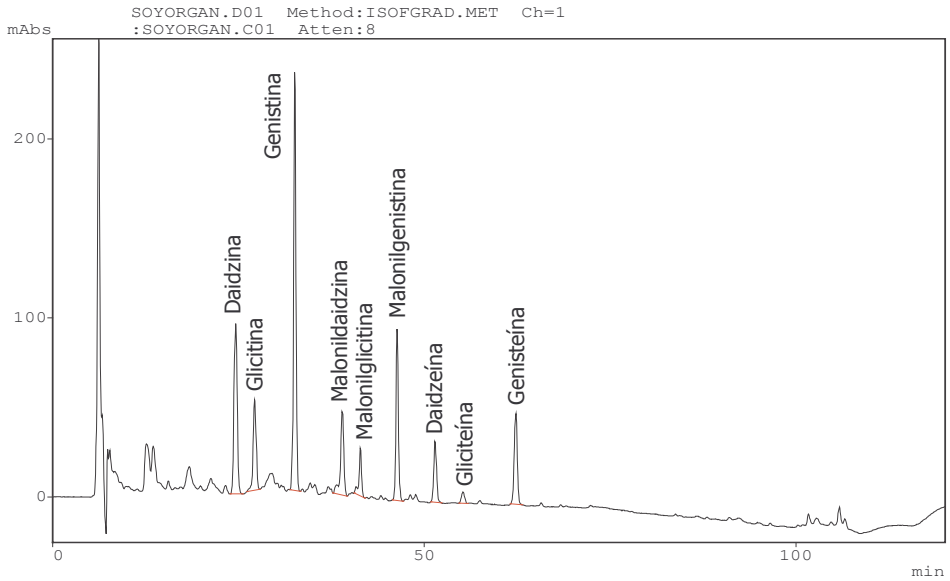


Figura 28: Cromatograma do extrato metanólico do cultivar BR-36 produzido em cultivo orgânico em Capanema/PR.

Tabela 11: Teores de isoflavonas de cultivar de soja orgânica paranaense[a].

Isoflavonas	**Concentração (μg/g)**
Daidzina	141,8
Glicitina	76,2
Genistina	197,0
Malonil-daidzina	58,0
Malonil-glicitina	30,0
Malonil-genistina	69,7
Daidzeína	35,6
Gliciteína	7,8
Genisteína	58,5

[a]Os valores representam a média de duas repetições da medida das isoflavonas, expresssas em microgramas de isoflavonas por grama de soja.

De acordo com Kudou et al. (1991b), em grãos de soja, isoflavonas ocorrem principalmente na forma de malonatos. No entanto, cada grão de soja é composto por diferentes partes, as quais são ilustradas na Figura 29. Destes componentes, o cotilédone constitui cerca de 90% da massa total do grão de soja, enquanto o hipocotilédone, compreende de 2-3% do total da semente e, por fim a casca representaria cerca de 6% da massa total do grão de soja (Tsukamoto et al., 2001).

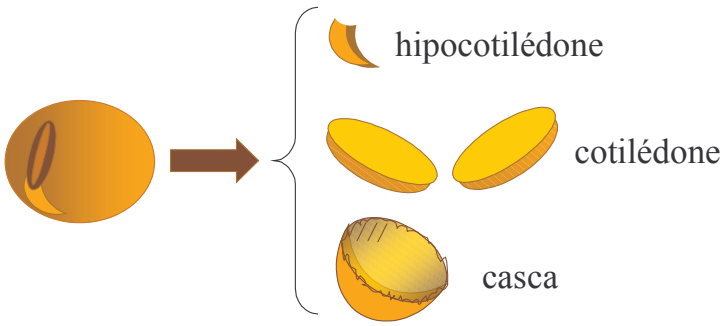


Figura 29: Componentes do grão de soja.

Neste estudo, os diferentes cultivares de soja brasileira apresentaram uma porcentagem de 7,5% de casca, em média, em relação à massa total do grão de soja. Outras frações como hipocotilédone e cotilédone compreenderam 3,5 e 89% do grão de soja, respectivamente.

Muitos trabalhos reportam que o conteúdo de isoflavonas no hipocotilédone (gliciteína em menor quantidade) é de 2 a 10 vezes maior que no cotilédone. Gliciteína e glicitina, em geral, não são detectadas no cotilédone, sendo somente detectadas no hipocotilédone (Tsukamoto et al., 2001). Neste trabalho, foram analisados os conteúdos de isoflavonas presentes em cada componente do grão de soja, os quais foram separados manualmente, e os valores das concentrações de isoflavonas foram expressos em microgramas de isoflavona por grama do componente separado (Tabela 12). Na Figura 30 são apresentados os cromatogramas dos extratos metanólicos de cada fragmento de soja.

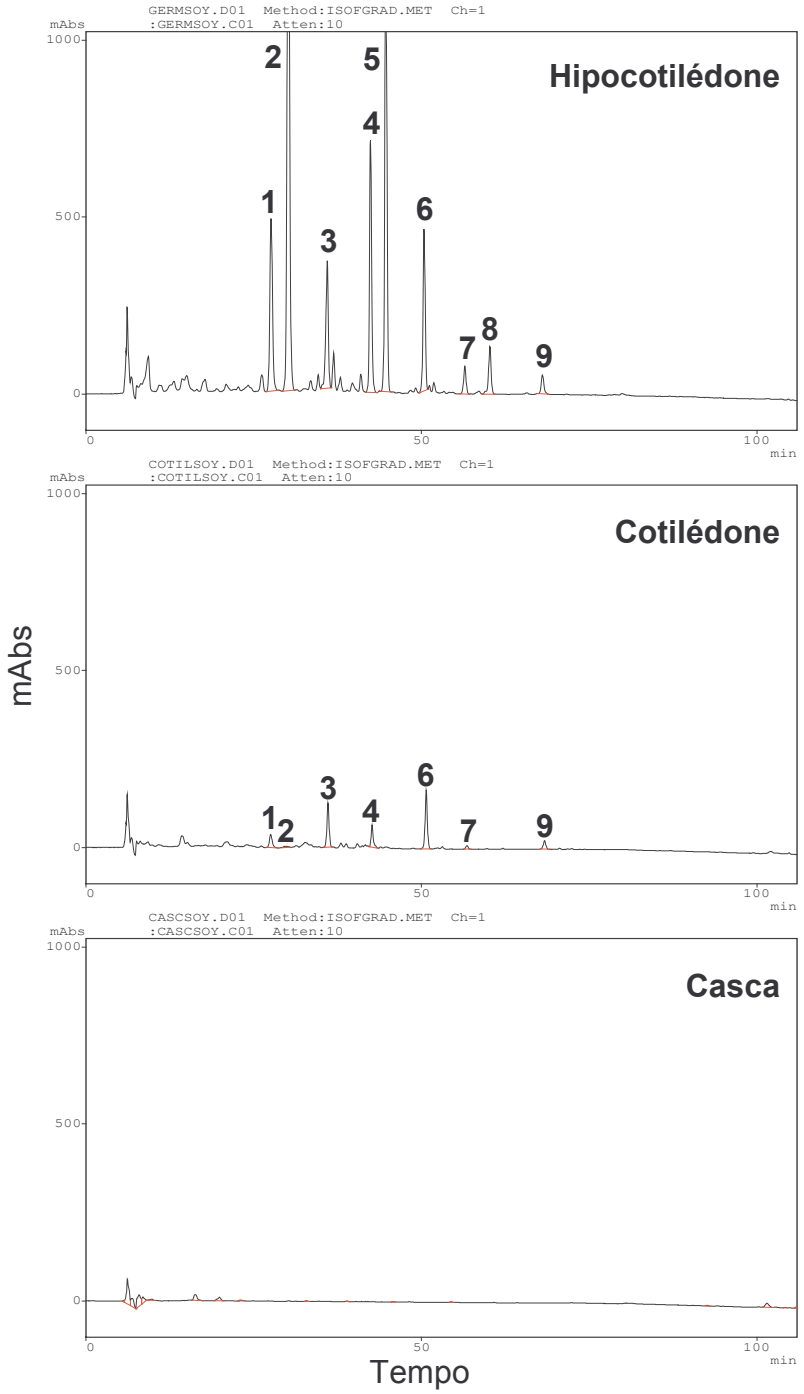


Figura 30: Perfis cromatográficos dos extratos metanólicos dos fragmentos de soja.

Isoflavonas: **1**: daidzina; **2**: glicitina; **3**: genistina; **4**: malonil-daidzina; **5**: malonil-glicitina e **6**: malonil-genistina.

Tabela 12: Conteúdos de isoflavonas no hipocotilédone, cotilédone e casca de soja brasileira[a].

Fragmentos	glicosiladas			malonatos			agliconas			
	daidzina	glicitina	genistina	daidzina	glicitina	genistina	daidzeína	gliciteína	genisteína	Total
Hipocotilédone	706,4	2060,2	351,0	668,1	1455,7	320,3	82,6	149,5	63,4	5857,2
Cotilédone	56,0	6,6	106,8	60,0	0,0	119,6	9,3	0,0	25,8	384,1
Casca	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

[a] Valores foram expressos em microgramas de isoflavonas por grama de cada fragmento, como a média das análises em duplicata.

Pelos resultados apresentados, pode-se notar que a grande maioria das isoflavonas se concentra no hipocotilédone do grão de soja, com cerca de 5,9 mg/g de hipocotilédone, enquanto a concentração de isoflavonas totais no cotilédone alcançou aproximadamente 0,4 mg/g de cotilédone (b.s.). Tsukamoto et al. (2001) relataram que o conteúdo total de isoflavonas no hipocotilédone é calculado em mais de 2000 mg por 100 g de grãos de soja, o que vem corroborar com os valores obtidos. Os autores da pesquisa reportam ainda que as isoflavonas encontradas no cotilédone são principalmente daidzina, malonato de daidzina, genistina, malonato de genistina e genisteína.

De maneira geral, os cultivares de soja cultivados no Brasil apresentam quantidades consideráveis de isoflavonas totais, muito embora, ainda sejam

necessários maiores estudos para aumentar estas quantidades. Porém, não somente os cultivares de soja contêm estas isoflavonas em quantidades suficientes para atingir um benefício à saúde humana, mas diferentes produtos derivados da soja contêm quantidades variáveis de isoflavonas. Produtos como os extratos hidrosolúveis e proteínas texturizadas de soja, foram analisados neste estudo e os resultados são apresentados nas Tabelas 13 e 14.

Tabela 13: Conteúdos de isoflavonas nas etapas de produção de extrato hidrosolúvel de soja[a].

Isoflavonas	Etapas do processo (μg/g)[b]		
	Soja descascada	Extrato de soja	Resíduo (Okara)
Umidade (%)	0,0	92,6	79,2
Daidzina	209,5	337,4	353,0
Glicitina	0,0	63,5	145,1
Genistina	467,6	600,0	330,4
Malonil-daidzina	134,1	160,9	100,2
Malonil-glicitina	0,0	33,7	35,6
Malonil-genistina	252,2	278,5	93,7
Daidzeína	34,1	39,7	0,0
Gliciteína	0,0	0,0	0,0
Genisteína	80,3	81,3	76,9

[a]Os extratos de soja são normalmente designados como "leite de soja". [b]Os valores representam a média da duplicata de microgramas de isoflavonas por grama de cada produto.

Tabela 14: Conteúdos de isoflavonas nas etapas de produção de tofu[a].

Isoflavonas	Etapas do processo (μg/g)[b]				
	Soja intacta	Extrato de soja	Tofu	Soro de tofu	Resíduo (Okara)
Umidade (%)	0,0	88,9	81,2	97,1	77,0
Daidzina	174,9	175,4	123,2	370,5	49,4
Glicitina	66,3	141,4	110,7	294,0	46,2
Genistina	309,4	252,0	196,4	288,0	89,3
Malonil-daidzina	169,0	170,7	101,1	241,0	37,8
Malonil-glicitina	41,8	103,3	57,0	187,5	20,6
Malonil-genistina	249,7	254,1	155,4	243,8	66,7
Daidzeína	13,8	50,7	54,6	0,0	25,9
Gliciteína	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Genisteína	35,6	111,1	117,1	0,0	63,8

[a]Os extratos de soja são normalmente designados como "leite de soja" e o tofu por "queijo de soja".
[b]Os valores representam a média da duplicata de microgramas de isoflavonas por grama de cada produto.

Na Figura 31, são esquematizados os fluxogramas convencionais de produção do extrato de soja e tofu, os quais foram tomados como base para a produção destes dois produtos à base de soja. Os processos de produção foram acompanhados em uma indústria paulista de produtos à base de soja, e de diferentes etapas (como indicado na Tabela 13 e 14) foram coletadas amostras para análise do conteúdo de isoflavonas, tanto na matéria-prima, produto e sub-produtos ou resíduos.

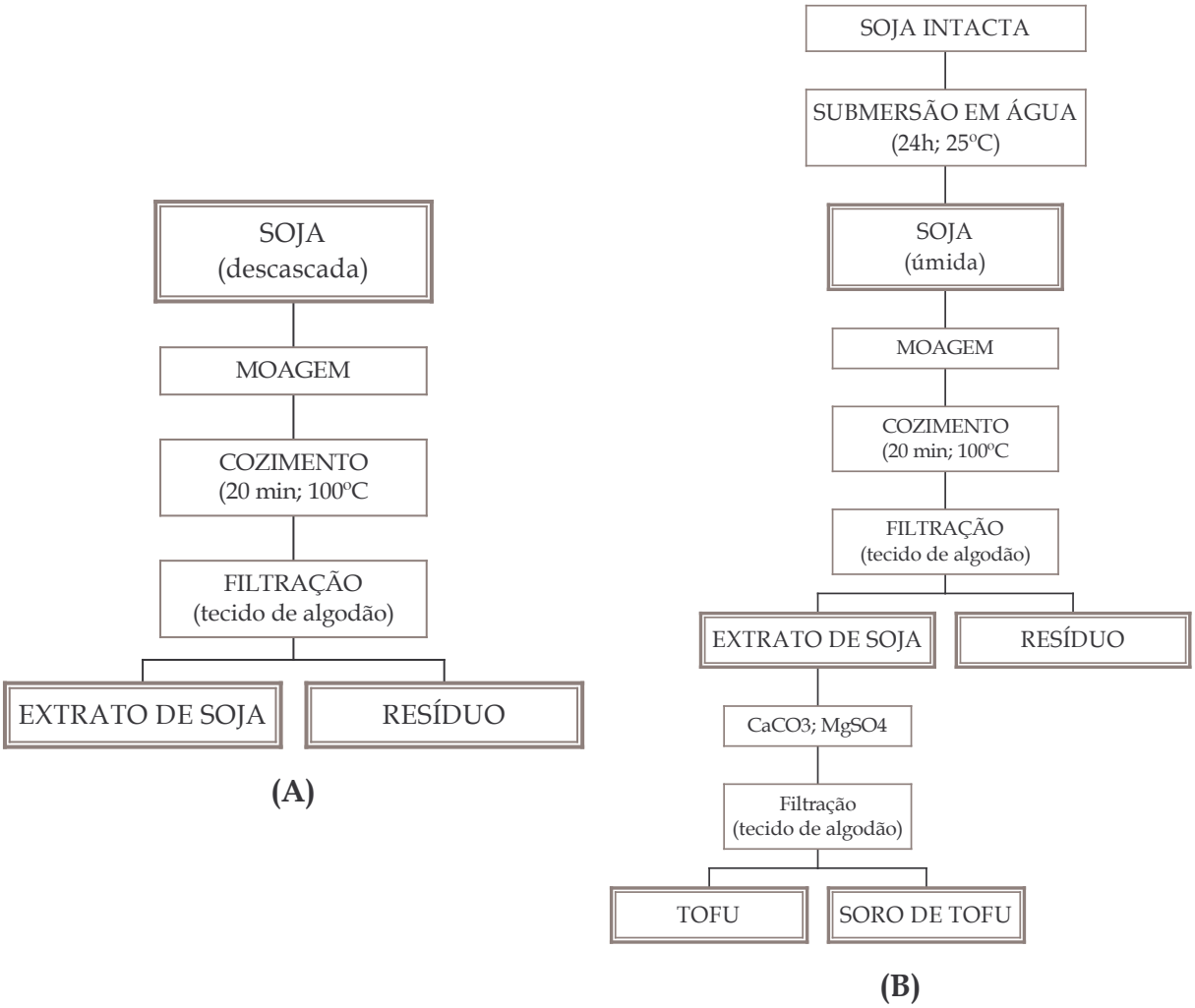


Figura 31: Organograma de produção de extrato de soja (A) e de tofu (B) a partir de grãos de soja.

A quantidade de isoflavonas que é descartada nas tortas residuais representa cerca de 1214 μg/g (b.s.), para o extrato de soja e 477 μg/g (b.s.), para o tofu. A produção do tofu gera dois grandes sub-produtos, a torta residual e o sobrenadante separado na precipitação das proteínas que formam o tofu. Neste sobrenadante foram encontrados teores de isoflavonas da ordem de 1722 μg/g, o que acumula uma perda de 2199 μg de isoflavonas totais por g do soro de tofu. O aproveitamento destas quantidades de isoflavonas é praticamente nulo, na indústria brasileira. Cabe ainda ressaltar que em muitos casos o aproveitamento das isoflavonas destes materiais não requer grandes investimentos. Estas perdas são grandes se forem comparadas com os teores que se mantêm nos produtos finais, 1688 μg/g (extrato de soja) e 997 μg/g (tofu).

Paralelamente, foram analisadas amostras de extratos solúveis de sojas comerciais (líquido) de grande circulação no mercado nacional. As análises cromatográficas mostraram um reduzido conteúdo de isoflavonas presentes nas amostras. O produto "A" continha 65,1, 26,2, 81,9 e 2,1 μg/g de daidzina, glicitina, genistina e malonil-genistina, respectivamente.

Quanto aos extratos solúveis de soja em pó, a composição foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência e os valores obtidos apresentados na Tabela 15. O produto "B" apresentou um conteúdo total de isoflavonas maior que o produto "A", no entanto, no que se refere ao teor de isoflavonas agliconas ambos produtos apresentaram concentrações menores que para outras formas isoméricas.

Tabela 15: Composição de isoflavonas presentes em extratos solúveis de soja[a].

Isoflavonas	Extratos solúveis de soja (μg/g)[b]	
	Marca "A"	Marca "B"
Daidzina	2679,8	2749,1
Glicitina	456,6	1625,3
Genistina	0,49	0,56
Malonil-daidzina	1851,7	2140,4
Malonil-glicitina	178,1	1079,7
Malonil-genistina	2193,2	3192,1
Daidzeína	304,1	142,6
Gliciteína	0,0	0,0
Genisteína	446,1	224,7

[a]Os nomes das marcas de extratos solúveis de soja foram preservados por solicitação dos fabricantes, sendo estes extratos obtidos na forma em pó, os quais foram reconstituídos com água destilada (1:10, p/v). [b]Os valores representam a média da duplicata de microgramas de isoflavonas por grama de cada fragmento.

Os suplementos de isoflavonas têm sido amplamente comercializados, principalmente para terapias de reposição hormonal, e neste trabalho foram analisadas três marcas sendo, uma de fabricação americana, uma canadense e uma brasileira. As isoflavonas encontradas foram basicamente do grupo das glicosiladas, nas amostras americana e brasileira, enquanto a amostra canadense apresentou grande concentração de isoflavonas agliconas, as quais apresentam atividades biológicas superiores às glicosiladas (estas observações serão retomadas em outro item). Outro fato observado, para estas cápsulas de suplementos de isoflavonas, foi a incompatibilidade entre as informações no rótulo quanto ao conteúdo de isoflavonas e o conteúdo encontrado nas análises em CLAE-FR. Em

algumas amostras, os conteúdos sugeridos eram superiores aos encontrados na análise cromatográfica (Tabela 16).

Tabela 16: Conteúdo de isoflavonas em cápsulas comerciais de isoflavonas[a].

Isoflavonas	Produtos comerciais (μg/g)[b]		
	Americana	Brasileira	Canadense
Massa (mg/cápsula)[c]	309,0	549,0	468,0
Daidzina	757,3	205,7	17,1
Glicitina	71,5	265,8	0,0
Genistina	1943,6	59,8	36,7
Malonil-daidzina	0,0	0,0	0,0
Malonil-glicitina	0,0	0,0	0,0
Malonil-genistina	0,0	83,9	0,0
Daidzeína	38,6	0,0	3587,6
Gliciteína	0,0	0,0	0,0
Genisteína	40,7	0,0	5233,4

[a]Os produtos analisados foram: Canadense, Natural Factors (Everett, WA); Americana, Now-Extra Strength (Bloomingdale, IL). [b]Os valores representam a média da duplicata de microgramas de isoflavonas por grama de cada cápsula. [c]Foram feitas três medidas da massa de cada conteúdo das cápsulas e os valores representam a média destas medidas.

Inúmeros têm sido os "suplementos" lançados no mercado atualmente, com o próposito de exercer uma ação fitoestrogênica na terapia de reposição hormonal, e inúmeros são os cuidados que se deve tomar para a escolha do "suplemento" a ser adquirido pelo consumidor. A ANVISA alerta que os suplementos alimentares à base de isoflavonas de soja não são regulamentados no Brasil, sendo que a legislação brasileira de alimentos não permite as designações, "suplemento alimentar", "suplemento nutricional", "complemento alimentar" ou "complemento

nutricional". Os diversos produtos de isoflavonas comercializados como alimentos são irregulares, e nenhum desses produtos possui registro na área de alimentos e nenhuma alegação de conteúdo ("contém isoflavonas", "fonte de isoflavonas", "rico em isoflavonas", dentre outras), de função ou de saúde foi aprovada para as isoflavonas.

De forma complementar, foram feitos estudos sobre a presença de isoflavonas em outros cultivares de grãos e oleasinosas comestíveis do Brasil. Alguns dos grãos analisados foram coletados de mercados locais do Peru, os quais são de grande importância para a cultura culinária daquele País, por representarem importantes fontes de proteínas. A Tabela 17 apresenta os grãos e oleaginosas analisadas neste estudo, acompanhados dos nomes vulgar e científico correspondentes a cada granífera, bem como os teores de isoflavonas totais encontradas nas amostras.

Tabela 17: Conteúdos de isoflavonas em sementes e grãos comestíveis.

Amostras	Nome popular (português/inglês)	Nome científico	Isoflavonas (µg/g)
Grão-de-bico	Grão-de-bico/Chickpeas	*Cicer arientinum*	30,95 [a]
Ghandu	Feijão-guandu/Pigeonpeas	*Cajanus cajan*	0,00
Feijão-carioca	Feijão/Snapbean	*Phaseolus vulgaris*	0,00
Feijão-Fava	Feijão-branco/Babybutter lima bean	*Phaseolus lunatus*	0,00
Fava	Fava/Favabean	*Vicia faba*	0,00
Pallar	ND [b]/Giant Peruvian lima	*Phaseolus limensis*	0,00
Ervilha	Ervilha/English peas	*Pisum sativum*	0,00
Kiwicha	ND/ND [b]	*Amaranthus caudatus*	0,00
Kañiwa	ND/ND [b]	*Chenopodium pallidicaule*	0,00

[a]A concentração de isoflavonas obtida para grão-de-bico correspondem apenas à presença de genisteína. [b] ND, nomes não definidos.

Dos grãos comestíveis analisados, apenas as amostras de grão-de-bico (foram analisados três grupos de sementes) continham isoflavonas em quantidades detectáveis pela CLAE-FR, de acordo com a metodologia descrita para este trabalho. Uma concentração de 30,95 µg de genisteína por grama de farinha desengordurada de grão-de-bico foi encontrada, ao passo que as outras amostras não apresentaram qualquer presença de isoflavonas nos extratos alcóolicos das farinhas.

Outros vegetais como a alfafa, são fontes de isoflavonas. Por tal motivo, foram analisadas amostras de folhas e caules de alfafa coletadas na Fazenda Rio

das Pedras (Campinas/SP). Uma grande quantidade de compostos foi encontrada nas amostras (Figura 32), porém nenhum deles apresentou correspondência com os padrões de isoflavonas analisadas neste trabalho de pesquisa. As isoflavonas de alfafa têm apresentado um dos poucos efeitos adversos conhecidos, o qual se refere à infertilidade de ovelhas na Austrália (Vicent e Fitzpatrick, 2000; Stroheker et al., 2003). Formononetina é uma isoflavona metoxilada que tem sido associada aos estados de infertilidade de animais que se alimentam de vegetais ricos neste fitoestrógeno (Stroheker et al., 2003).

A composição de compostos químicos separados dos extratos alcoólicos de folhas de alfafa mostrou-se mais complexa, no entanto não foram identificadas quaisquer umas das isoflavonas referenciadas neste projeto. A análise dos espectros de absorção dos compostos presentes nas folhas foram similares à maioria dos compostos encontrados no extrato metanólico do caule de alfafa. A análise em espectrofotômetro na região UV-visível (200-600 nm), mostrou uma forte absorção na região de 270 nm, tanto para os extratos de folhas quanto de caule de alfafa (resultados não apresentados).

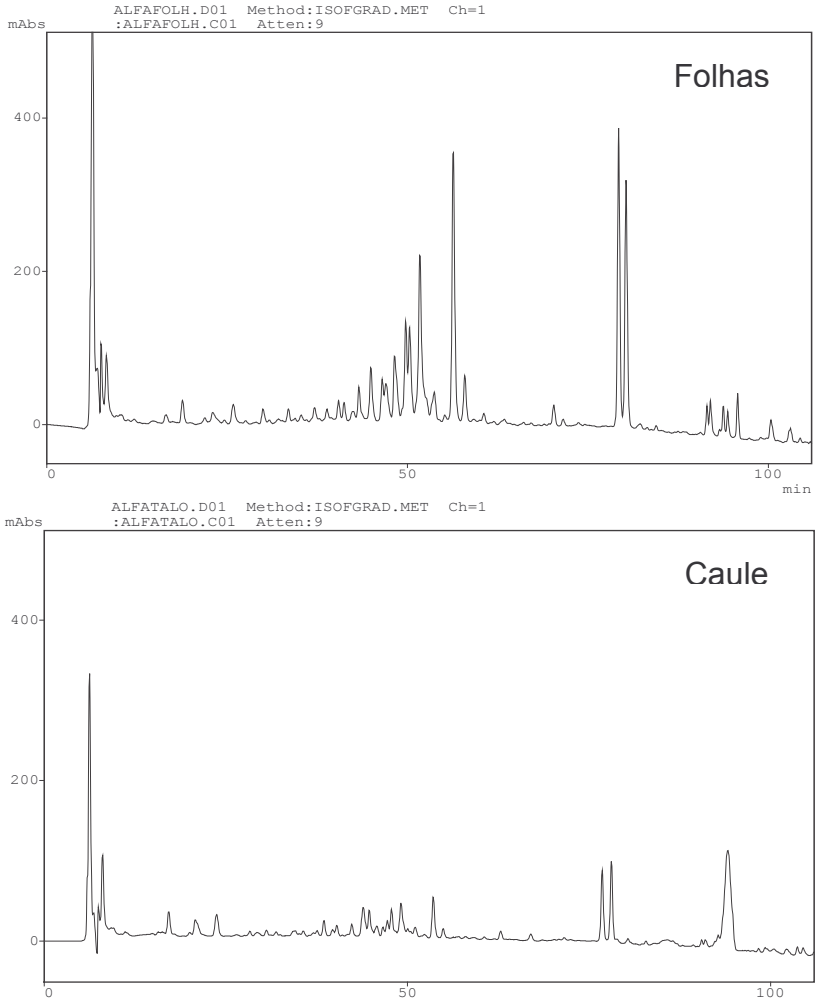


Figura 32: Perfis dos compostos separados dos extratos metanólicos de alfafa na cromatografia líquida de alta eficiência.

As isoflavonas, dado o perfil de uso e indicações terapêuticas, são consideradas como medicamentos, com obrigatoriedade de registro, não se enquadrando na legislação brasileira de alimentos. Por outro lado, os produtos alimentícios à base de soja, que naturalmente contêm isoflavonas podem ser analisados como alimentos. Ressalte-se que para ser considerado alimento o produto não deve apresentar alegações medicamentosas e ou terapêuticas que façam alusão à prevenção, tratamento e cura de doenças. Para os alimentos são permitidas apenas alegações, após avaliação e aprovação da ANVISA, quanto à possibilidade de ajudar a reduzir o risco de doenças, desde que associado a outros fatores, tendo em vista que o desenvolvimento de uma doença está relacionado a vários fatores e que o alimento sozinho não tem a ação de prevenir, tratar ou curar (ANVISA, 2002).

5.3 Efeito da Temperatura na Transformação de Isoflavonas Conjugadas

De acordo com Park et al. (2002a), a extração de isoflavonas de farinha desengordurada de soja, à temperatura ambiente, teve um maior conteúdo de malonil-daidzina e malonil-genistina, e menores teores de daidzina e genistina, no entanto, durante tratamento térmico, aproximadamente, a metade dos malonil conjugados foram transformados à glicosil-isoflavonas. O cultivar, IAC Foscarin-31, apresentou cerca de 1400 μg por grama de soja e outro cultivar, IAC 15-1, apresentou cerca de 300 μg por grama de soja.

Os teores de isoflavonas presentes nos extratos metanólicos de soja tiveram mudanças após tratamento térmico a 100ºC e 121ºC, seguido de extração a temperatura ambiente com solução 80% de metanol. Na Tabela 18, são apresentados os teores de isoflavonas representativos dos extratos de isoflavonas após tratamento térmico às temperaturas de 26ºC e 121ºC.

Tabela 18: Conteúdo de isoflavonas de farinhas de soja tratadas por aquecimento.

Isoflavonas (µg/g)	Cultivares									
	IAC 15-1		IAC 15-2		IAC 20		IAC 22		IAC Foscarin-31	
	26ºC	121º C	26ºC	121º C	26ºC	121º C	26ºC	121º C	26ºC	121ºC
Daidzina	265,8	620,0	201,9	504,1	307,9	749,4	322,7	700,8	118,4	290,7
Glicitina	76,9	130,4	42,2	79,6	44,6	81,8	17,9	35,1	16,1	32,4
Genistina	448,5	1286,2	334,9	977,5	270,3	756,3	321,0	826,0	245,0	652,3
Malonil-daidzina	812,1	69,9	731,0	58,3	789,0	63,0	451,5	57,6	355,4	25,4
Malonil-glicitina	153,5	2,0	105,7	0,0	76,8	0,0	46,2	0,0	43,4	0,0
Malonil-genistina	1235,8	110,4	1074,5	50,5	715,2	56,6	786,6	69,1	607,7	61,4
Daidzeína	5,4	35,7	8,0	34,8	18,3	57,1	7,6	59,3	5,1	27,9
Gliciteína	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Genisteína	9,7	60,4	12,0	54,5	22,2	50,6	11,0	54,8	13,9	52,4

Total	*3007,7*	*2315,0*	*2510,2*	*1759,3*	*2244,3*	*1814,8*	*1964,5*	*1802,7*	*1405,0*	*1142,3*

Os dados representam microgramas de isoflavonas por grama de farinha desengordurada de soja. O tratamento térmico da suspensão aquosa de farinha desengordurada de soja (1:2, p/v) foi feito a 121ºC por 40 minutos.

Pelos valores apresentados na Tabela 18 pode-se observar que os cultivares estudados não continham gliciteína em sua composição de isoflavonas, muito embora, na Tabela 8, os cultivares que continham gliciteína fossem provenientes do Instituto Agronômico de Campinas. Neste caso, pode-se explicar o fato de nenhum dos cultivares de soja IAC apresentar gliciteína, ao fato de que após tratamento térmico a 121ºC por 40 minutos, o conteúdo de gliciteína tenha sido degradado, visto que esta isoflavona apresenta uma grande instabilidade térmica, dificultando assim a expansão de sua comercialização na forma de padrão de referência em procedimentos analíticos. Atualmente, poucas empresas dispõem deste composto para venda e com grau de pureza desejável como um padrão de referência. A mesma instabilidade é apresentada por outras formas conjugadas de gliciteína, como malonil-glicitina, como pode ser visto na Tabela 18, cujos conteúdos de suas formas malonilconjugadas apresentaram forte redução.

De uma maneira geral, os conteúdos de malonilconjugados de isoflavonas de soja, foram convertidos após tratamento térmico a formas glicosiladas, como daidzina, glicitina e genistina. Esta conversão térmica dos malonilconjugados de isoflavonas de soja foi observada recentemente por Park et al. (2002a), muito

embora seja um fato bem estabelecido na literatura científica, como descrito por Kudou et al. (1991b) e Coward et al. (1993).

Foi possível a identificação das formas malonil-isoflavonas por comparação com padrões de isoflavonas, pois segundo Kudou et al. (1991b), os valores de absortividade de malonilconjugados são semelhantes àqueles de daidzina, glicitina e genistina, sendo possível a análise quantitativa destas formas isoméricas a partir dos conjugados glicosilados. Barnes et al. (1994) e Coward et al. (1998) utilizaram os valores de absortividade de malonil-isoflavonas para identificar estes compostos em seus estudos. Outros estudos mostraram a possibilidade de se purificar as formas malonil-glicosídios (Wang e Murphy, 1994; Aussenac et al., 1998), mas estas são decompostas à glicosil-isoflavonas após cerca de cinco dias, devido às suas baixas estabilidades térmicas. Daidzeína, daidzina, genisteína, genistina, glicitina e gliciteína foram analisadas por comparação com padrões autênticos, como descrito por Coward et al. (1993) e Coward et al. (1998). As concentrações dos malonilconjugados foram calculadas a partir de curvas padrões de seus β-glicosídios correspondentes, de acordo com Kudou et al. (1991a) e Song et al. (1998).

De acordo com estudos prévios (Coward et al., 1993), solução 80% de metanol mostrou ser um ótimo solvente para extração de isoflavonas conjugadas e não-conjugadas. Kudou et al. (1991a) reportaram que malonil-isoflavonas são as formas encontradas em maior quantidade em grãos de soja e que são termolábeis, sendo convertidos à suas correspondentes glicosil-isoflavonas. Barnes (1995)

reportou que a extração of isoflavonas de produtos de soja com solução 80% de metanol à temperatura ambiente foi eficiente tanto quanto à 60-80ºC e que a extração à temperaturas elevadas causa alterações na composição das isoflavonas. Portanto, foi utilizada neste trabalho solução 80% de metanol à temperatura ambiente para a extração de isoflavonas.

Foram observados diferentes teores de isoflavonas para cada cultivar analisado, como foi observado anteriormente por Carrão-Panizzi et al. (1999), quando analisaram diferentes cultivares de soja cultivados no Brasil em diferentes localizações geográficas. O cultivar IAC Foscarin-31, dentre os cultivares analisados, foi o que apresentou o menor teor de isoflavonas totais (1405 μg/g), enquanto que os cultivares IAC 15-1 e IAC 15-2 apresentaram os maiores teores de isoflavonas totais (3007,7 e 2510,2 μg/g, respectivamente), em microgramas de isoflavonas por grama de farinha desengordurada de soja. Os teores de glicitina foram baixos tanto à temperatura ambiente quanto após aquecimento. Após tratamento térmico, malonil-isoflavonas (malonil-daidzina e malonil-genistina) foram convertidas à glicosil-isoflavonas, sendo que a maior conversão foi percebida no cultivar IAC 15-1, do qual foi extraído grande concentração das formas glicosiladas.

Em todos os cultivares, a extração após aquecimento, promoveu um aumento nos teores de glicosil-isoflavonas quando comparadas àquelas obtidas de extrações à temperatura ambiente. Foi observado que os teores de glicosil-isoflavonas aumentaram cerca de 2,5 vezes, em média, após aquecimento. Segundo

Coward et al. (1993) na forma de malonil-β-glicosil isoflavonas, as isoflavonas são instáveis e sensíveis ao aquecimento, decompondo-se com facilidade à forma glicosilada.

Em geral, os teores de flavonóides em alimentos processados são 50% menores que naqueles alimentos frescos (Andlauer e Fürst, 1998) e, de acordo com Arditi et al. (2000), nem todos alimentos de soja contêm isoflavonas, porque estes compostos são prontamente removidos na extração alcoólica, por exemplo, nos processos de produção de proteínas concentradas por via etanólica. Aguiar et al. (2001) observaram significativas perdas de isoflavonas em processos de alimentos a base de soja. Durante a produção de extrato hidrosolúvel de soja, cerca de 55 μg/g de isoflavonas são perdidos na torta residual formada no processamento. De acordo com Simonne et al. (2000), a porcentagem média de retenção das isoflavonas totais em soja imaturas foi de 46% (ebulição) e 53% (resfriamento).

Nas amostras analisadas o tratamento térmico promoveu um aumento na concentração de glicosil-isoflavonas, mas este fato foi mais acentuado no tratamento a 121ºC para todos os tempos de incubação e a 100ºC por 60 minutos (Tabela 19, Figura 33 e Figura 34).

Tabela 19: Conteúdos de isoflavonas em farinhas de soja tratadas por aquecimento (μg/g)[a].

Isoflavonas	100ºC			121ºC		
	20 min	40 min	60 min	20 min	40 min	60 min

Daidzina	910,1±5,1^{A}	804,2±9,6^{B}	757,9±6,6^{C}	1017,4±17,7^{A}	870,1±9,2^{B}	737,9±11,2^{C}
Glicitina	102,5±2,5^{A}	89,0±3,0^{B}	78,4±1,5^{C}	102,2±1,0^{A}	87,9±0,9^{B}	78,3±0,5^{C}
Genistina	880,0±2,0^{A}	799,2±4,6^{B}	764,8±8,1^{C}	978,5±6,1^{A}	712,6±6,6^{B}	701,8±3,6^{C}
Malonil-daidzina	75,7±0,4^{A}	54,5±1,5^{B}	41,7±2,0^{C}	6,1±0,3	0,0	0,0
Malonil-glicitina	7,3±0,3^{A}	4,9±0,2^{B}	4,1±0,9^{B}	0,0	0,0	0,0
Malonil-genistina	81,5±0,3^{A}	59,0±0,5^{B}	46,4±1,2^{C}	6,2±0,2	0,0	0,0
Daidzeína	233,5±3,5^{A}	210,7±2,5^{B}	197,4±2,5^{C}	134,3±5,6^{A}	221,2±2,6^{B}	274,3±4,1^{C}
Gliciteína	23,3±0,3^{B}	24,6±0,7^{A}	24,5±1,7^{A}	61,5±0,5^{A}	60,8±0,9^{A}	55,2±1,5^{B}
Genisteína	234,1±3,1^{A}	208,8±3,5^{B}	198,2±2,5^{C}	127,3±2,5^{A}	272,5±3,0^{B}	295,2±3,0^{C}
Total	*2548,0*	*2254,1*	*2111,5*	*2433,4*	*2224,2*	*2142,8*

[a]Considerando que cada linha foi analisada independentemente, os números com as mesmas letras não foram significativamente diferentes pelo teste de Tukey (p<0,05; n=3).

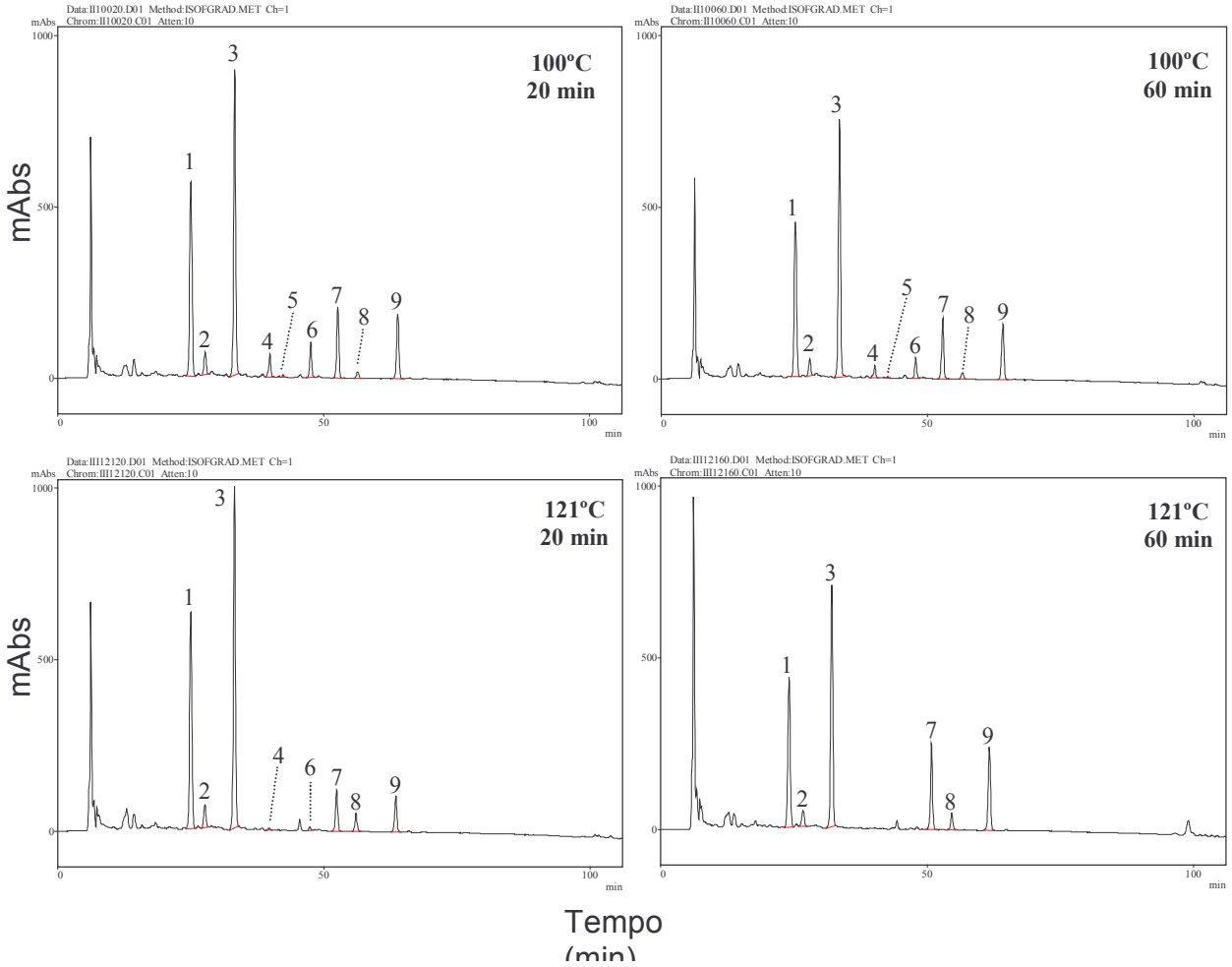


Figura 33: Perfis cromatográficos das formas isoméricas de isoflavonas tratadas por aquecimento. 1. Daidzina, 2. Glicitina, 3. Genistina, 4. 6"-O-malonildaidzina, 5. 6"-O-malonilglicitina, 6. 6"-O-malonilgenistina, 7. Daidzeína, 8. Gliciteína, e 9. Genisteína.

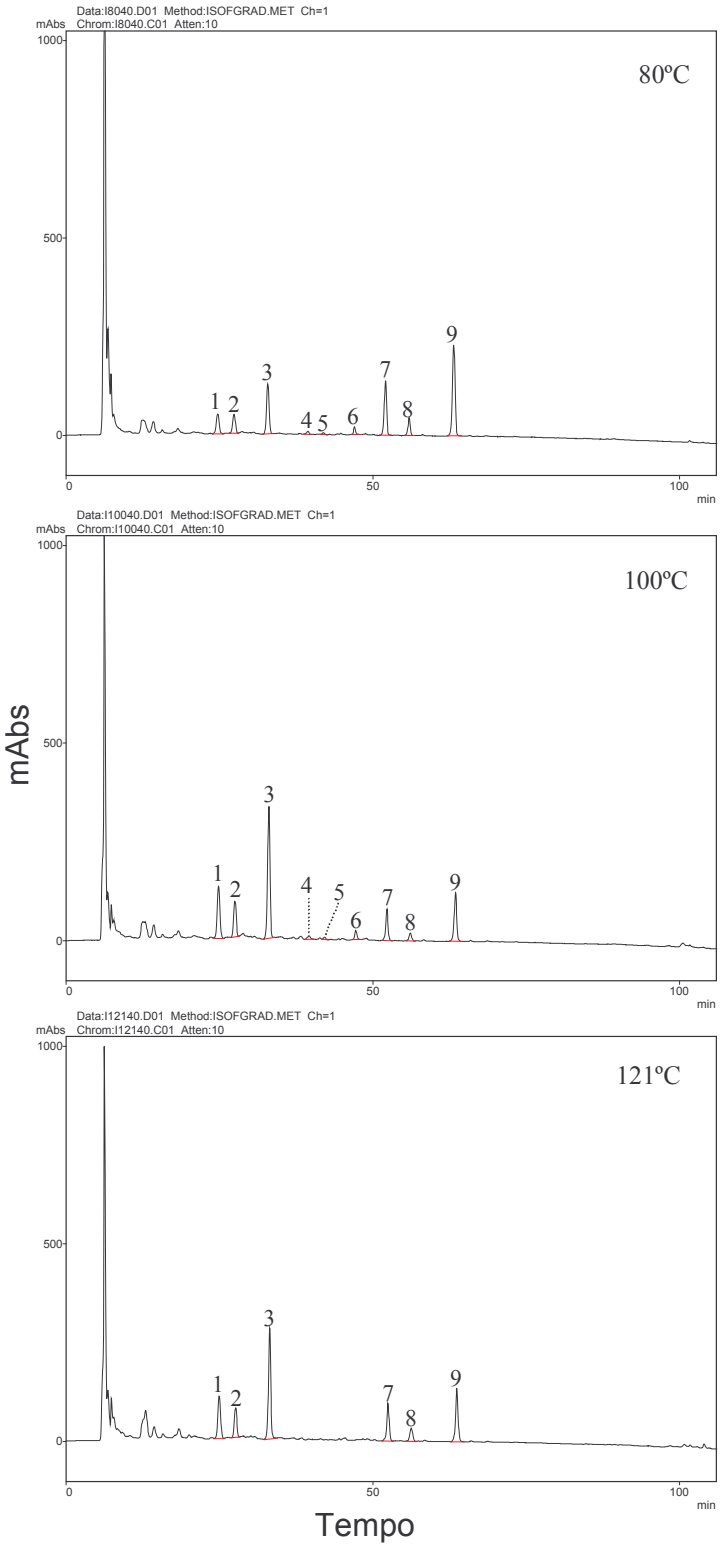


Figura 34: Perfis cromatográficos de farinha de soja tratada por aquecimento. 1. Daidzina, 2. Glicitina, 3. Genistina, 4. 6"-O-malonildaidzina, 5. 6"-O-

malonilglicitina, 6. 6"-O-malonilgenistina, 7. Daidzeína, 8. Gliciteína, e 9. Genisteína.

5.4 Efeito da Radiação Gama na Transformação de Isoflavonas Conjugadas

Significativas perdas no total de isoflavonas em produtos à base de soja têm sido observadas em processos que envolvem o aumento da temperatura ou que envolvem líquidos, tais como lavagem, fervura e cozimento, devido principalmente à lixiviação (Grün et al., 2001). Como muitas técnicas de processamento de alimentos, a radiação têm sido cada vez mais aplicada na redução da carga microbiana de alimentos embalados, bem como na prevenção de brotamentos em cebolas e batatas. A radiação ionizante de alta energia (radiação gama), emitida naturalmente por ^{60}Co e ^{137}Cs, fornecem alta energia aos elétrons, os quais podem causar forte instabilidade molecular produzindo entidades químicas instáveis, tais como radicais livres (Sokhey e Hanna, 1993). Este fato pôde ser observado com relação às isoflavonas em duas amostras de soja: (1) extrato concentrado de soja da solução aquosa de metanol 80%, e (2) farinha desengordurada de soja (100-200 *mesh*, Série *Tyler*). O extrato metanólico de soja contém quantidades residuais de água pela formação de emulsão, a qual pode absorver energia ionizante, produzindo eléctrons e radicais hidroxil solvatados (Detalhes ver Sokhey e Hanna, 1993). Estes radicais livres podem atacar a estrutura aromática das isoflavonas, diminuindo o conteúdo total destes compostos no extrato de soja. Os resultados deste estudo são apresentados na Tabela 20.

Table 20: Conteúdo de isoflavonas em extrato metanólico de soja tratado por radiação gama (μg/g)[a].

Isoflavonas	0 kGy (Controle)[b]	2 kGy	5 kGy	10 kGy	25 kGy
Daidzina	1683,6±6,0^{A}	1329,6±1,0^{B}	1242,2±7,6^{C}	1168,5±6,9^{D}	1113,9±7,1^{E}
Glicitina	500,5±1,0^{A}	400,5±2,1^{B}	386,0±4,5^{C}	358,2±4,1^{D}	339,2±4,7^{E}
Genistina	1722,6±2,0^{A}	1348,2±4,1^{B}	1261,0±5,0^{C}	1169,1±5,1^{D}	1130,4±9,0^{E}
Malonildaidzina	89,1±0,5^{A}	71,0±0,3^{B}	64,9±1,5^{C}	61,6±0,8^{D}	61,4±1,2^{E}
Malonilglicitina	20,4±0,4^{C}	15,4±1,4^{D}	31,5±3,0^{A}	27,2±1,1^{B}	16,1±0,3^{D}
Malonilgenistina	118,2±0,8^{A}	99,9±3,5^{B}	91,2±1,5^{C}	87,2±1,6^{D}	86,4±1,7^{D}
Daidzeína	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Gliciteína	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Genisteína	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Total	*4134,3*	*3264,6*	*3076,8*	*2871,7*	*2747,3*

[a]Considerando que cada linha foi analisada independentemente, os números com as mesmas letras não foram significativamente diferentes pelo teste de Tukey (p<0,05; n=3). [b]Extrato metanólico de soja sem tratamento com radiação gama.

O conteúdo total de isoflavonas no extrato metanólico de soja foi maior que na farinha de soja, no entanto, o efeito da radiação gama sobre as isoflavonas no extrato metanólico de soja foi mais pronunciado. Estatisticamente a diferença nos conteúdos de isoflavonas na farinha desengordurada de soja foi pequena, mas a tendência do efeito da radiação é reduzir o conteúdo de isoflavonas totais, tal como

no extrato metanólico de soja. Por outro lado, não houve diferença significativa nos conteúdos de isoflavonas nas diferentes doses de radiação aplicadas sobre a farinha de soja. Os resultados são apresentados na Tabela 21.

Table 21: Conteúdo de isoflavonas em farinha desengordurada de soja tratada por radiação gama (μg/g)[a].

Isoflavonas	0 kGy (Controle)[b]	2 kGy	5 kGy	25 kGy	50 kGy
Daidzina	458,6±6,1[A]	449,2±1,7[B]	439,7±1,5[C]	486,6±3,0[D]	428,4±2,0[E]
Glicitina	49,8±2,0[A,B]	46,6±0,9[C]	41,3±0,2[D]	42,7±0,5[D]	47,3±0,4[B,C]
Genistina	416,3±2,5[A]	417,1±2,0[A]	411,0±6,1[A]	416,7±3,1[A]	395,4±2,2[B]
Malonildaidzina	278,2±6,1[A]	265,1±5,5[B]	254,0±4,6[B]	258,2±2,1[B]	230,9±1,2[C]
Malonilglicitina	30,1±0,8[A]	27,3±0,2[B]	24,2±1,3[B,C]	23,0±0,4[C]	22,7±0,3[D]
Malonilgenistina	248,7±1,3[A]	245,3±2,5[A,B]	238,0±3,6[B]	250,2±2,6[A]	215,6±4,1[C]
Daidzeína	55,1±0,5[B]	54,4±0,3[C]	53,7±0,5[C]	59,1±1,0[A]	49,6±0,5[D]
Gliciteína	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Genisteína	45,0±1,5[A,B]	44,5±1,0[B]	44,2±0,6[B]	47,5±0,7[A,B]	37,9±1,2[C]
Total	*1581,9*	*1547,8*	*1502,0*	*1625,7*	*1424,3*

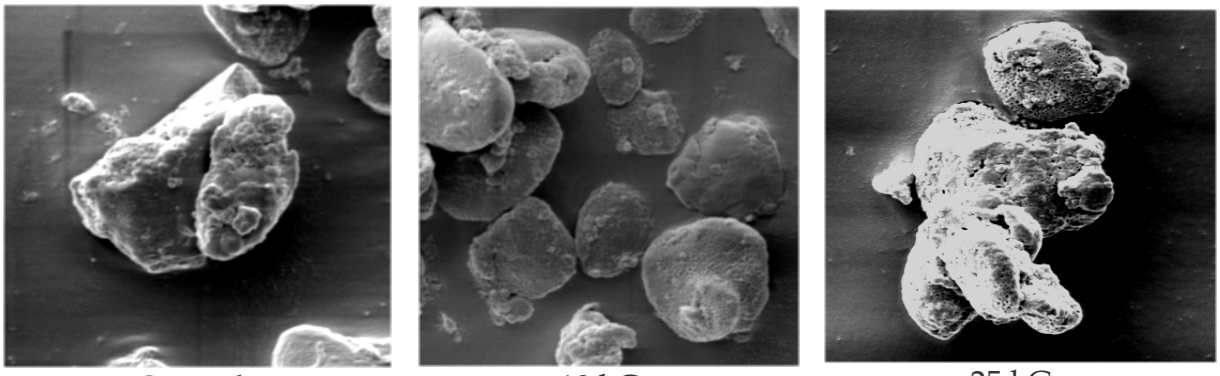
[a]Considerando que cada linha foi analisada independentemente, os números com as mesmas letras não foram significativamente diferentes pelo teste de Tukey (p<0,05; n=3). [b]Farinha de soja sem tratamento com radiação gama.

Embora Sokhey e Hanna (1993) reportem que o aumento na dose de radiação gama gere um aumento na intensidade de radicais livres, e que estes radicais são responsáveis pela quebra de ligações químicas, em farinha desengordurada de soja, Vitti et al. (1998) reportaram que outros componentes tais como celulose, hemicelulose e lignina, podem fornecer uma proteção aos compostos fenólicos presentes na farinha de soja contra a radiação ionizante, diminuindo assim os efeitos da radiação sobre as isoflavonas. A baixa porcentagem

de umidade nas amostras de farinha desengordurada de soja também é um fator importante na redução da formação de radicais livres e, conseqüentemente a decomposição de isoflavonas nestas amostras. De acordo com Vitti et al. (1998), amostras de bagaço de cana-de-açúcar, palha de arroz e resíduos de algodão foram irradiados com várias doses (200, 400, 600, 800 e 1000 kGy), e o efeito da radiação gama sobre os componentes celulósicos foram apenas observados em doses elevadas (800-1000 kGy). Neste estudo, por outro lado, as amostras foram tratadas até 50 kGy, e este nível de energia não foi suficiente para causar uma significativa mudança na composição de isoflavonas na farinha desengordurada de soja.

É conveniente observar que o processamento com energia ionizante requer diferentes dosages de radiação dependendo do tipo de alimento e objetivos do tratamento. Por exemplo, uma dose de 0,02-0,15 kGy inibe o brotamento em batatas e cebolas, 0,1-8 kGy destrói microrganismos patogênicos e não-esporulados e de 10-50 kGy é indicado para esterilização de alimentos da infestação microbiana (Wolters et al., 1990).

A Figura 35 ilustra micrografias de varredura das amostras de farinha desengordurada de soja após tratamento com radiação gama (0, 10, and 25 kGy).



Controle 10 kGy 25 kGy

Figura 35: Micrografias de varredura de farinhas desengorduradas de soja tratadas com radiação gama; ^{60}Co. (10 kV, 11mm, 2500 ×).

De acordo com as análises em microscopia eletrônica de varredura, mudanças na superfície dos grãos de farinha de soja não foram notadas após radiação com 10 e 25 kGy (Figura 35). Estudos nutricionais têm mostrado que tratamentos com baixas doses de radiação não causam notável redução na qualidade nutricional de alimentos e macronutrientes tais como proteínas, carboidratos e lipídios. A alteração na qualidade nutricional associada à radiação depende de um número de fatores, tais como tipo de energia, embalagem, condições de processamento (temperatura e exposição a oxigênio), tempo de estocagem e tipo de alimento (Crawford e Ruff, 1996), ou o conteúdo de água presente no alimento. Este fator pode ser comprovado nas amostras de extrato metanólico de soja, que apresentaram porcentagens de umidade ao redor de 85%, e a diminuição no conteúdo de isoflavonas foi maior (33,6%) do que nas amostras de farinha desengordurada de soja (9,96%), as quais apresentaram umidades relativas em torno de 25%. Os conteúdos de cada isoflavona foram significativamente diferentes em cada tratamento com radiação gama (Tabelas 20 e 21).

A radiação gama tem se mostrado uma técnica eficiente na desinfecção de alimentos e pelo apresentado neste estudo, seu emprego mesmo à altas dosagens (50 kGy) não apresentou significativa diminuição no conteúdo de isoflavonas totais em farinha desengordurada de soja.

5.5 Efeito da β-Glicosidase na Transformação de Isoflavonas Glicosiladas

A hidrólise enzimática de glicosil-isoflavonas de soja por microrganismos tem sido reportado por diversos autores. Alguns destes microrganismos reportados são, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus oligosporus* e *Lactobacillus casei* (Matsuda et al., 1994), e são usados na manufatura de alimentos fermentados de soja. Foi também reportado que β-glicosidase endógena de soja foi capaz de hidrolisar glicosil-isoflavonas à suas formas agliconas (Carrão-Panizzi et al., 1998). Neste trabalho, foi verificada basicamente a produção de β-glicosidase por *Aspergillus oryzae* ATCC 22786, o qual é usado na produção de alimentos fermentados à base de arroz, em meio semi-sólido. Outros fungos foram testados quanto à sua produção de β-glicosidase, bem como foi estudada a produção de β-glicosidase por mutantes induzidos por radiação ultravioleta, em laboratório.

As atividades enzimáticas para β-glicosidase de diferentes fungos empregados em rotinas do Laboratório de Bioquímica de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas (DCA/UNICAMP), são apresentadas na Tabela 22. Muito embora a atividade para β-glicosidase de *Aspergillus oryzae* ATCC 22786 tenha sido inferior à de outros fungos filamentosos utilizados neste estudo comparativo, sua aplicabilidade seria maior devido ao fato de que este fungo foi isolado de produtos da fabricação de Amazake, especificamente da matéria-prima, conhecida por arroz-koji, além de ser classificado como organismo seguro para a saúde humana, tem o título de microrganismo GRAS (*Generally Recognized As Safe*),

não produtor de aflatoxina, e seu nível de biosegurança (BSL) é 1. Segundo informações obtidas no sítio eletrônico da American Type Culture Collection - The Global Bioresource Center, os organismos em BSL 1, são aqueles conhecidos por não causar doenças à saúde de um humano adulto. A linhagem (*A. oryzae* ATCC 22786) foi isolada inicialmente no Japão, e possui ainda outras codificações de acordo com as normas da Coleção em que está depositado; sendo assim, pode ser encontrado como RIB 430, CBS 816.72 e IFO 30104. Seu crescimento se dá em meio de BDA (batata-dextrose-ágar) e em temperaturas que vão de 24,0 a 36,0ºC.

Tabela 22: Atividades enzimáticas para β-glicosidase de alguns fungos filamentosos.

Amostras	**Fonte**	**Coleção**	**[a]UI mL^{-1}**
Aspergillus oryzae ATCC 22786	Arroz *Koji*	*American Type Culture Collection*	0,18
Aspergillus oryzae II	Solo	[b]DCA-UNICAMP	0,35
Aspergillus niger I	Solo	[b]DCA-UNICAMP	0,46
Aspergillus niger II	Alimentos Amiláceos	[b]DCA-UNICAMP	0,14
Aspergillus awamori ATCC 22342	Fibras	*American Type Culture Collection*	0,15

[a]Atividade enzimática de β-glicosidase medida contra *p*-nitrofenil-β-glicopiranosídio (pNPG), após crescimento fúngico em meio semi-sólido de farelo de soja e água destilada (1:1, p/v), a 30ºC após 96 horas de crescimento. Uma unidade de atividade enzimática representa a liberação de 1 micromol de p-nitrofenol por minuto a 40ºC. [b] Fungos isolados pela equipe de professores e

técnicos do Laboratório de Bioquímica de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas.

Outros microrganismos podem ser utilizados na produção de β-glicosidase e na conversão de ligações glicosídicas de materiais celulósicos ou p-nitrofenil-β-glicopiranosídio (pNPG), e apresentarem atividade enzimática superior à de *A. oryzae* ATCC 22786, no entanto estes podem não apresentar especificidade para a ligação glicosídica de isoflavonas conjugados. Este fato foi percebido para algumas enzimas extraídas de vegetais que apresentaram a hidrólise de pNPG, mas quando colocadas a hidrolisar isoflavonas glicosiladas a taxa de conversão foi inferior à da β-glicosidase de *A. oryzae* ATCC 22786 (resultados não apresentados).

Outro microrganismo que poderia ser empregado no estudo de conversão de isoflavonas glicosiladas, seria o *Aspergillus awamori* ATCC 22342. Este fungo, também foi isolado no Japão, e inicialmente depositado no Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América (USDA - Agricultural Research Service Culture Collection), sob número NRRL 3112 e posteriormente, foi depositado na American Type Culture Collection. Seu crescimento se dá em meio de Blakeslee (Extrato de Malte-Ágar) e temperatura de 24ºC. No entanto, este fungo tem sido associado à produção de α-amilase e glicoamilase extracelulares e β-glicuronidase endógena; além de ter sido isolado de fibras não-alimentares, o que acarreta a exigência de testes de toxicidade para ser aplicado na produção de ingredientes alimentares, como isoflavonas agliconas de soja.

Muito embora as atividades para β-glicosidase dos fungos filamentosos testados (*A. oryzae II*, *A. niger* I e *A. niger* II) tenham sido superiores à apresentada pelo *A. oryzae* ATCC 22786, estes foram isolados de solo do município de Campinas/SP, e não apresentavam quaisquer estudos sobre toxicidade, em testes em cobaias ou reconhecido emprego na produção de alimentos fermentados, como é o caso do *A. oryzae* ATCC 22786.

Culturas de diferentes organismos têm sido usadas por diversos pesquisadores no sentido de obter mutantes com inúmeras características desejáveis (Ponce-Noyola e La Torre 1995). Mutantes foram isolados após exposição de suspensão de esporos do fungo à luz UV por 60 min. Com intuito de aumentar a produção de β-glicosidase de *A. oryzae* ATCC 22786, foram feitos alguns estudos de indução de mutantes por luz UV. Das 105 colônias isoladas (Tabela 23), somente quatro exibiram considerável aumento na atividade de β-glicosidase (Tabela 24). Muitos trabalhos têm indicado que mutantes estáveis em processos fermentativos podem ser melhor isolados após tratamento dos microrganismos com agentes físicos de mutação como luz UV (Hamissa et al., 1992).

Tabela 23: Número de colônias desenvolvidas após exposição dos esporos de *A. oryzae* ATCC 22786 a radiação UV.

Tempo de exposição (min)	Colônias selecionadas	Sobrevivência (%)
10	98	27,3

30	4	1,2
60	3	0,9

Qualquer método que possa aumentar significativamente a atividade de β-glicosidase pode ser considerada uma técnica potencial para se obter uma rápida hidrólise de glicosil-isoflavonas à suas formas agliconas, as quais são mais bioativas. Os resultados obtidos quanto às atividades enzimáticas para β-glicosidase de mutantes de *A. oryzae* ATCC 22786 são apresentados na Tabela 24.

Tabela 24: Produção de β-glicosidase por diferentes mutantes de *A. oryzae* ATCC 22786 obtidos após exposição de cultura parental com luz UV por 10, 30 e 60 min.

Mutantes	Exposição, min	β-Glicosidase, UI/mL[a]
Parental	0	0,17
UV-Mm01	10	0,21
UV-Mm02	10	0,21
UV-Mm03	10	0,20
UV-Mm04	10	0,20
UV-Mm05	10	0,19
UV-Mm06	10	0,21
UV-Mm07	10	0,21
UV-Mm08	10	0,19
UV-Mm09	10	0,19
UV-Mm10	10	0,18
UV-Mm11	10	0,19
UV-Mm12	10	0,20
UV-Mm13	10	0,19
UV-Mm14	10	0,19
UV-Mm15	10	0,19

UV-Mm16	10	0,19
UV-Mm17	30	0,19
UV-Mm18	30	0,19
UV-Mm19	30	0,18
UV-Mm20	30	0,19
UV-Mm21	60	0,19
UV-Mm22	60	0,19
UV-Mm23	60	0,18

[a] Beta-glicosidase foi avaliada por pNPG a 420 nm (Ver metodologia).

A conversão de isoflavonas glicosiladas pelos extratos enzimáticos obtidos dos mutantes morfológicos de *A. oryzae* ATCC 22786, UV-Mm01, UV-Mm02, UV-Mm06 e UV-Mm07, foi verificada em fermentação em estado sólido sobre farelo de soja a 30ºC, e os resultados são apresentados na Tabela 25.

Tabela 25: Perfil de isoflavonas durante conversão de glicosil-isoflavonas por β-glicosidase de mutantes morfológicos de *A. oryzae* ATCC 22786.

Mutantes morfológicos	Isoflavonas (μg/g)[a]					
	Daidzina	Glicitina	Genistina	Daidzeína	Gliciteína	Genisteína
Controle[b]	122,0	32,0	123,2	8,7	0,0	9,1
Parental[c]	0,0	0,0	0,0	292,0	24,6	152,2
UV-Mm01	0,0	0,0	0,0	300,5	40,9	181,6

UV-Mm02	0,0	0,0	0,0	459,9	85,0	217,8
UV-Mm06	0,0	0,0	0,0	422,1	54,3	214,1
UV-Mm07	0,0	0,0	0,0	341,4	45,0	236,0

[a]Temperatura durante a fermentação foi mantida a 30ºC por 96 horas, e os resultados foram expressos pela média dos valores em duplicata. [b]Medida dos conteúdos de isoflavonas presentes no farelo de soja sem inoculação dos esporos fúngicos. [c]Fermentação em estado sólido com esporos do fungo *A. oryzae* ATCC 22786 antes da exposição à radiação ultravioleta.

Para todos os tratamentos fermentativos com esporos parentais ou de mutantes, a conversão das glicosil-isoflavonas foi alcançada completamente após 96 horas de incubação a 30ºC, em farelo de soja umidecida com água destilada numa proporção de 1:1 (p/v). Os balanços de massas na conversão não se encontram equilibrados, devido ao fato que o sistema fermentativo produziu outras enzimas, tais como celulase total (0,2 $UI.mL^{-1}$) e xilanase (1,2 $UI.mL^{-1}$), as quais podem hidrolisar componentes fibrosos presentes no farelo de soja, tornando as isoflavonas no farelo mais predispostas à extração alcoólica, sugerindo assim o aumento no conteúdo de isoflavonas totais após a fermentação em estado sólido.

A enzima β-glicosidase produzida pelo parental de *A. oryzae* ATCC 22786 foi analisada quanto às suas características bioquímicas, ou seja, os valores de temperatura ótima e de estabilidade, bem como o pH ótimo desta enzima foi determinado. Os resultados são apresentados nas Figuras 36 a 38.

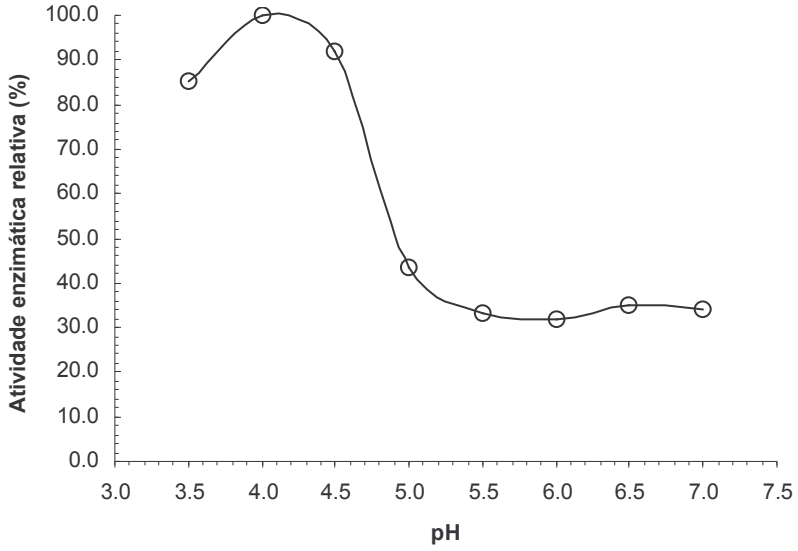


Figura 36: Potencial hidrogeniônico ótimo para a atividade de β-glicosidase de *A. oryzae* ATCC 22786.

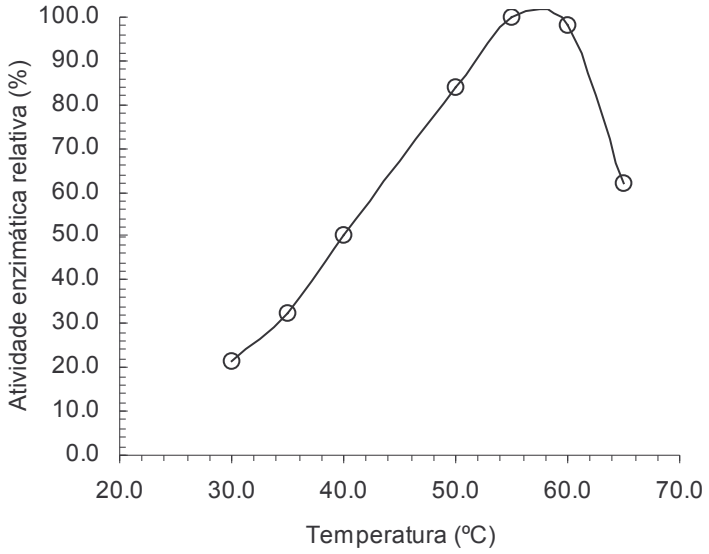


Figura 37: Temperatura ótima para a atividade β-glicosidase de *A. oryzae* ATCC 22786.

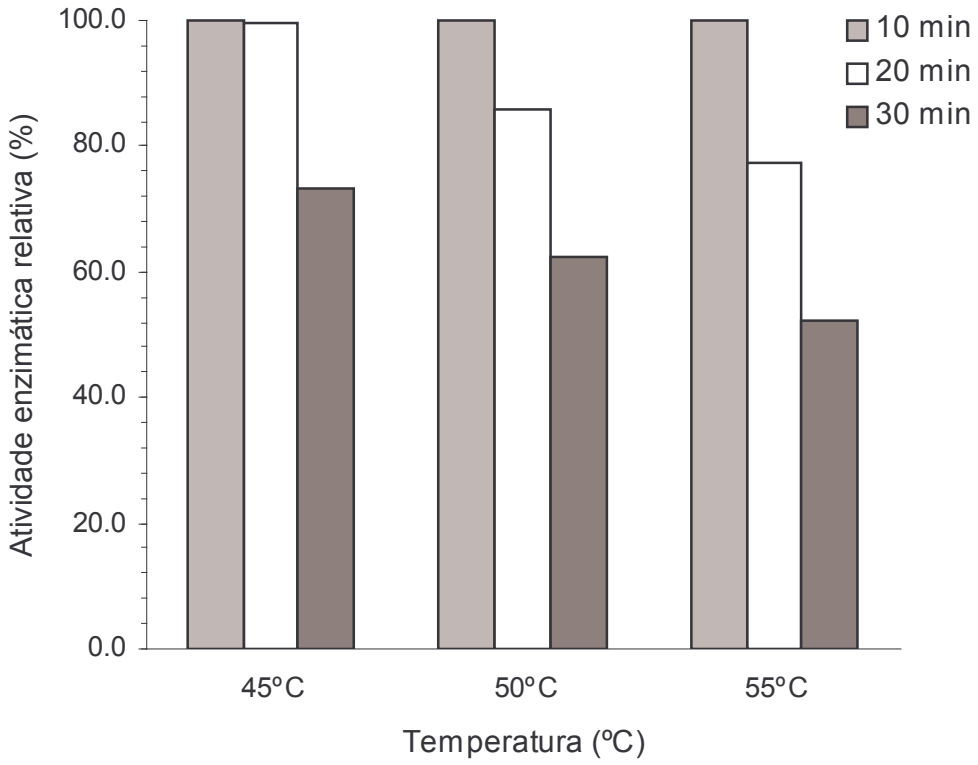


Figura 38: Temperatura de estabilidade para a atividade de β-glicosidase de *A. oryzae* ATCC 22786.

A transformação enzimática de isoflavonas glicosiladas de soja é possível pela aplicação de enzimas específicas às ligações presentes na estrutura fenólica das isoflavonas. Das isoflavonas presentes na farinha desengordurada de soja, as formas glicosiladas foram na sua totalidade convertidas, por hidrólise com β-glicosidase, a suas formas agliconas. Matsuura e Obata (1993) e Matsuura et al. (1989) reportaram que β-glicosidase foi associada à produção de daidzeína e genisteína, as quais são formas agliconas de daidzina e genistina, respectivamente.

Durante fermentação semi-sólida de farinha desengordurada de soja por 48 horas (Tabela 26), cerca de 551 μg/g de isoflavonas agliconas foram obtidas a partir das formas glicosiladas de isoflavonas (628,0 μg/g). A conversão de glicosil-isoflavonas a agliconas foi devido à presença de β-glicosidase, enzima associada à lise de ligação glicosídica do tipo β-1,4. A enzima, β-glicosidase ou β-D-glicosil glicohidrolase (EC 3.2.1.21), é uma enzima celulolítica que hidrolisa celobiose e remove glicose de terminais não-redutores de oligosacarídios, ou ainda, transfere grupos glicosil para celobiose (Lymar et al., 1995). Conhecida como celobiase, possui diferentes formas produzidas por fungos ou bactérias, apresentando pH ótimo de ácido a alcalino (pH 4,4-8,4) e massa molecular entre 50 a 98 kDa. Apresenta normalmente uma atividade ótima em pH 4,5 e 70ºC, para a hidrólise da celobiose. Seus Km para celobiose e p-nitrofenil-β-glicopiranosídio são normalmente de 0,5 e 0,3 mM, respectivamente. Algumas β-glicosidases bacterianas têm atividade ótima a pH 6,0-6,5 à 50ºC e uma massa molecular de 52 kDa (Wong, 1995). β-Glicosidases são amplamente empregadas na tecnologia de

alimentos, biotecnologia e química orgânica, exercendo importante papel na hidrólise de grupos glicosídicos e na glicosilação de vários compostos agliconas (De Roode et al., 2001). Agem em conjunto com outras celulases para hidrolisar a celulose ou seus oligômeros (Aguiar, 2001; Iwashita et al., 2001; Srinivasan et al., 2001; Krishna et al., 2001; Tengborg et al., 2001; Aguiar e Menezes, 2000; Ortega et al., 1998; Menezes, 1997; Tajaldeen e Jaffar, 1992) e atuando com pectinases é uma alternativa potencial na remoção de películas vegetais em frutas. Além destas aplicações, as β-glicosidases microbianas podem ser aplicadas na modificação de compostos aromáticos de frutas e vinhos. Sua produção e aplicação na hidrólise de materiais celulósicos foram extensamente estudadas por vários centros de pesquisa, com o intuito de produzir glicose que pode ser usado na geração de álcool etílico e biomassa celular.

De fato, os esporos de *Aspergillus oryzae* ATCC 22786, germinaram e a atividade enzimática foi também detectada após 24 horas de fermentação (Figura 39).

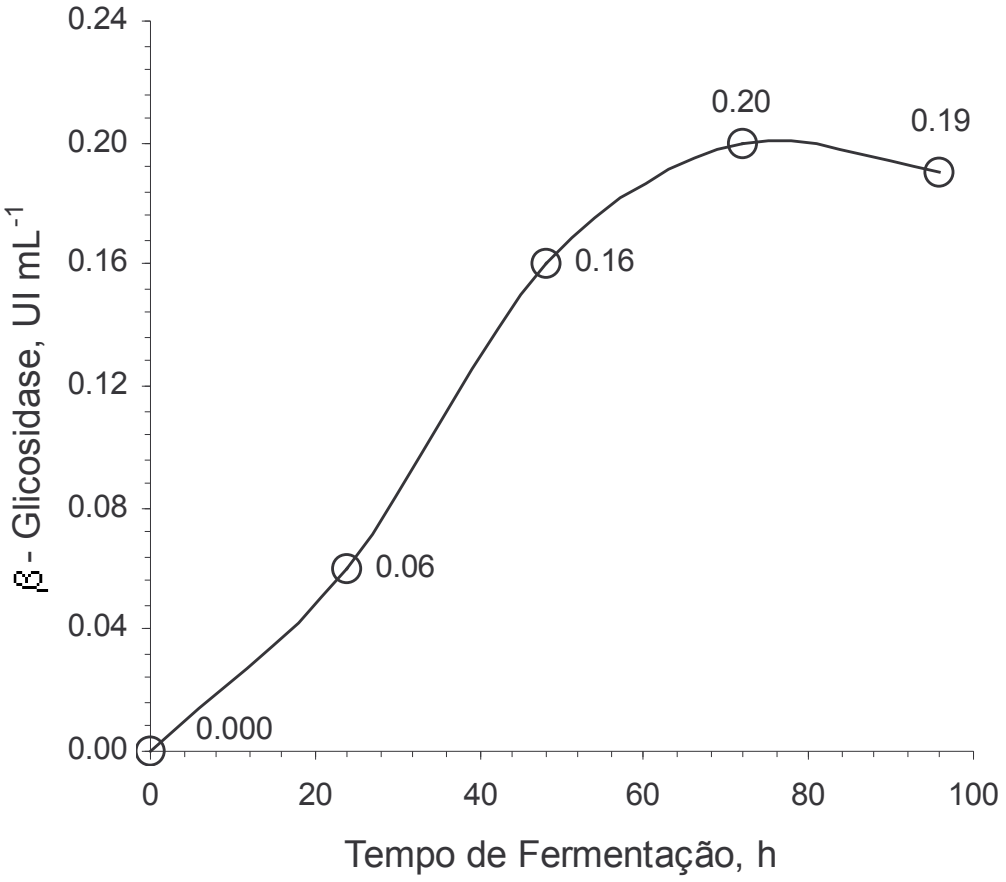


Figura 39: Produção de β-glicosidase de *A. oryzae* ATCC 22786 por fermentação semi-sólida em farinha desengordurada de soja.

É aparente que a conversão de glicosil-isoflavonas à agliconas, ocorreu após 24 horas de fermentação em estado sólido com farinha de soja pelo crescimento dos esporos (~10^7) de *A. oryzae* ATCC 22786, a 30ºC. Durante a fermentação, a quantidade de isoflavonas glicosiladas reduziu significativamente após 48 h de fermentação, e se forem considerados os valores totais de isoflavonas, houve uma pequena perda de seu conteúdo. Muitos estudos têm demonstrado que pode ocorrer pequenas ou mesmo significativas perdas do conteúdo de isoflavonas conjugadas, principalmente nas formas de malonil ou acetilconjugados, durante o processamento a quente ou por lixiviação (Wang et al., 2001). Considerando que o farelo de soja é uma fonte de nutrientes complexa, o fungo pode ter utilizado diversas destas fontes nutritivas para seu crescimento, as quais podem ter ativado diferentes sistemas enzimáticos, sendo de se esperar que conversões paralelas pudessem ocorrer simultânea e possivelmente perda no conteúdo de isoflavonas totais. No entanto, o propósito foi associar a atividade enzimática para β-glicosidase com a transformação de isoflavonas glicosiladas às suas formas agliconas, durante a fermentação em estado sólido de farinha de soja, como já foi relatado por Narikawa et al. (2000), Pandjaitan et al. (2000b), Esaki et al. (1999a), Esaki et al. (1998), Esaki et al. (1996) Matsuura et al. (1995), Ikeda et al. (1995) e Matsuura e Obata (1993).

Tabela 26: Variação no conteúdo de isoflavonas durante fermentação em estado sólido de farinha de soja com *A. oryzae* ATCC 22786.

Isoflavonas	μg isoflavonóide/g soja[b]				
	Controle[c]	24 h	48 h	72 h	96 h
Daidzina	244,9	26,0	0,0	0,0	0,0
Glicitina	73,1	34,7	0,0	0,0	0,0
Genistina	309,9	64,6	0,0	0,0	0,0
Daidzeína	265,0	558,7	816,1	906,1	1195,9
Gliciteína	96,6	206,7	128,9	135,7	167,2
Genisteína	418,0	807,3	386,0	392,2	435,2

[a]Temperatura durante a fermentação foi mantida a 30ºC. [b]Média dos valores em duplicata. [c]Incubação da solução tampão citrato-fosfato 50mM e pH 5,4 sem a presença de esporos fúngicos.

A Figura 40 mostra o perfil cromatográfico em camada delgada dos extratos alcoólicos das farinhas de soja fermentadas com esporos de *A. oryzae* ATCC 22786, em intervalos de tempo de 24 h, até completar 96 h de fermentação em estado sólido a 30ºC. A Figura 41 representa esquematicamente as bandas isoladas na eluição cromatográfica.

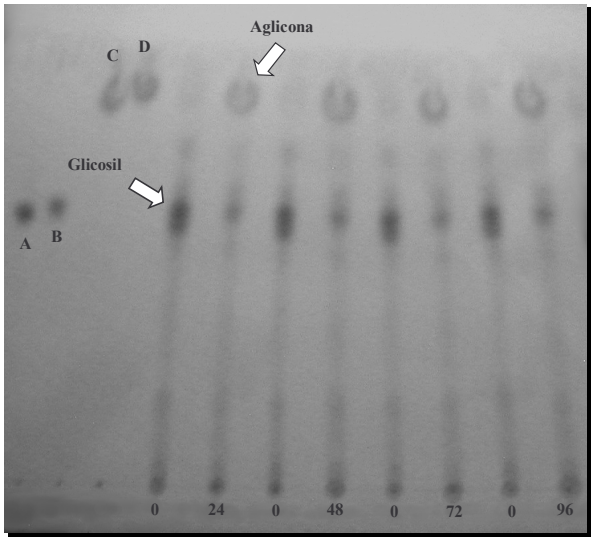


Figura 40: **Perfis cromatográficos em camada delgada de extrato metanólico de farinha de soja submetida à fermentação fúngica. A: Daidzina; B: Genistina; C: Daidzeína; D: Genisteína. Os números representam o tempo de fermentação semi-sólida do farelo de soja (em horas).**

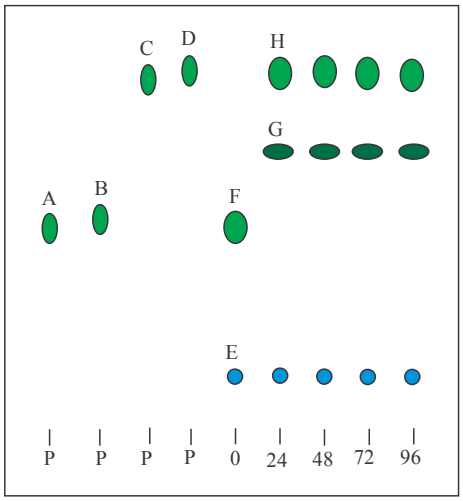


Figura 41: **Cromatografia em camada delgada de isoflavonas em extrato metanólico de soja fermentada com *A. oryzae* ATCC 22786 por diferentes períodos. Placa, sílica gel 60 F_{254}; fase móvel, clorofórmio:metanol:água (7:3:1, v/v); P, padrões (P1: daidzina, P2: genistina, P3: daidzeína, P4: genisteína); 0-96, tempo de fermentação (h); Gly, azul a 366 nm; Glc, verde claro a 366 nm; M1 e M2, verde escuro a 366 nm; Agl, verde claro a 366 nm; LF, linha de frente; Rf, relação de frente.**

A cromatografia em camada delgada com fluxo ascendente da fase móvel, composta por clorofórmio, metanol e água destilada (7:3:1, v/v) foi usada para separar os produtos de fermentação após intervalos de tempo de incubação da farinha de soja com *A. oryzae* ATCC 22786 a 30ºC. As bandas presentes na cromatoplaca foram visualizadas por fluorescência sob luz ultravioleta (366 nm). Os cromatogramas do extrato de soja apresentaram cinco grupos de manchas (Gly, Glc, M1, M2 e Agl), conforme os valores de relações de frente (Rf) dispostos na Tabela 27.

Tabela 27: **Características cromatográficas das manchas separadas de extrato metanólico de soja por CCD.**

Bandas	Rf[a]	Fluorescência a 366 nm	Flavonóides presentes[b]
P1	**0,56**	**Verde claro**	**Daidzina (padrão)**
P2	**0,58**	**Verde claro**	**Genistina (padrão)**
P3	**0,86**	**Verde claro**	**Daidzeína (padrão)**
P4	**0,89**	**Verde claro**	**Genisteína (padrão)**
Gly	**0,17**	**Azul claro**	**Glicitina, malonil-glicitina**
Glc	**0,58**	**Verde claro**	**Daidzina, genistina**
M1	**0,65**	**Verde escuro**	**Malonil-daidzina**
M2	**0,73**	**Verde escuro**	**Malonil-genistina**
Agl	**0,88**	**Verde claro**	**Daidzeína, genisteína**

[a]Rf, relação de frente. [b]A presença destes flavonóides foi confirmada por espectrometria de massas por ionização em eletrospray (Q-tof).

A banda separada a Rf 0,17 mostrou conter as isoflavonas glicitina e seu malonato conjugado, malonil-glicitina. Outras manchas separadas a Rf 0,65 e 0,73, tiveram suas identidades confirmadas por espectrometria de massas e continham malonil-daidzina e malonil-genistina, respectivamente. Outras isoflavonas como:

daidzina (Rf 0,58), genistina (Rf 0,58), daidzeína (Rf 0,88) e genisteína (Rf 0,88), foram separadas por CCD e identificados por comparação com os valores de Rf de seus padrões autênticos e confirmados positivamente por ESI em modo negativo. A cromatografia em camada delgada tem sido empregada para separar diferentes flavonóides de extratos vegetais com grande sucesso por diversos pesquisadores (Hammerschmidt e Pratt, 1978; Amarowicz e Shahidi, 1996; Esaki et al., 1999b), inclusive Agostini-Costa et al. (2000) propõe em seu trabalho uma técnica de caracterização de compostos fenólicos de pedúnculos de caju por CCD.

Durante a fermentação em estado sólido, as farinhas de soja produziram extratos metanólicos com colorações que variavam do amarelo pálido ao amarelo ouro, conforme pode ser visto na Figura 42.

Figura 42: Aspecto físico dos extratos metanólicos da farinha desengordurada de soja submetida à fermentação semi-sólida com *A. oryzae* ATCC 22876.

Em estudo comparativo (Tabela 28), foi observado que tanto a fermentação semi-sólida quanto a reação com extrato enzimático de β-glicosidase, foram capazes de converter isoflavonas glicosiladas em agliconas. Considerando que a fermentação em estado sólido foi capaz de converter eficientemente glicosil-isoflavonas às suas formas agliconas, é de se esperar que a aplicação do extrato enzimático bruto obtido a partir da fermentação submersa de *A. oryzae* ATCC 22786, possa converter aqueles flavonóides glicosilados em agliconas presentes em extrato concentrado de soja.

Tabela 28: Conversão de glicosil-isoflavonas de farinha de soja em agliconas.

Condição Reacional	[a]Glicosil isoflavonas			[a]Isoflavonas agliconas			
	Daidzina	Glicitina	Genistina	Daidzeína	Gliciteína	Genisteína	Total
Antes fermentação[b]	310 ± 11	78 ± 3	336 ± 23	9 ± 2	0,0	12 ±1	745,0
Após fermentação	48 ± 3	11 ± 1	17 ± 2	298 ± 26	27 ± 3	260 ± 10	661,0
Sem enzima[c]	391 ± 10	65 ± 5	723 ± 23	10 ± 3	0,0	21 ± 2	1210,0
Com enzima	97 ± 3	0,0	228 ± 7	196 ± 7	24 ± 4	431 ± 25	976,0

[a]Os dados são representados em microgramas de isoflavonas por grama de farinha desengordurada de soja. [b]Fermentação semi-sólida da farinha desengordurada de soja com *Aspergillus oryzae* ATCC 22786 (~10^7 esporos). [c]Conversão enzimática utilizando o extrato metanólico de farinha desengordurada de soja com β-glicosidase de *Aspergillus oryzae* ATCC 22786. Média ± desvio padrão das amostras em duplicata.

A conversão das glicosil-isoflavonas, daidzina, glicitina e genistina, em agliconas (daidzeína, gliciteína e genisteína) foi notada em ambos os sistemas fermentativos. Cabe ressaltar que na fermentação em estado sólido, o processo fermentativo foi de 48 horas, ao passo que com a aplicação do extrato enzimático diretamente ao extrato concentrado de soja, a conversão de glicosil-isoflavonas ocorreu em 30 minutos. De qualquer modo, as isoflavonas isoladas de farinha desengordurada de soja tratada com β-glicosidase apresentaram elevada conversão das formas glicosiladas, como pode ser verificado na Figura 43.

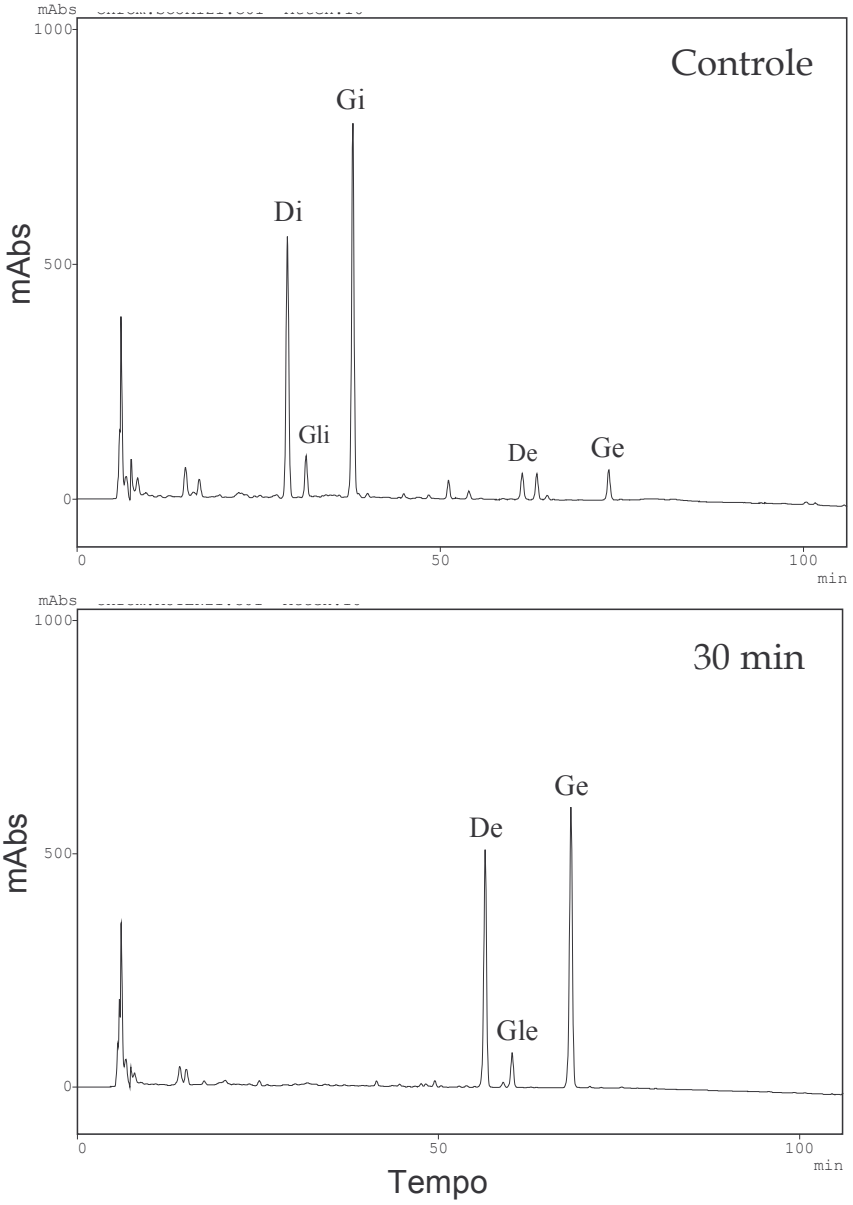


Figura 43: Perfis cromatográficos de isoflavonas em extrato concentrado após transformação enzimática. Di: daidzina; Gli: glicitina; Gi: genistina; De: daidzeína; Gle: gliciteína; Ge: genisteína.

O conteúdo de isoflavonas antes (tempo zero) e após (60, 120 e 180 min) a aplicação da enzima, foi avaliado por cromatografia líquida de alta eficiência, e os valores foram expressos em microgramas de isoflavonas por grama de extrato concentrado de isoflavonas. Durante a reação enzimática pode-se notar que houve grande formação de formas agliconas e que o conteúdo de isoflavonas conjugadas diminuiu significativamente na primeira hora, chegando a valores mínimos após 90~100 min (Figuras 43 e 44). A formação de isoflavonas agliconas foi crescente e linear até 60 min, com visível estabilização das curvas de concentração após este tempo. As formas que mais contribuíram para este estudo foram a daidzina e genistina, por estarem em maior concentração no extrato concentrado de isoflavonas utilizado, porém pode-se verificar que apesar da menor concentração, o conteúdo de glicitina (glicosilada) foi reduzido a níveis próximos de zero com formação de sua correspondente forma aglicona (gliciteína).

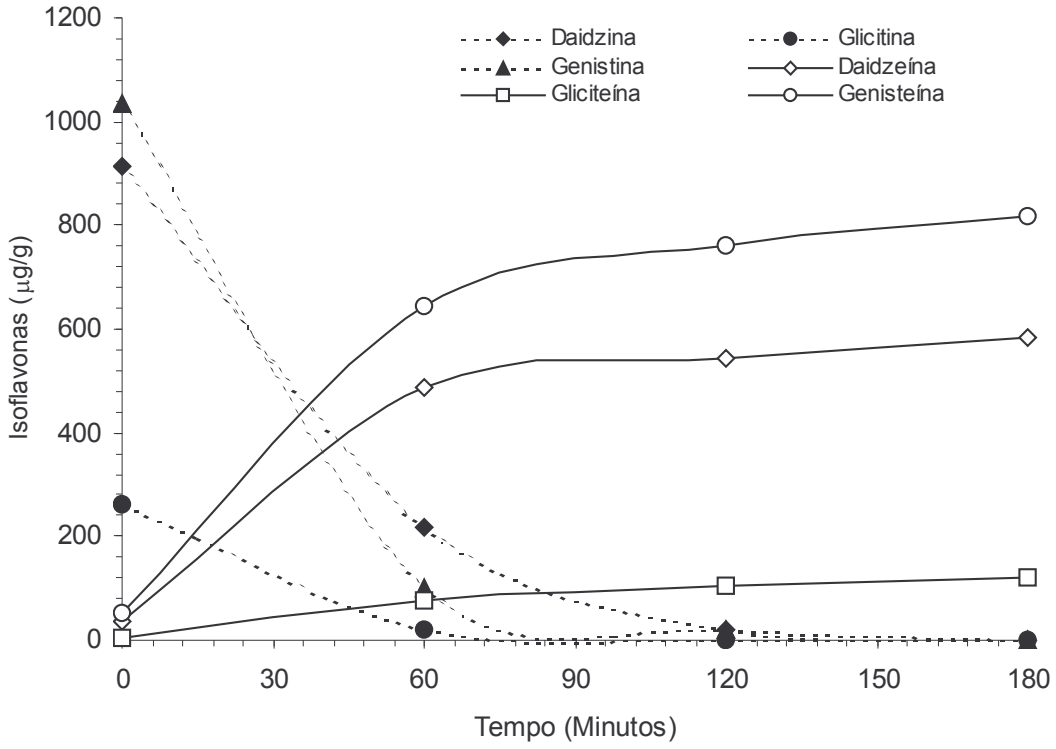


Figura 44: Cinética de conversão de glicosil-isoflavonas às suas formas agliconas.

Enzimas como a β-glicosidase têm sido aplicadas nos diferentes setores industriais, e cada vez mais aplicações têm sido reportadas. Beta-glicosidases podem ser obtidas de diferentes fontes, sejam elas vegetais (Agrawal e Bahl, 1968; Bahl e Agrawal, 1968), bacterianas (Goyal et al., 2001; Kiso et al., 2000), fúngicas (Harhangi et al., 2002; Sasaki e Nagayama, 1997), ou de archaea (De Roode et al., 2001), cujas características podem diferir drasticamente, mas que se mantêm classificadas no mesmo grupo devido às suas características de ação de hidrólise. No entanto, têm sido visto que algumas β-glicosidases são capazes de promover a formação de uma infinidade de compostos químicos pelas suas atividades de glicosilação, transglicosilação (Goyal et al., 2001; Nakatani, 2001; Withers, 2001) e síntese de compostos hexil-glicosilados (Andersson e Adlercreutz, 2001). A aplicação deste grupo de enzimas têm promovido uma alteração não somente na estrutura de polissacarídeos como a celulose, mas também em compostos químicos como as isoflavonas, as quais são compostos bioativos, e esta alteração estrutural tem gerado um ganho na atividade antioxidante destes flavonóides (Ikeda et al., 1995). A associação destas transformações enzimáticas e outras transformações físicas com as atividades biológicas de isoflavonas são a seguir discutidas.

A confirmação da identidade das isoflavonas analisadas neste estudo foi feita por análises espectrofotométricas e espectrométricas. A composição química dos extratos de soja, referente à presença de isoflavonas, foi avaliada por espectroscopia no infravermelho (IR) e espectrometria de massas por ionização em eletrospray com a comparação dos espectros de massas no modo MS e através de

fragmentos característicos no modo MS/MS de cada composto, num trabalho em colaboração com a Eng[a.] Gizelda M. Alves da Faenquil e o Dr. Marcos N. Eberlim do Instituto de Química da UNICAMP.

A cromatografia em camada delgada foi realizada em cromatoplaca de sílica gel 60, e as bandas obtidas foram visualizadas sob luz ultravioleta. Após a separação das bandas, estas foram tomadas por raspagem das cromatoplacas e isoladamente rotuladas para posterior análise.

Os valores de absorção no infravermelho correspondente aos prováveis grupos funcionais presentes nas frações do extrato metanólico de soja são apresentados na Tabela 29.

Table 29: Valores de freqüências (ν) no infravermelho dos compostos presentes no extrato metanólico de soja[a].

Grupo	ν, cm^{-1}	
	Padrão (P)	Amostra (A)[b]
O-H	3565	3509
C-H aromático	3151	Ausente
C-H saturado	2926	Ausente
COH	2740	2714
-C=C=C-	2118	2020
C=C	1652	1646

[a]A análise espectroscópica no infravermelho foi efetuada em equipamento FTIR Spectrum One da Perkin Elmer. [b]Uma alíquota da amostra em acetonitrila foi espalhado sobre pastilha de sódio em ambiente anidro.

Desde que os átomos em uma molécula podem vibrar e girar em uma variedade de caminhos, mas sempre com certo nível de energia, é possível que mudanças nestes níveis de energia podem ser ocasionados por luz infravermelha, a qual pode excitá-los, provocando três movimentos típicos (streching, bending e rotation). O modo "streching" é o mais importante para a determinação estrutural e pode ser dividido em quatro tipos: (1) ligações com hidrogênio (2200-4000 cm^{-1}), (2) ligações triplas (2000-2200 cm^{-1}), (3) ligações duplas (1550-1800 cm^{-1}) e (4) ligações simples (650-1550 cm^{-1}) (Hendrickson et al., 1970).

Na Figura 45, foram apresentados os espectros de absorção de uma mistura de padrões conhecidos de daidzina, genistina, daidzeína e genisteína, e de um extrato metanólico de soja. O extrato metanólico de soja mostrou a presença de diferentes isoflavonas como, daidzina, glicitina e genistina, seus glicosilados, e os malonil conjugados, pela análise em cromatografia líquida de alta eficiência. O espectro em IR do extrato metanólico de soja mostrou principalmente a presença de grupos hidroxil (3509 cm^{-1}) e grupos carbonil (1646 cm^{-1}), tal qual a mistura de padrões de isoflavonas, a qual apresentou forte presença de grupos hidroxil (3565 cm^{-1}) e grupos carbonil (1652 cm^{-1}).

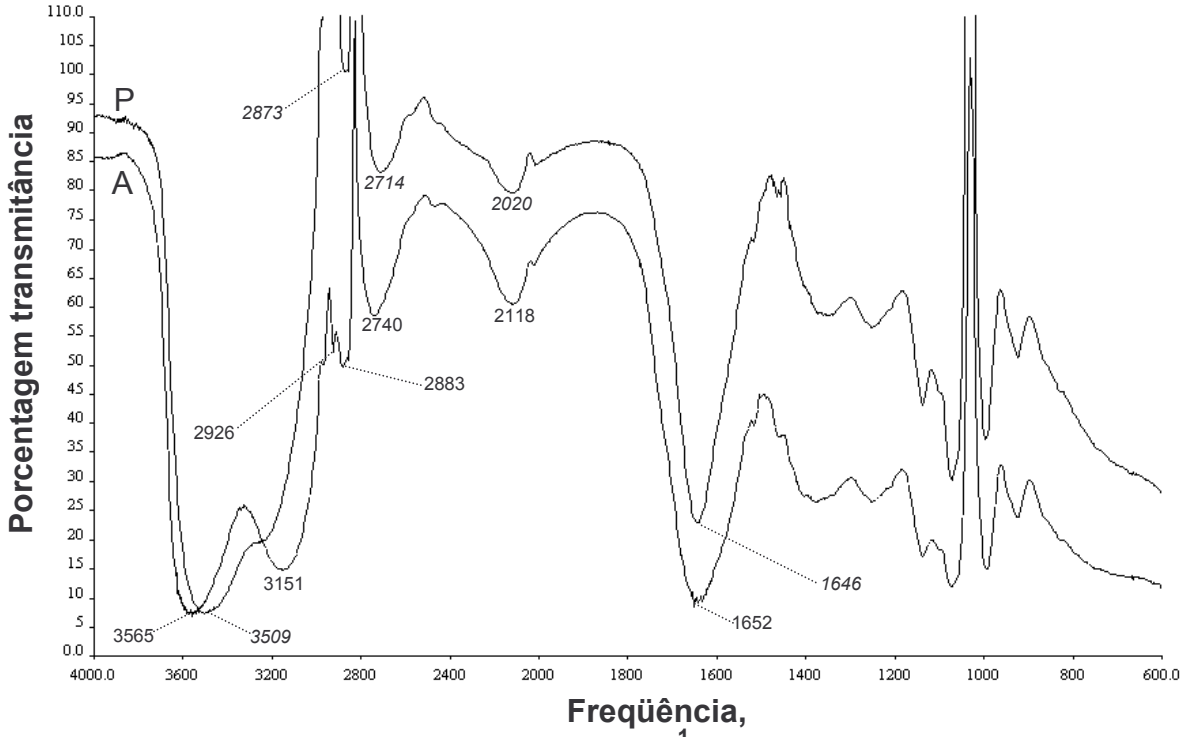


Figure 45: Espectros de infravermelho de extrato concentrado de soja (A) e mistura de padrões de isoflavonas (P).

Na identificação dos compostos por espectrometria de massas, inicialmente foram realizados experimentos de ESI/MS em modo negativo. Depois de realizado o experimento de ESI/MS e a identificação das massas nominais dos compostos de interesse, foram realizados experimentos de ESI/MS/MS utilizando argônio como gás de colisão e energia de colisão entre 15 e 30 eV, para que fosse possível obter a fragmentação destes compostos e identificá-los de acordo com seus fragmentos principais. Os espectros de massas obtidos no modo MS e os experimentos de ESI/MS/MS são discutidos a seguir. A Figura 46 mostra o espectro de massas de ESI/MS em modo negativo da amostra referente à extração da daidzina (*m/z* 415), no qual pode-se observar que esta amostra possui a relação massa/carga (*m/z*) nominal do composto de interesse.

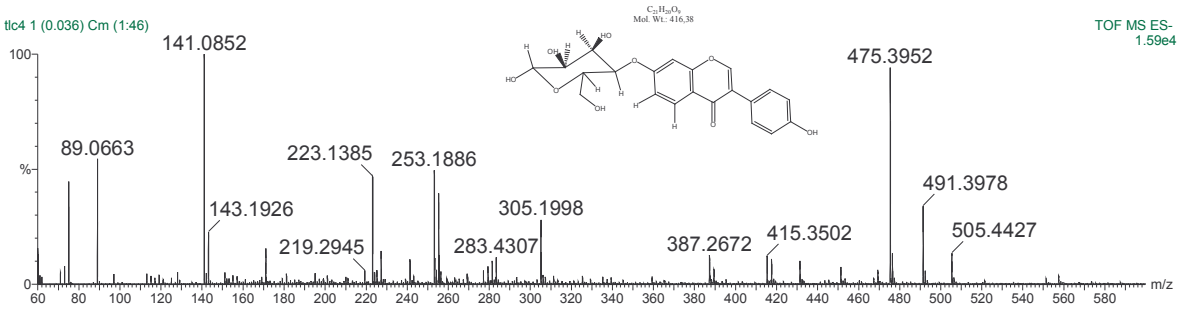


Figura 46: Espectro de massas de ESI/MS em modo negativo da amostra contendo a daidzina (*m/z* 415).

Identificada a massa da daidzina, foi realizado o experimento de ESI/MS/MS em modo negativo. Os fragmentos do extrato foram analisados com relação ao padrão, para que a presença deste composto fosse confirmada na amostra (Figura 47).

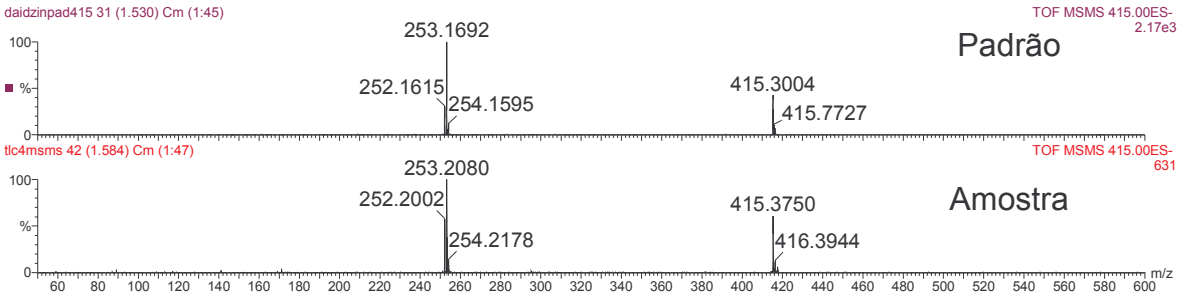


Figura 47: Espectro de massas de ESI/MS/MS em modo negativo da daidzina padrão (*m/z* 415) e daidzina proveniente do extrato metanólico da soja.

Para esta fração da extração foi confirmada a presença da daidzina, pois tanto o padrão como o extrato possui fragmento característico com perda neutra do grupo glicosil (*m/z* 164) (Figura 48).

Outros compostos de interesse foram testados e possuem o grupo O-glicosil na posição 7′. Estes compostos apresentaram o mesmo tipo de perda neutra do grupo correspondente, como é mostrado para a genistina (*m/z* 431) na Figura 49.

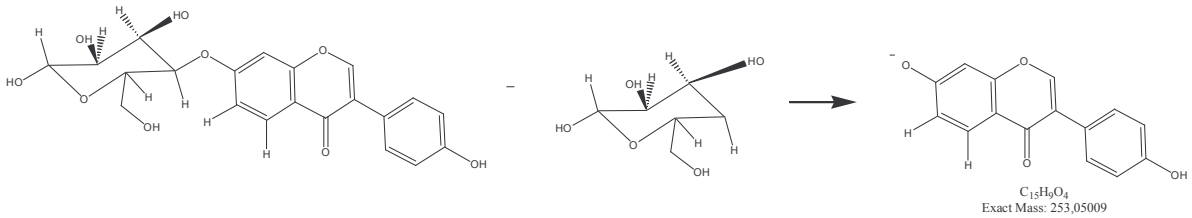


Figura 48: Fragmentação da daidzina pela perda neutra de um grupo glicosil e formação do fragmento de *m/z* 253.

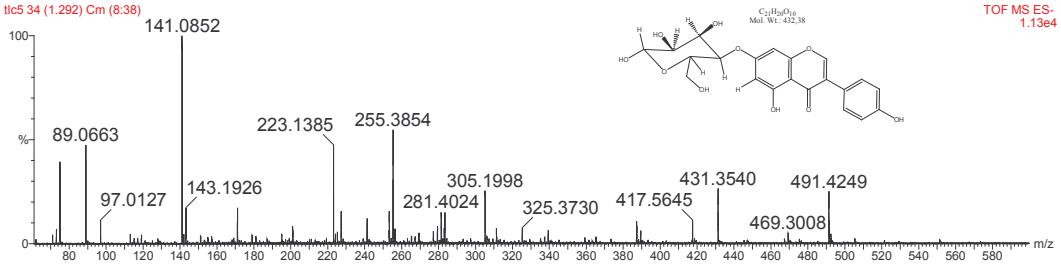


Figura 49: Espectro de massas de ESI/MS em modo negativo da amostra contendo a genistina (*m/z* 431).

Na Figura 50 pode-se observar os espectros de ESI/MS/MS em modo negativo da genistina e de seu padrão, os quais produzem fragmentos de *m/z* 269 que correspondem à perda do grupo O-glicosil. O fragmento de *m/z* 269 é a genisteína, que também estava sendo testada neste trabalho (Figura 51 e 52).

No extrato contendo genisteína (*m/z* 269) foram realizados experimentos de ESI/MS em modo negativo como mostrado na Figura 51. No experimento de MS/MS mostrado na Figura 52, foram obtidos fragmentos característicos para a amostra e padrão (*m/z* 91, 107, 133, 159 e 224), os quais mostram resultados positivos para confirmação da presença deste composto no extrato analisado.

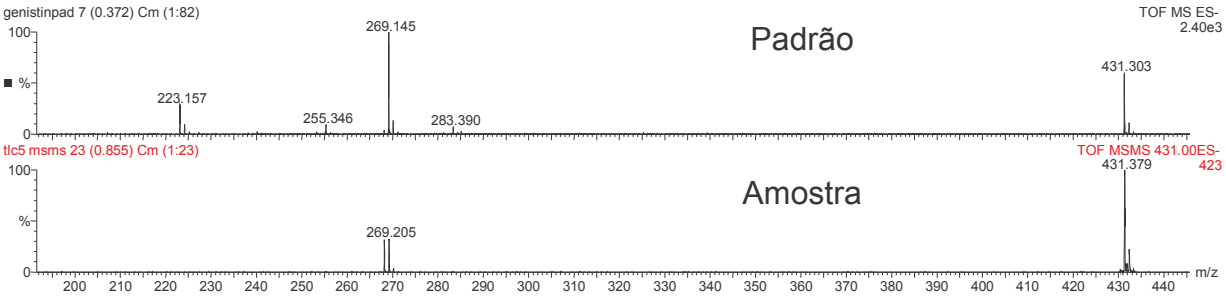


Figura 50: Espectro de massas de ESI/MS/MS em modo negativo da genistina padrão (*m/z* 431) e genistina proveniente do extrato da soja.

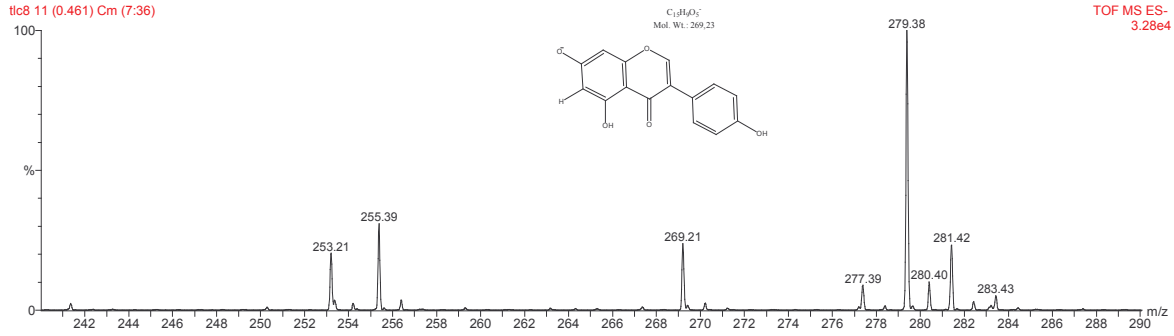


Figura 51: Espectro de massas de ESI/MS em modo negativo da amostra e seu padrão (genisteína, *m/z* 269).

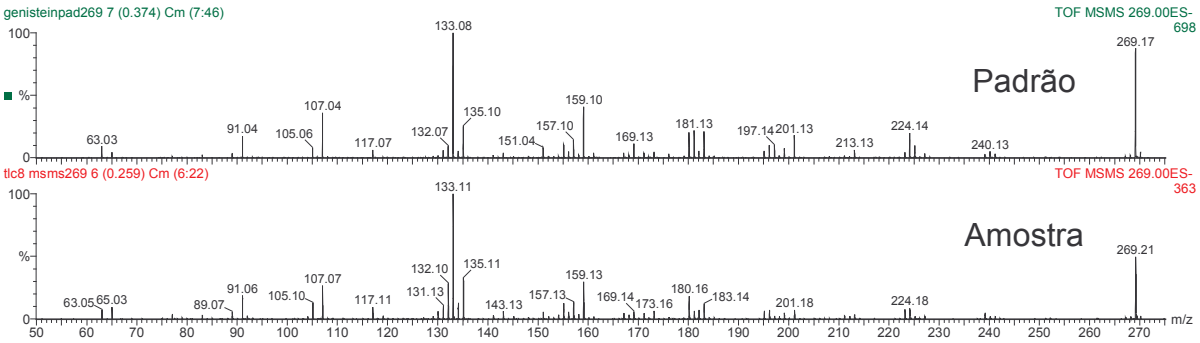


Figura 52: Espectro de massas de ESI/MS/MS em modo negativo do íon de *m/z* 269 proveniente da fragmentação da genisteína padrão e extrato de soja.

Outro composto testado junto com seu padrão foi a daidzeína de *m/z* 253 (Figura 53). Este composto mostrou um espectro de fragmentação igual ao de seu padrão confirmando a presença deste composto no extrato. Alguns dos fragmentos adquiridos podem ser observados na Figura 54 sendo eles *m/z* 91, 104, 117, 132, 133, 180, 195, 208 e 223.

Foi identificada também a presença de mais de um composto de interesse na mesma amostra, sendo que estes também foram confirmados através de espectros de MS/MS e comparados com os fragmentos de seus padrões. Estes compostos estão presentes aos pares, sendo que em uma das amostras foi confirmada a presença de daidzina e genistina e em outra a presença de daidzeína e genisteína.

Alguns dos compostos de interesse e que provavelmente estariam presentes nas amostras, não possuíam padrão comercial para comparação, sendo que estes foram comparados com espectros de fragmentação da literatura e com experimentos de MS/MS para a sua confirmação através de seu mecanismo de fragmentação. Estes compostos que não possuem padrão para confirmação da extração são ilustrados na Figura 55.

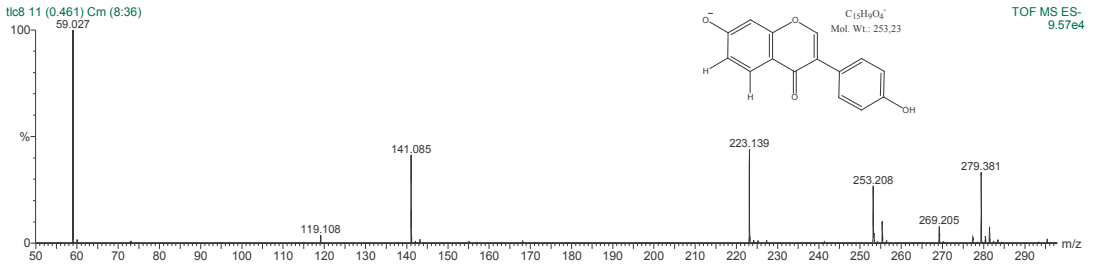


Figura 53: Espectro de massas de ESI/MS em modo negativo da amostra e seu padrão (daidzeína *m/z* 253).

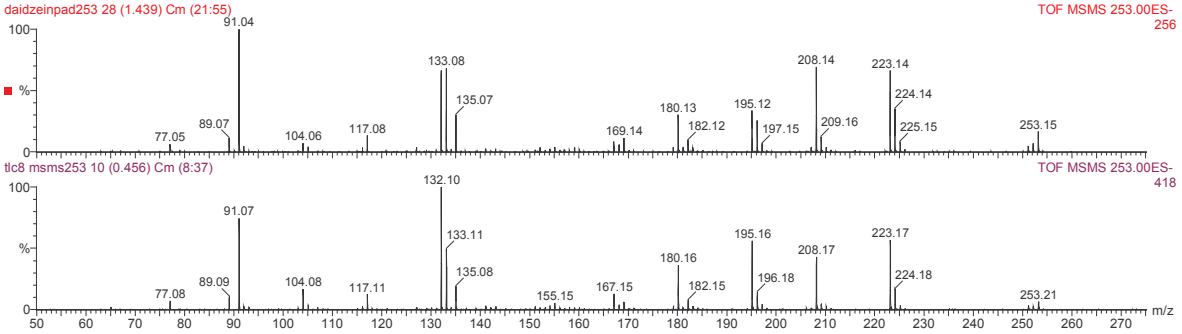


Figura 54: Espectro de massas de ESI/MS/MS em modo negativo do íon de *m/z* 253 proveniente da fragmentação da daidzeína padrão e extrato de soja.

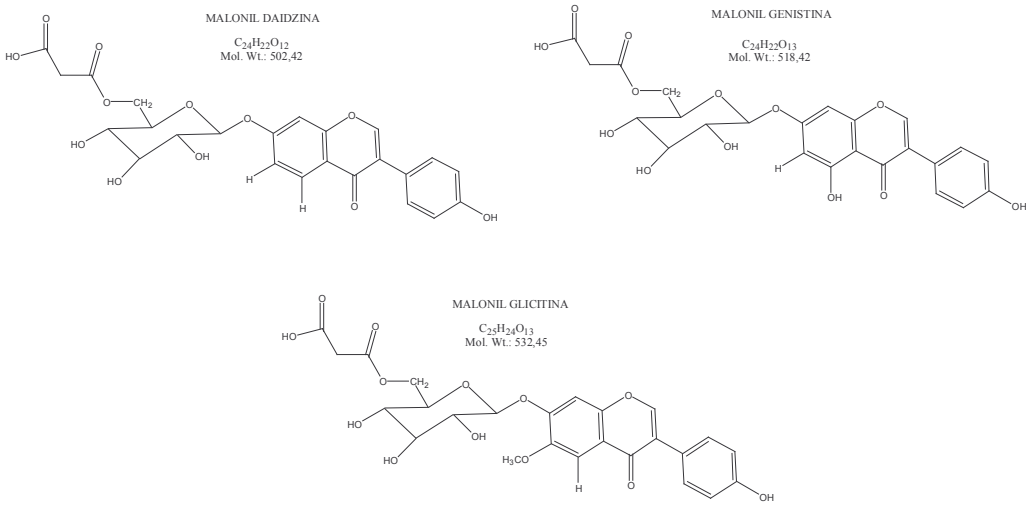


Figura 55: Estruturas dos compostos malonil-daidzina, malonil-genistina e malonil-glicitina.

O extrato que possuía a fração do composto malonil-daidzína (*m/z* 501), após o experimento de ESI/MS em modo negativo foi analisado e observou-se que este não possuía intensidade suficiente para confirmar sua presença na amostra. Provavelmente isto estava ocorrendo devido à alta supressão iônica de outros compostos presentes na amostra. Na tentativa de melhor confirmar a presença deste composto, foi realizado um experimento de ESI/MS/MS sendo selecionado este íon com baixa energia de colisão e assim foi possível observar o íon *m/z* 501. Após sua seleção (MS/MS) aumentou-se a energia de colisão para realizar a fragmentação deste íon. Na Figura 56 pode-se observar o íon de *m/z* 501 e seus fragmentos. Os espectros de MS/MS do malonil-genistína e malonil-glicitina estão mostrados nas Figuras 57 e 58, respectivamente.

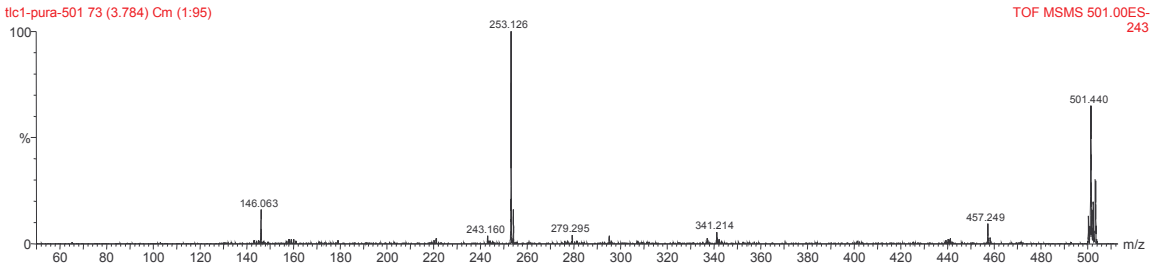


Figura 56: Espectro de massas de ESI/MS/MS do extrato contendo malonil-daidzina (*m/z* 501) e seus fragmentos.

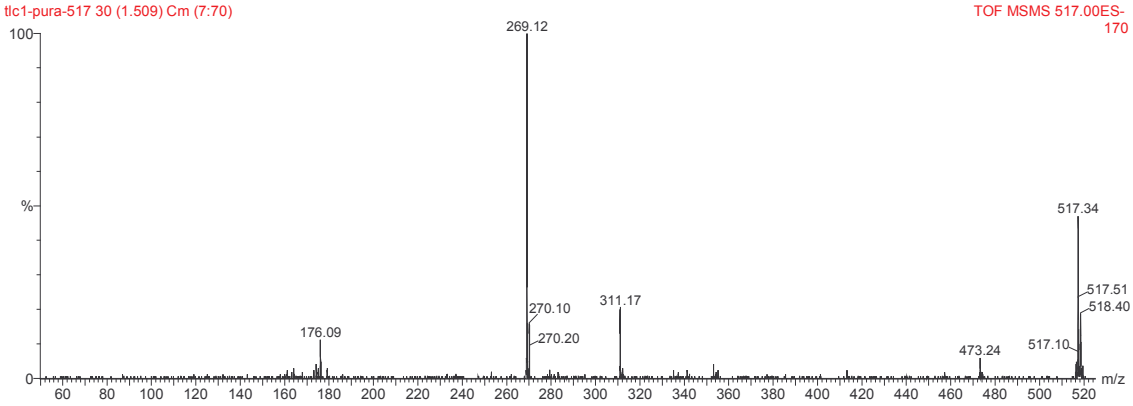


Figura 57: Espectro de massas de ESI/MS/MS do extrato contendo malonil-genistina (*m/z* 517) e seus fragmentos.

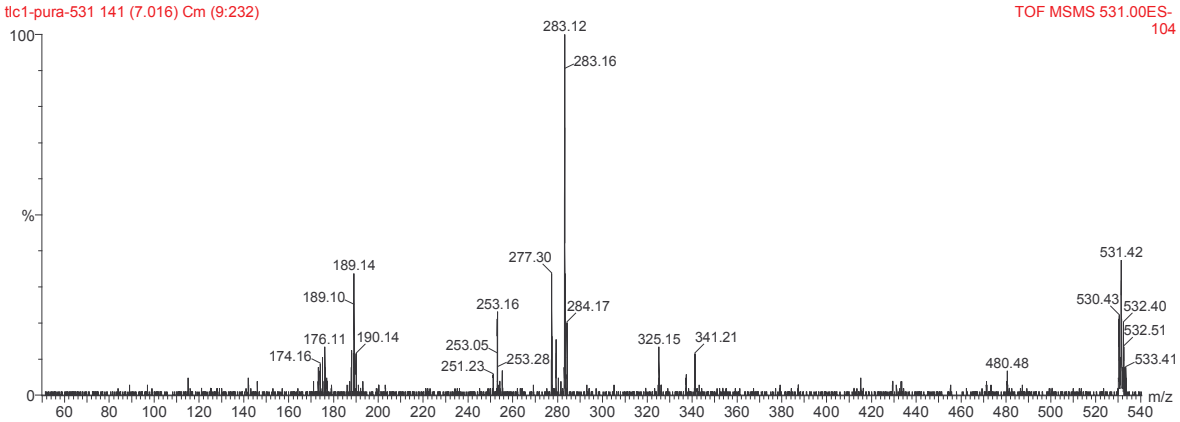


Figura 58: Espectro de massas de ESI/MS/MS do extrato contendo malonil-glicitina (*m/z* 531) e seus fragmentos.

Na Figura 59 pode-se observar melhor o mecanismo de fragmentação geral dos compostos: malonil-daidzina, malonil-genistina e malonil-glicitina, no qual ocorre a perda de 44 u correspondente ao CO_2 e a perda neutra de 248 u correspondente ao derivado glicosídico.

Após vários experimentos de ESI/MS e ESI-MS/MS das amostras analisadas, pode-se observar que os compostos de interesse extraídos da soja (isoflavonas conjugadas e agliconas), estão presentes nas frações das amostras analisadas, mostrando que a extração dos compostos era exeqüível, pois houve a confirmação da presença destes pela técnica de espectrometria de massas utilizada.

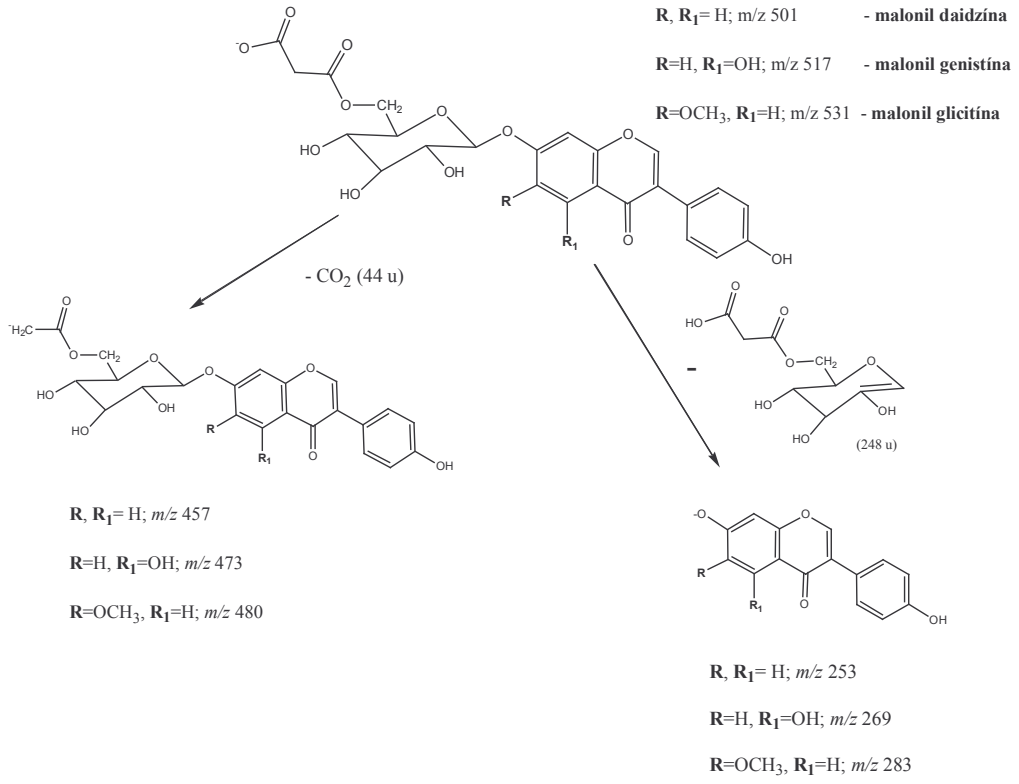


Figura 59: Mecanismo geral de fragmentação para os compostos; malonil-daidzina, malonil-genistina e malonil-glicitina.

5.6 Atividades Biológicas dos Extratos de Soja

5.6.1 Atividade antioxidante do extrato metanólico de soja fermentada

As atividades antioxidantes dos extratos metanólicos de farinha desengordurada de soja foram medidas antes e após fermentação (Tabela 30). O extrato metanólico de farinha de soja após a fermentação mostrou maior atividade antioxidante que antes da fermentação. Estes resultados são devido à conversão de glicosil isoflavonas a agliconas, as quais têm maior atividade antioxidante, como tem sido observado em testes anteriores (Park et al., 2001a) e relatada por outros pesquisadores (Hsu et al., 2000; Shahidi e Wanasundara, 1992; Esaki et al., 1990; Murakani et al., 1984; Pratt e Birac, 1979).

Tabela 30: Atividade antioxidante de extratos metanólicos de isoflavonas.

Extratos de soja	Razão de branqueamento	Índice antioxidante[a]
Controle	0,43	1,0
121ºC, 40 min	0,29	1,48
Após reação enzimática[b]	0,16	2,69

[a]Oxidação acoplada de caroteno e ácido linoleico. Índice antioxidante equivale à razão entre a taxa de branqueamento do β-caroteno do controle pela taxa de branqueamento do β-caroteno na solução teste, medidos a 470 nm. [b]Reação enzimática composta pelo extrato concentrado (500 $mg.mL^{-1}$) e b-glicosidase de *A. oryzae* ATCC 22786 (0,5 $UI.mL^{-1}$) por 20 min a 40ºC.

Quanto maior o poder antioxidante da substância teste maior será a manutenção da cor característica do β-caroteno, pela menor degradação do mesmo. Foram avaliadas seis condições para verificar o efeito da composição de isoflavonas e a relação com a manutenção do β-caroteno. Três extratos metanólicos de soja desengordurada e tratada com β-glicosidase apresentaram atividades antioxidantes mais alta que as outras três amostras que não tinham sido tratadas com a enzima fúngica. Das amostras tratadas com enzima, o extrato metanólico da farinha de soja tratada a 121°C mostrou alta atividade antioxidante e foi a que continha maior teor de isoflavonas agliconas (1365 μg/g) quando comparado às amostras tratadas a 100°C e a temperatura ambiente (Tabela 31).

Tabela 31: Atividade antioxidante dos extratos metanólicos de soja hidrolisados e submetidos a diferentes temperaturas.

Extratos de soja	**Razão de branqueamento**	**Índice antioxidante**[a]
Controle	0,43	1,0
100ºC, sem enzima	0,31	1,38
100ºC, com enzima	0,23	1,85
121ºC, sem enzima	0,28	1,50
121ºC, com enzima	0,18	2,43

[a]Oxidação acoplada de caroteno e ácido linoleico. Índice antioxidante equivale à razão entre a taxa de branqueamento do β-caroteno do controle pelo taxa de branqueamento do β-caroteno na solução teste, medidos a 470 nm.

É aparente que o tratamento dos extratos metanólicos de soja tratada a 121°C e com a β-glicosidase, mostrou maior atividade antioxidante. Isto se deve ao fato que, o extrato continha maior quantidade de isoflavonas agliconas.

Foi observado que a β-glicosidase de *Aspergillus oryzae* ATCC 22786 foi capaz de hidrolisar todas glicosil-isoflavonas em agliconas nas farinhas de soja tratadas a 121°C. Glicosil-isoflavonas em alimentos a base de soja são pouco hidrolisadas pelas enzimas digestivas intestinais de mamíferos (Brown, 1988), no entanto, β-glicosidases da microflora intestinal no intestino grosso podem hidrolisar isoflavonas glicosiladas a agliconas e promover a absorção destas (Friend e Chang, 1984). Porém, bactérias intestinais humanas podem metabolizar e degradar isoflavonas. Então, é razoável deduzir que a microflora intestinal influencia profundamente na biodisponibilidade de isoflavonas (Xu et al., 1995). Foi reportado que *Lactobacillus* sp., *Bacteroides* sp. e *Bifidobacterium* sp., produzem β-glicosidase e desempenham importante papel na hidrólise intestinal de numerosos compostos β-glicosilados encontrados em vegetais da dieta humana, como glicosil flavonóides e isoflavonas para produzir formas agliconas (Hawksworth et al., 1971), as quais apresentam maiores atividades biológicas.

Desta forma, isoflavonas agliconas são mais desejáveis em alimentos a base de soja quando comparadas a outras formas de isoflavonas, devido ao

aumento na atividade antioxidante além do possível aumento na biodisponibilidade destes compostos.

5.6.2 Atividade anti-inflamatória dos extratos de soja

O processo inflamatório tem sido relacionado a diferentes grupos de substâncias, e entre elas a hialuronidase, é uma enzima com características particularmente associadas à processo inflamatórios em mamíferos. Esta enzima atua despolimerizando o ácido hialurônico, um mucopolissarídio encontrado no tecido conjuntivo, com diminuição da sua viscosidase, provocando assim o atrito das juntas e acarretando em problemas como a atrite reumatóide e artrose, ou até mesmo a formação de edemas e sensação de dor. A importância da inibição desta enzima está ligada à ação hidrolítica do ácido hialurônico (Arkins e Sheehan, 1972).

Da mesma forma que foi verificada para a atividade antioxidante, todas as amostras de extrato de soja apresentaram alguma capacidade anti-inflamatória, em diferentes níveis. Como pode ser verificado pela Tabela 32, os valores da porcentagem de inibição da hialuronidase não sofreram grandes variações nos diferentes tratamentos associando aquecimento e ação de β-glicosidase.

Tabela 32: Atividade anti-inflamatória dos extratos de soja.

Amostras	Inibição da hialuronidase (%)
26ºC; sem enzima	23,9
26ºC; com enzima	14,4
100ºC; sem enzima	24,1
100ºC; com enzima	24,8
121ºC; sem enzima	22,3
121ºC; com enzima	19,6

A atividade anti-inflamatória de extratos de própolis pode ser em parte explicada pela presença de derivados do ácido cinâmico e hidrocinâmico (Kakegawa et al., 1985). Outra explicação para a atividade anti-inflamatória de própolis, seria a proposta de Kuppusamy et al. (1990), que flavonóides com dupla ligação no carbono C2,3, grupos hidroxilas nas posições 5, 7, 4' e um grupo cetona na posição 4 possuem um forte efeito inibitório sobre a enzima hialuronidase; como por exemplo, os flavonóides apigenina e kampferol. Entretanto, para as amostras de extrato de soja, analisadas neste estudo, apesar de apresentarem significativa inibição da atividade da enzima hialuronidase, não foi possível estabelecer uma relação entre a estrutura das isoflavonas de soja com a capacidade de inibir tal enzima. Observando os valores de inibição de hialuronidase (Tabela 33) para os extratos de soja tratados com β-glicosidase em diferentes intervalos de

tempo (10, 20 e 30 min), era de se esperar um aumento significativo na inibição da enzima, no entanto, os valores obtidos se mantiveram quase que constantes. Independentemente da forma em que se apresenta as isoflavonas, ou seja, glicosiladas ou agliconas, a inibição da hialuronidase se manteve praticamente invariável. A partir dos resultados apresentados não se pode afirmar que as isoflavonas sejam os principais responsáveis pela atividade anti-inflamatória dos extratos de soja, visto que outros componentes da soja podem estar associados a esta propriedade biológica.

Tabela 33: Atividade anti-inflamatória dos extratos de soja.

Tempo de reação enzimática	Inibição da hialuronidase (%)
Controle	88,1
10 min	88,2
20 min	90,2
30 min	89,9

A variação dos valores de inibição de hialuronidase pode estar associada a não somente a perda no conteúdo de isoflavonas após o aquecimento (121ºC), mas bem como, a perda ou alteração estrutural de outros componentes químicos presentes naquelas amostras. Segundo Wu et al. (1992) a atividade anti-inflamatória estar associada à efeitos estéricos do grupo alquila sobre o nitrogênio

e de substituintes na posição 2 de isoflavonas. Da mesma forma que Wu et al. (1992) não encontraram correlação entre a atividade anti-inflamatória com a presença de isoflavonas, Montandon et al. (1989) em testes em ratos, não verificaram uma associação da atividade anti-inflamatória com amostras contendo isoflavonas.

Neste caso, estudos mais detalhados ainda são necessários para identificação do(s) composto(s) presentes nos extratos alcoólicos de soja, que inibam a atividade de hialuronidase, bem como o estabelecimento de seu(s) mecanismo(s) de ação.

5.6.3 Atividade antimicrobiana dos extratos de soja

A atividade inibitória dos extratos de isoflavonas sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, coagulase positiva, foi testada de acordo com método descrito por Park et al. (1998). A atividade inibitória para *S. aureus* foi verificada pela formação de halo inibitório ao redor dos discos de papel contendo os extratos alcoólicos de soja. Os extratos de soja analisados apresentaram características diferenciadas de outras amostras de própolis analisadas no Laboratório de Bioquímica de Alimentos da Unicamp, visto que a formação de halo ao redor dos discos não foi nitidamente verificada, no entanto, ocorre uma inibição parcial do crescimento da bactéria-teste. A Figura 60 ilustra uma placa de Petri contendo os discos dos extratos de soja com a inibição parcial do crescimento de *S. aureus* ATCC 25923. Em

comunicação pessoal, o Dr. M. H. Koo, da University of Rochester (Estados Unidos), afirmou que isoflavonas, como genisteína e daidzeína, foram capazes de inibir o crescimento de bactérias orais (*Streptococcus mutans*), no entanto, esta inibição estaria associada à modificações ocorridas nos polissacarídeos produzidos por esta bactéria, para facilitar a aderência aos dentes, durante a formação da cárie dental.

Figura 60: Antibiograma das amostras de extratos alcoólicos de soja. C, amostra controle; SC10, disco contendo 10 mg de extrato concentrado de soja sem reação enzimática; SR10, disco contendo 10 mg de extrato concentrado de soja após reação enzimática (0,25 $UI.mL^{-1}$, 40ºC, 30 min); SC20, disco contendo 20 mg de extrato concentrado de soja sem reação enzimática; SR20, disco contendo 20 mg de extrato concentrado de soja após reação enzimática (0,25 $UI.mL^{-1}$, 40ºC, 30 min).

Foi possível verificar que quanto maior a concentração dos extratos de soja aplicados aos discos (SC20 e SR20), maior foram as alterações no crescimento microbiano. Por outro lado, a modificação enzimática das isoflavonas glicosiladas em agliconas, aparentemente não produziu qualquer alteração na atividade antimicrobiana das isoflavonas. As amostras SC (antes da reação com β-glicosidase) apresentaram da mesma forma, a formação de halo ao redor dos discos, conforme os discos com extratos SR, os quais compreendem amostras de extratos alcoólicos de soja que sofreram tratamento enzimático por 30 min a 40ºC, para conversão das glicosil-isoflavonas em agliconas, as quais apresentaram maiores atividades antioxidantes.

6. CONCLUSÕES

Certamente, a soja é uma importante fonte de isoflavonas, sendo que a ação destes compostos na célula dependente do tecido alvo e da forma isomérica em que se encontra, visto que diferentes estudos mostram que dependendo da forma, aglicona ou conjugada, a atividade biológica será maior ou menor. Neste estudo foi possível estabelecer as seguintes conclusões, de acordo com os objetivos definidos.

1. Os cultivares de soja brasileiros apresentaram grande variação no conteúdo de isoflavonas.
2. Dos sistemas de extração de isoflavonas de farinha de soja e seus produtos, os sistemas compostos por etanol 60% e metanol 80% foram os sistemas que extraíRAM as maiores concentrações de isoflavonas. Os sistemas de solventes acidificados apresentaram-se como uma boa opção para a extração de isoflavonas, desde que a conversão das glicosil-isoflavonas a agliconas não seja um impedimento.
3. Temperaturas elevadas podem causar uma alteração na composição de isoflavonas em farinha de soja. Por outro lado, o tratamento com radiação gama não causou alteração na composição de isoflavonas em farinha de soja, no entanto, a composição de isoflavonas foi levemente alterada quando radiação gama foi aplicada no extrato concentrado de isoflavonas, cujo teor de umidade foi muito superior ao da farinha de soja.

4. Beta-glicosidase de *Aspergillus oryzae* ATCC 22786 foi capaz de hidrolisar as glicosil-isoflavonas de soja às suas formas agliconas.

5. As isoflavonas de soja apresentaram alta atividade antioxidante quando se apresentam na forma aglicona; no entanto, não foi possível estabelecer uma correlação entre a presença de isoflavonas de soja e a atividade anti-inflamatória apresentada pelas amostras estudadas. A atividade antimicrobiana, contra *Staphylococcus aureus*, foi notada nas amostras de isoflavonas de soja, muito embora, seja caracterizada por uma inibição parcial do crescimento bacteriano.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLERCREUTZ, H. Phytoestrogens: epidemiology and a possible role in cancer protection. **Environmental Health Perspective Supplement**, v. 103, n. 7, p. 103-112, 1995.

AGOSTINI-COSTA, T. S.; SANTOS, J. R.; GARRUTI, D. S.; FEITOSA, T. Caracterização, por cromatografia em camada delgada, dos compostos fenólicos presentes em pedúnculos de caju (*Anacardium ocidentale* L.). **Boletim do CEPPA**, v. 18, n. 1, p. 129-137, 2000.

AGRAWAL, K. M. L.; BAHL, O. M. P. Glycosidases of *Phaseolus vulgaris.* Isolation and general properties. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 243, n. 1, p. 103-111, 1968.

AGRIANUAL. FNP: São Paulo, 2002. 435 p.

AGUIAR, C. L. Biodegradation of the cellulose from sugarcane bagasse by fungal cellulase. **Ciencia y Tecnologia Alimentaria**, v. 3, n. 2, p. 117-121, 2001.

AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; PACHECO, T. A. R. C.; PARK, Y. K. Perdas de isoflavonas durante processamento de alimentos de soja. **IV Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos**, v. 1, p. 99, 2001.

AGUIAR, C. L.; MENEZES, T. J. B. Produção de celulases e xilanase por *Aspergillus niger* IZ-9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana-de-açúcar. **Boletim do CEPPA**, v. 18, n. 1, p. 57-70, 2000.

AHLUWALIA, V. K.; BHASIN, M. M.; SESHADRI, T. R. Isoflavones of soybeans. **Current Science**, v. 22, n. 4, p. 263-265, 1953.

AMAROWICZ, R.; SHAHIDI, F. A rapid chromatographic method for separation of individual catechins from green tea. **Food Research International**, v. 29, n. 1, p. 71-76, 1996.

ANDERSON, J.; JOHNSTONE, B.; COOK-NEWELL, M. Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. **New England Journal of Medicine**, v. 333, p. 276-282, 1995.

ANDERSSON, M.; ADLERCREUTZ, P. A kinetic study of almond-beta-glucosidase catalysed synthesis of hexyl-glycosides in low aqueous media: Influence of glycosyl donor and water activity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 14, p. 69-76, 2001.

ANDLAUER, W.; FÜRST, P. Antioxidative power of phytochemicals with special reference to cereals. **Cereal Foods World,** v. 43, p. 356-360, 1998.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Informe do Workshop sobre Isoflavonas**, p. 1-4, 2002.

ARDITI, T.; MEREDITH, T.; FLOWERMAN, P. Renewed interest in soy isoflavones and saponins. **Cereal Foods World**, v. 45, n. 9, p. 414-417, 2000.

ARKINS, E.; SHEEHAN, J. Structure of hyaluronic acid. **Nature New Biology**, v. 235, p. 253-260, 1972.

ARONSON, N. N.; DAVIDSON, E. A. Lysossomal hyaluronidase from rat liver. **Journal of Biology Chemistry**, v. 242, n. 3, p. 437-440, 1967.

AUSSENAC, T.; LACOMBE, S.; DAYDÉ, J. Quantification of isoflavones by cappilary zone electrophoresis in soybean seeds: effects of variety and environment. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 68, p. 1480-1485, 1998.

BAHL, O. M. P.; AGRAWAL, K. M. L. Glycosidases of *Phaseolus vulgaris.* Isolation and characterization of beta-N-acetylglucosaminidase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 243, n. 1, p. 98-102, 1968.

BARBUCH, R. J.; COUNTANT, J. E.; SETCHELL, K. D. R.; WELSH, M. B. The use of thermospray LC/MS/MS for the class identification and structural verification of phytoesterogens in soy protein preparations. **Biomedicine Mass Spectrometry**, v. 18, p. 973-977, 1989.

BARNES, S. Evolution of the health benefits of soy isoflavones. **Proceedings Society Experimental Biological Medicine**, v. 217, n. 3, p. 386-392, 1998.

BARNES, S. Effect of genistein on in vitro and in vivo models of cancer. **Journal of Nutrition**, v. 125, p. 777-783, 1995.

BARNES, S.; KIRK, M.; COWARD, L. Isoflavones and their conjugates in soy foods: extraction conditions and analysis by HPLC-Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 11, p. 2466-2474, 1994.

BLANCHARD, J. E.; WITHERS, S. G. Rapid screening of the aglycone specificity of glycosidases: applications to enzymatic synthesis of oligosaccharides. **Chemistry and Biology**, v. 8, p. 627-633, 2001.

BRACKE, M. E.; DEPYPERE, H. T.; BOTERBERG, T.; VAN MARCK, V. L.; VENNEKENS, K. M.; VANLUCHENE, E.; NUYTINCK, M.; SERREYN, R.; MAREEL, M. M. Influence of tangeretin on tamoxifen's therapeutic benefit in mammary cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 91, p. 354-359, 1999.

BROWN, J. P. Hydrolysis and esters. IN: **Role of the gut flora in toxicity and cancer**. eds. Rowland, I. R., Academic Press, p. 109-144, 1988.

CARRÃO-PANIZZI, M. C. Apresentação. **Documentos da Embrapa**, v. 169, n. 1, p. 6-7, 2001.

CARRÃO-PANIZZI, M. C.; BORDINGNON, J. R. Activity of beta-glucosidase and levels of isoflavone glucosides in soybean cultivars affected by the environment. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 873, 2000.

CARRÃO-PANIZZI, M. C.; BELEIA, A. D.; KITAMURA, K.; OLIVEIRA, M. C. N. Effects of genetics and environment on isoflavone content of soybean from different regions of Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n. 10, 1787-1795, 1999.

CARRÃO-PANIZZI, M. C.; KITAMURA, K.; BELEIA, A. D.; OLIVEIRA, M. C. N. Influence of growth locations on isoflavone contents in Brazilian soybeans cultivars. **Breeding Science**, v. 48, p. 409-413, 1998.

CARRÃO-PANIZZI, Mercedes Concórdia. **Isoflavonóides em soja (*Glycine max* (L.) Merrill): Variabilidade genética e ambiental de cultivares e efeitos no processamento do extrato solúvel**. Londrina, 1996, 123 p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina.

CATI. Coordenadoria de Assistência Técnica Integral. 2002. Informação retirada em 03 de março de 2002, de http://www.cati.sp.gov.br.

CELEGHINI, R. M. S.; VILEGAS, J. H. Y.; LANÇAS, F. M. Extraction and quantitative HPLC analysis of coumarin in hydroalcoholic extracts of *Mikania glomerata* Spreng. ("guaco") leaves. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 12, n. 6, p. 706-709, 2001.

CHU, Y. H.; CHANG, C. L.; HSU, H. F. Flavonoid content of several vegetables and their antioxidant activity. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 3, p. 561-566, 2000.

CLARKSON, T. B.; ANTHONY, M. S.; WILLIAMS, J. K.; HONORÉ, E. K. The potential of soybean phytoestrogens for postmenopausal hormone replacement therapy. **Proceedings of Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 217, p. 365-368, 1998.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. 2003. Informação retirada em 27 de dezembro de 2003, de http://www.conab.gov.br.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. 2002. Informação retirada em 03 de março de 2002, de http://www.conab.gov.br.

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

COWARD, L.; BARNES, N. C.; SETCHELL, K. D. R.; BARNES, S. Genistein, daidzein, and their beta-glycoside conjungates: antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, p. 1961-1967, 1993.

CRAWFORD, L. M.; RUFF, E. H. A review of the safety of cold pasteurization through irradiation. **Food Control**, v. 7, p. 87-97, 1996.

CUPPETT, S.; SCHNEPF, M.; HALL, C. Natural antioxidants: are they a reality? IN: **Natural antioxidants: chemistry, health effects, and applications**. eds. Shahidi, F., AOCS Press, p. 13-24, 1997.

DAY, A. J.; CANADA, F. J.; DIAZ, J. C.; KROON, P. A.; MCLAUCHLAN, R.; FAULDS, C. B.; PLUMB, G. W.; MORGAN, M. R. A.; WILLIAMSON, G. Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. FEBS Letters**, v. 468, p. 166, 2000.**

DE ROODE, B. M.; VAN DER MEER, T. D.; KAPER, T.; FRANSSEN, M. C. R.; VAN DER PADT, A.; VAN DER OOST, J.; BOOM, R. M. The catalytic potency of beta-glucosidase from *Pyrococcus furiosus* in the direct glucosylation reaction. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, p. 621-624, 2001.

DENIS, L.; MORTON, M. S.; GRIFFITHS, K. Diet and its preventive role in prostatic disease. **European Urology**, v. 35, n.5-6, p. 377-387, 1999.

DEWICK, P. M. Isoflavonoids. IN: **The flavonoids: advances in research since 1986**. eds. Harborne, J. B., Chapman and Hall, p. 203, 1993.

DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A. A.; CAPASSO, F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Science**, v. 65, n. 4, p. 337-353, 1999.

ELDRIDGE, A. C. Determination of isoflavones in soybean flours, protein-concentrates, and isolates. **Journal of the American Chemical Society**, v. 183, p. 90, 1982.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 2002. Informação retirada em 03 de março de 2002, de http://www.cnpso.embrapa.br/tab02.htm.

ESAKI, H.; KAWAKISHI, S.; MORIMITSU, Y; OSAWA, T. New potent antioxidative O-dihydroxyisoflavones in fermented Japanese soybean products. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 63, n. 9, p. 1637-1639, 1999a.

ESAKI, H.; WATANABE, R.; ONOZAKI, H.; KAWAKISHI, S.; OSAWA, T. Formation mechanism for potent antioxidative O-dihydroxyisoflavones in soybeans fermented with *Aspergillus saitoi*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 63, n. 5, p. 851-858, 1999b.

ESAKI, H.; ONOZAKI, H.; MORIMITSU, Y.; KAWAKISHI, S.; OSAWA, T. Potent antioxidative isoflavones from soybeans fermented with *Aspergillus saitoi*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 62, n. 4, p. 740-746, 1998.

ESAKI, H.; ONOZAKI, H.; KAWAKISHI, S.; OSAWA, T. New antioxidant isolated from Tempeh. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 3, p. 696-700, 1996.

ESAKI, H.; NOHARA, Y.; ONOZAKI, H.; OSAWA, T. Antioxidative activity of natto. **Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi,** v. 37, n. 6, p. 474-477, 1990.

FAN, X.; ARGENTA, L.; MATTHEIS, J. Impacts of ionizing radiation on volatile production by ripening Gala apple fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 254-262, 2001.

FARMAKALIDIS, E.; MURPHY, P. A. Isolation of 6-O-acetylgenistin and 6-O-acetyldaidzin from toasted defatted soyflakes**. Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 33, p. 385-389, 1985.

FERGUSON, L. R. Role of plant polyphenols in genomic stability. **Mutation Research**, v. 475, p. 89-111, 2001.

FRANCO, G. **Tabela de composição química de alimentos**. Atheneu, p. 145, 1986.

FRIEND, D. R.; CHANG, G. W. A colon-specific drug-delivery system based on drug glycosides and the glycosidases of colonic bacteria. **Journal of Medical Chemistry**, v. 27, p. 261-266, 1984.

FUHRMAN, B.; LAVY, A.; AVIRAM, M. Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 61, p. 549, 1995.

FUKUTAKE, M.; TAKAHASHI, M.; ISHIDA, K.; KAWAMURA, H.; SUGIMURA, T.; WAKABAYASHI, K. Quantification of genistein and genistin in soybeans and soybean products. **Food and Chemical Toxicology**, v. 34, n. 5, p. 457-461, 1996.

GAMET-PAYRASTRE, L.; MANENTI, S.; GRATACAP, M.P.; TULLIEZ, J.; CHAP, H.; PAYRASTRE, B. Flavonoids and the inhibition of PKC and PI 3-kinase. **General Pharmacology**, v. 32, p. 279-286, 1999.

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

GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Isoflavones in soy-based foods consumed in Brazil. I. Levels, distribution, and estimated intake. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 9, p. 5987-5993, 2002.

GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Determinação de isoflavonas em derivados de soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 1, p. 86-93, 2001a.

GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Isoflavonas da soja: fatores que influem nos tipos e teores em alimentos. **Food Ingredients**, v. 11, p. 62-64, 2001b.

GONG, C. S.; TSAO, G. T. Cellulase and biosynthesis regulation. **Annual Reports on Fermentation Processes**, v. 3, p. 111-139, 1975.

GOYAL, K.; SELVAKUMAR, P.; HAYASHI, K. Characterization of a thermostable beta-glucosidase (BglB) from *Thermotoga maritima* showing transglycosilation activity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 15, p. 45-53, 2001.

GREENWOOD, S.; BARNES, S.; CLARKSON, T. B.; EDEN, J.; HELFERICH, W. G.; HUGHES, C.; MESSINA, M.; SETCHELL, K. D. R. The role of isoflavones in menopausal health: consensus opinion of the North American Menopause Society. **The Journal of the North American Menopause Society**, v. 7, n. 4, p. 215-229, 2000.

GRIFFITH, A. P.; COLLISON, M. W. Improved methods for the extraction and analysis of isoflavones from soy-containing foods and nutritional supplements by reversed-phase high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 913, n. 6, p. 397-413, 2001.

GRÜN, I. U.; ADHIKARI, K.; LI, C.; LI, Y.; LIN, B.; ZHANG, J.; FERNANDO, L. N. Changes in the profile of genistein, daidzein, and their conjugates during thermal processing of tofu. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 7, p. 2839-2843, 2001.

GUGLER, R.; LESCHIK, M.; DENGLER, H. J. Disposition of quercetin in man after single oral and intravenous doses. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 9, n.2-3, p. 229-234, 1975.

GYÖRGY, P.; MURATA, K.; IKEHATA, H. Antioxidants isolated from fermented soybeans (tempeh). **Nature**, v. 203, n. 22, p. 870-872, 1964.

HAMADA, H.; MIYAMOTO, Y.; NAKAJIMA, N.; FURUYA, T. Highly selective transformation by plant catalysts. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 5, n. 1-4, p. 187-189, 1998.

HAMISSA, F. A.; EL-ABYAD, M. S.; ABDU, A.; GAD, A. S. Raising potent UV mutants of *Aspergillus niger* van Tieghem for citric acid production from beet molasses. **Bioresource Technology**, v. 39, p. 209-213, 1992.

HAMMERSCHMIDT, P. A.; PRATT, D. E. Phenolic antioxidants of dried soybeans. **Journal of Food Science**, v. 3, p. 556-559, 1978.

HAN, K. K.; KATI, L. M.; HAIDAR, M. A.; GIRÃO, M. J. B. C.; BARACAT, E. C.; YIM, D. K.; CARRÃO-PANIZZI, M. C. Efeito de isoflavona sobre os sintomas da síndrome de climatério. **Documentos da Embrapa**, v. 169, n. 1, p. 28-32, 2001.

HARBORNE, J. B. **The flavonoids: advances in research since 1986**. Chapman and Hall, p. 543, 1993.

HARHANGI, H. R.; STEENBAKKERS, P. J. M.; AKHMANOVA, A.; JETTEN, M. S. M.; VAN DER DRIFT, C.; OP DEN CAMP, H. J. M. A highly expressed family 1 beta-glucosidase with transglycosylation capacity from the anaerobic fungus *Piromyces* sp. E2. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1574, p. 293-303, 2002.

HAWKSWORTH, G.; DRASAR, B. S.; HILL, M. J. Intestinal bacteria and the hydrolysis of glycosidic bonds. **Journal of Medicine Microbiology**, v. 4, p. 451-459, 1971.

HEINONEN, S.; WÄHÄLÄ, K.; ADLERCREUTZ, H. Identification of isoflavone metabolites dihydrodaidzein, dihydrogenistein, 6'-OH-O-dma, and cis-4-OH-equol in human urine by CG-MS using authentic reference compounds. **Analytical Biochemistry**, v. 274, n. 2, p. 211-219, 1999.

HELLER, W.; FORKMANN, G. **The flavonoids: advances in research since 1980**. Chapman and Hall, p. 399, 1988.

HENDRICKSON, J. B.; CRAM, D. J.; HAMMOND, G. S. Physical properties and molecular structure. IN: **Organic Chemistry**. McGraw-Hill, p. 231-298, 1970.

HENRY, C. M. Nutraceuticals: fact or trend? **Chemical and Engineering News**, v. 21, p. 42-47, 1999.

HERRMANN, A. P.; WILLEMS, M.; JANKE, H. D. Degradation of natural polyphenols by methanogenic consortia enriched from digested municipal sludge. **Water Research**, v. 35, n. 11, p. 2575-2582, 2001.

HIROTA, A.; TAKI, S.; KAWAII, S.; YANO, M.; ABE, N. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical-scavenging compounds from soybean miso and antiproliferative activity of isoflavones from soybean miso toward the cancer cell lines. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 64, n. 5, p. 1038-1040, 2000.

HSIEH, M. C.; GRAHAM, T. L. Partial purification and characterization of a soybean β-glucosidase with high specific activity towards isoflavone conjugates. **Phytochemistry**, v. 58, p. 995-1005, 2001.

HSU, J. T.; YING, C.; CHEN, C. J. Regulation of inducible nitric oxide synthase by dietary phytoestrogen in MCF-7 human mammary cancer cells. **Reproductive Nutritional Development**, v. 40, p. 11-18, 2000.

HUI, E.; HENNING, S.M.; PARK, N.; HEBER, D.; GO, V. L. W. Genistein and daidzein/glycitein content in tofu. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 14, n. 4, p. 199-206, 2001.

HUTABARAT, L. S.; GREENFIELD, H.; MULHOLLAND, M. Isoflavones and coumestrol in soybeans and soybean products from Australia and Indonesia. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 14, n. 1, p. 43-58, 2001.

IBE, S.; KUMADA, K.; YOSHIBA, M.; ONGA, T. Production of natto which contains a high level of isoflavone aglycones. **Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi**, v. 48, n. 1, p. 27-34, 2001.

IKEDA, R.; OHTA, N.; WATANABE, T. Changes of isoflavones at various stages of fermentation in defatted soybeans. **Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi**, v. 42, n. 5, p. 322-327, 1995.

IOKU, K.; PONGPIRIYADACHA, Y.; KONISHI, Y.; TAKEI, Y.; NAKATANI, N.; TERAO, J. Beta-glucosidase activity in the rat small intestine toward quercetin monoglucosides. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 62, n. 7, p. 1428-1431, 1998.

IWASHITA, K.; SHIMOI, H.; ITO, K. Extracellular soluble polysaccharide (ESP) from Aspergillus kawachii improves the stability of extracellular beta-gluocosidases (EX-1 and EX-2) and is involved in their localization. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 91, n. 2, p. 134-140, 2001.

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

KAKEGAWA, H.; MITSUO, N.; MATSUMOTO, H.; SATO, H. T.; AKAGI, M.; TASAKA, K. Hyaluronidase-inhibitory and anti-allergic activity of the photo-irradiated products of tranilast. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 33, n. 9, p. 3738-3744, 1985.

KATAGIRI, Y.; IBRAHIM, R.K.; TAHARA, S. HPLC analysis of while lupin isoflavonoids. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 64, n. 4, p. 1118-1125, 2000.

KISO, T.; KITAHATA, S.; OKAMOTO, K.; MIYOSHI, S.; NAKANO, H. Hydrolysis of beta-glucosyl ester linkage of p-hydroxybenzoyl beta-D-glucose, a chemically synthesized glucoside, by beta-glucosidases. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 90, n. 6, p. 614-618, 2000.

KIYOSAWA, I.; MATSUYAMA, J.; ARAI, C.; SETOGUCHI, T. Suppressive effects of the methanolic extracts from soybean products on SOS response of *Salmonella typhimurium* induced by mutagens and their contents of isoflavones. **Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi**, v. 42, n. 10, p. 835-842, 1995.

KLUS, K.; BARZ, W. Formation of polyhydroxylated isoflavones from the isoflavones genistein and biochanin A by bacteria isolated from tempe. **Phytochemistry**, v. 47, n. 6, p. 1045-1048, 1998.

KOO, H.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; AMBROSANO, G. M. B.; MURATA, R. M.; YATSUDA, R.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M.; PARK, Y. K. Effect of a new variety of *Apis mellifera* propolis on mutans streptococci. **Current Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 192-196, 2000.

KRISHNA, S. H.; REDDY, T. J.; CHOWDARY, G. V. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic wastes to ethanol using a thermotolerant yeast. **Bioresource Technology**, v. 77, n. 2, p. 193-196, 2001.

KUDOU, S.; SHIMOYAMADA, M.; IMURA, T.; UCHIDA, T.; OKUBO, K. A new isoflavone glycoside in soybean seeds (*Glycine max* Merrill), glycitein 7-O-beta-D-(6''-O-acetyl)-glucopyranoside. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 55, n. 3, p. 859-860, 1991a.

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

KUIPER, G.; CARLSSON, B.; GRANDIEN, K.; ENMARK, E.; HAGGBLAD, J.; NILSSON, S.; GUSTAFSSON, J. Comparison of theligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β. **Endocrinology**, v. 38, p. 863-870, 1997.

KULLING, S. E.; HONIG, D. M.; METZLER, M. Oxidative metabolism of the soy isoflavones daidzein and genistein in humans *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 3, p. 3024-3033, 2001.

KUPPUSAMY, U. R.; KHOO, H. E.; DAS, N. P. Structure-activity studies of flavonoids as inhibitors of hyaluronidase. **Biochemical Pharmacology**, v. 40, n. 2, p. 397-401, 1990.

LAMBERT, N.; KROON, P. A.; FAULDS, C. B.; PLUMB, G. W.; MCLAUCHLAN, R. W.; DAY, A. J.; WILLIAMSON, G. Purification of cytosolic beta-glucosidase from pig liver and its reactivity towards flavonoid glycosides. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1435, p. 110-116, 1999.

LI, Y.; UPADHYAY, S.; BHUIYAN, M.; SARKAR, F.H. Induction of apoptosis in breast cancer cells MDA-MB-231 by genistein. **Oncogene**, v. 18, n. 20, p. 3166-3172, 1999.

LIGGINS, J.; BLUCK, L. J. C.; RUNSWICK, S.; ATKINSON, C.; COWARD, W. A.; BINGHAM, S. A. Daidzein and genistein content of fruits and nuts. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 11, n. 2, p. 326-331, 2000.

LIGGINS, J.; BLUCK, L. J. C.; COWARD, W. A.; BINGHAM, S. A. Extraction and quantification of daidzein and genistein in food. **Analytical Biochemistry**, v. 264, n. 1, p. 1-7, 1998.

LOVATI, M. R.; MANZONI, C.; GIANAZZA, E.; ARNOLDI, A.; KUROWSKA, E.; CARROLL, K. K.; SIRTORI, C. R. Soy protein peptides regulate cholesterol homeostasis in Hep G2 cells. **Journal of Nutrition**, v. 130, n. 10, p. 2543-2549, 2000.

LUCAS, E. A.; KHALIL, D. A.; DAGGY, B. P.; ARJMANDI, B. H. Ethanol-extracted soy protein isolate does not modulate serum cholesterol in Golden Syrian hamsters: a model of postmenopausal hypercholesterolemia. **Journal of Nutrition**, v. 131, n. 2, p. 211-214, 2001.

LUGASI, A.; HÓVÁRI, J. Flavonoid aglycons in foods of plant origin. I. Vegetables. **Acta Alimentaria**, v. 29, n. 4, p. 345-352, 2000.

LYMAR, E. S.; BIN, L.; RENGANATHAN, V. Purification and characterization of a cellulose-binding β-glucosidase from cellulose-degrading cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 8, p. 2976-2980, 1995.

MACIEL, M. A.; PINTO, A. C.; VEIGA, V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MAKELA, S.; POUTANEN, M.; KOSTLAN, M. L.; LEHTIMAKI, N.; STRAUSS, L.; SANTTI, R.; VIHKO, R. Inhibition of 17 beta-hydroxysteroid oxidoreductase by flavonoids in breast and prostate cancer cells. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 217, n. 3, p. 310-316, 1998.

MAKRIS, D. P.; ROSSITER, J. T. Domestic processing of onion bulbs (*Allium cepa*) and asparagus spears (*Asparagus officinalis*): effect on flavonol content and antioxidant status. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 3216-3222, 2001.

MANACH, C.; MORAND, C.; CRESPY, V.; DEMINGNÉ, C.; TEXIER, O.; RÉGÉRAT, F.; RÉMÉSY, C. Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties. **FEBS Letters**, v. 426, n. 3, p. 331-336, 1998.

MARANHÃO, M. F. C. Benefícios da soja para o coração e a saúde. **Documentos da Embrapa**, v. 169, n. 1, p. 21-23, 2001.

MATSUDA, S.; MIYAZAKI, T.; MATSUMOTO, Y.; OHBA, R.; TERAMOTO, Y.; OHTA,N.; UEDA, S. Hydrolysis of isoflavones in soybean cooked syrup by *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* IFO 3425. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 74, n. 5, p. 301-304, 1994.

MATSUDA, S.; NORIMOTO, F.; MATSUMOTO, Y.; OHBA, R.; TERAMOTO, Y.; OHTA, N.; UEDA, S. Solubilization of a novel isoflavone glycoside-hydrolyzing beta-glucosidase from *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 77, p. 439, 1992.

MATSUURA, M.; SASAKI, J.; MURAO, S. Studies on β-glucosidases from soybeans that hydrolyze daidzin and genistin:isolation and characterization of na isozyme. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 59, n. 9, p. 1623-1627, 1995.

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

MATSUURA, M.; OBATA, A.; FUKUSHIMA, D. Objectionable flavor of soy milk developed during the soaking of soybeans and its control. **Journal of Food Science**, v. 54, n. 3, p. 602, 1989.

MAXWELL, S.; CRUICKSHANK, A.; THORPE, G. Red wine and antioxidant activity in serum. **Lancet**, v. 344, p. 1911, 1994.

MENEZES, T. J. B. Os fungos na indústria. **Boletim SBCTA**, v. 31, p. 116-120, 1997.

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

MIKKONEN, T. P.; MÄÄTTÄ, K. R.; HUKKANEN, A. T.; KOKKO, H. I.; TÖRRRÖNEN, A. R.; KÄRENLAMPI, S. O.; KARJALAINEN, R. O. Flavonol content varies among black currant cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 7, p. 3274-3277, 2001.

MIKSICEK, R. J. Estrogenic flavonoids: structural requirements for biological activity. **Proceedings of Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 208, p. 44-50, 1995.

MIKSICEK, R. J. Commonly occuring plant flavonoids have estrogenic activity. **Molecular Pharmacology**, v. 44, p. 37-43, 1993.

MIYAZAWA, M.; SAKANO, K.; NAKAMURA, S.; KOSAKA, H. Antimutagenic activity of isoflavones from soybean seeds (*Glycine max* Merrill). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 4, p. 1346-1349, 1999.

MONTANDON, J. B.; ZIJLSTRA, F. J.; WILSON, J. H.; GRANDJEAN, E. M.; CICUREL, L. In vitro versus in vivo activities of new 5-lipoxygenase inhibitors with antiinflammatory activity. **International Journal of Tissue Reaction**, v. 11, p. 107-112, 1989.

MORAIS, A. A. C. Usos da soja em medicina. **Documentos da Embrapa**, v. 169, n. 1, p. 15-18, 2001.

MOSSELMAN, S.; POLMAN, J.; DIJKEMA, R. ERβ: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. **FEBS Letters**, v. 392, p. 49-53, 1996.

MOULE, G.; BRADEN, A.; LAMOND, D. The significance of oestrogens in pasture plants in relation to animal production. **Animal Breeding Abstract**, v. 31, p. 139-157, 1963.

MSTAT-C. A microcomputer program for the design, management and analysis of agronomic research experiments. **Norway**: MSTAT Distribution, n.p., 1988.

MURAKAMI, S.; MURAMATSU, M.; TOMISAWA, K. Inhibition of gastric H^+, K^+-ATPase by flavonoids: a structure-activity study. **Journal of Enzyme Inhibition**, v. 14, n. 2, p. 151-166, 1999.

MURAKAMI, A.; OHIGASHI, H.; KOSHIMIZU, K. Anti-tumor promotion with food phytochemicals: a strategy for cancer chemoprevention. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 60, n. 1, p. 1-8, 1996.

MURAKANI, H.; ASAKAWA, T.; TERAO, J.; MATSUSHITA, S. Antioxidative stability of tempeh and liberation of isoflavones by fermentation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 2971, 1984.

MURPHY, P. A. Phytoestrogen content of processed soybean products. **Food Technology**, v. 36, n. 1, p. 60-64, 1982.

NAGAO, A.; MAEDA, M.; LIM, B. P.; KOBAYASHI, H.; TERAO, J. Inhibition of β-carotene-15,15´-dioxygenase activity by dietary flavonoids. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 11, n. 6, p. 348-355, 2000.

NAIM, M.; GESTETNER, B.; ZILKAH, S.; BIRK, Y.; BONDI, A. Soybean isoflavones. Characterization, determination, and antifungal activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 22, n. 5, p. 806-810, 1974.

NAKAMURA, Y.; TSUJI. S.; TONOGAI, Y. Determination of the levels of isoflavonoids in soybeans and soy-derived foods and estimation of isoflavonoids in the Japanese daily intake. **Journal of AOAC International**, v. 83, n. 3, p. 635-650, 2000.

NAKATANI, H. Analysis of glycosidase-catalyzed transglycosylation reaction using probabilistic model. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 385, n. 2, p. 387-391, 2001.

NARIKAWA, T.; SHINOYAMA, H.; FUJII, T. A β-rutinosidase from *Penicillium rugulosum* IFO 7242 that is a peculiar flavonoid glycosidase. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 64, n. 6, p. 1317-1319, 2000.

NARIKAWA, T.; KARAKI, Y.; SHINOYAMA, H.; FUJII, T. Rutin degradation by culture filtrates from penicillia. **Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi**, v. 72, p. 473-479, 1998.

NAWAR, W. W. Lipids. IN: **Food chemistry**. eds. Fennema, C. R., Marcel Dekker, p. 139-244, 1985.

NEVALA, R.; KORPELA, R.; VAPAATALO, H. Plant derived estrogens relax rat mesenteric artery *in vitro*. **Pharmacology Letters**, v. 63, n. 6, p. 95-100, 1998.

NEVALA, Riikka. **Effects of genistein and daidzein on arterial tone and blood pressure in rats.** Helsinki, 2001, 75 p. Tese (Academic Dissertation) - Institute of Biomedicine, University of Helsinki.

NURMI, T.; MAZUR, W.; HEINONEN, S.; KOKKONEN, J.; ADLERCREUTZ, H. Isoflavone content of the soy based supplements. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 28, p. 1-11, 2002.

NYMAN, N. A.; KUMPULAINEN, J. T. Determination of anthocyanidins in berries and red wine by high-performance liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 8, 4183-4187, 2001.

OUFEDJIKH, H.; MAHROUZ, M.; LACROIX, M.; AMIOT, M. J.; TACCINI, M. The influence of gamma irradiation on flavonoid content during storage of irradiated Clementina. **Radiation and Physical Chemistry**, v. 52, p. 107-112, 1998.

OHR, L. M. A growing arsenal against cancer. **Food Technology**, v. 56, n. 7, p. 67-71, 2002.

ONOZAWA, M.; FUKUDA, K.; OHTANI, M.; AKAZA, H.; SUGIMURA, T.; WAKABAYASHI, K. Effects of soybean isoflavones on cell growth and apoptosis of the human prostatic cancer cell line LNCaP. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 6, p. 360-363, 1998.

ORTEGA, N.; BUSTO, M. D.; PEREZ-MATEOS, M. Optimisation of beta-glucosidase entrapment in alginate and polyacrylamide gels. **Bioresource Technology**, v. 64, n. 2, p. 105-111, 1998.

PACHECO, M. T. B.; SGARBIERI, V. C. Alimentos funcionais: conceituação e importância na saúde humana. **Documentos Embrapa**, v. 169, n. 1, p. 37-40, 2001.

PANDJAITAN, N.; HETTIARACHCHY, N.; JU, Z. Y. Enrichment of genistein in soy protein concentrate with β-glucosidade. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 3, p. 403-407, 2000a.

PANDJAITAN, N.; HETTIARACHCHY, N.; JU, Z. Y., CRANDALL, P.; SNELLER, C.; DOMBEK, D. Evaluation of genistin and genistein contents in soybean varieties and soy protein concentrate prepared with three basic methods. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 3, p. 399-402, 2000b.

PARK, Y. K.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; MASCARENHAS, H. A. A.; SCAMPARINI, A. R. P. Conversão de malonil-beta-glicosil isoflavonas em isoflavonas glicosiladas presentes em alguns cultivares de soja brasileira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 2, p. 130-135, 2002a.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Botanical origin of Brazilian propolis and their chemical compositions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 9, p. 2502-2506, 2002b.

PARK, Y. K.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; MASCARENHAS, H. A. A.; SCAMPARINI, A. R. P. Survey of isoflavone contents in Brazilian soybean. **Ciencia y Tecnología Alimentaria**, v. 3, n. 3, p. 156-160, 2001a.

PARK, Y. K.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; SCAMPARINI, A. R. P. Biotransformação de isoflavonas de soja. Biotecnologia, Ciência, Desenvolvimento**, v. 20, n. 3, p. 12-14, 2001b.**

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; NERY, I. A.; AGUIAR, C. L.; SATO, H. H. Enrichment of isoflavone aglycones in extracted soybean isoflavones by heat and fungal beta-glucosidase. **Food Science and Industry**, v. 34, n. 4, p. 14-19, 2001c.

PARK, Y. K.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S.M.; NERY, I. A.; SATO, H. H. Extraction of isoflavones from defatted soy flour by ethanol and conversion of

glucoside isoflavones to aglycones by fungal beta-glucosidase. **IFT Annual Meeting**, p. 164, 2001d.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M. Preparation of water and ethanolic extracts of propolis and evaluation of the preparations. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 62, n. 11, p. 2230-2232, 1998.

PARK, Y. K.; KOO, H.; ABREU, J. A. S.; IKEGAKI, M.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L. Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. **Current Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 24-28, 1998.

PASSOS, L. M. L.; PARK, Y. K. Frutooligossacarídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos. **Ciência Rural**, v. 33, n. 2, p. 385-390, 2003.

PETERSON, G.; BARNES, S. Genistein and biochanin A inhibit the growth of human prostate cancer cells but not epidermal growth factor receptor tyrosine autophosphorylation. **Prostate**, v. 22, p. 335-345, 1993.

PETERSON, J.; DWYER, J. Flavonoids: dietary occurence and biochemical activity. **Nutritional Research**, v. 18, n. 12, p. 1995-2018, 1998.

PICHERIT, C.; COXAM, V.; BENNETAU-PELISSERO, C.; KATI-COULIBALY, S.; DAVICCO, M.J.; LEBECQUE, P.; BARLET, J. P. Daidzein is more efficient than genistein in preventing ovariectomy-induced bone loss in rats. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 1675-1681, 2000.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, 63: 1035-102, 2000.

PISKULA, M. K.; TERAO, J. Accumulation of (-)-epicatechin metabolites in rat plasma after oral administration and distribution of conjugates enzymes in rat tissues. **Journal of Nutrition**, v. 128, n. 7, p. 1172, 1998.

PONCE-NOYOLA, T.; LA TORRE, M. Isolation of a high-specific-growth-rate mutant of *Cellulomonas flavigena* on sugar cane bagasse. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 42, p. 709-712, 1995.

POOL-ZOBEL, B.L.; ADLERCREUTZ, H.; GLEI, M.; LIEGIBEL, U.M.; SITTLINGON, J.; ROWLAND, I.; WAHALA, K.; RECHKEMMER, G. Isoflavonoids and lignans have different potentials to modulate oxidative genetic damage in human colon cells. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 6, p. 1247-1252, 2000.

PORTE, A.; MAIA, L.H. Physiological, biochemical and microbiological modifications of minimally processed foods. **Boletim do CEPPA**, v. 19, p. 105-118, 2001.

PRATT, D. E.; BIRAC, P. M. Source of antioxidant activity of soybeans and soy products. **Journal of Food Science**, v. 44, p. 1720-1722, 1979.

RAO, V. A. The prebiotic properties of oligofructose at low intake levels. **Nutrition Research**, v. 21, p. 843-848, 2001.

RAVELO, J. N. B.; SÁNCHEZ, J. L. R. Contenido de genisteína y genistina en productos de soya. **Alimentaria**, v. 38, n. 328, p. 53-57, 2001.

REISSING, J. L.; STROMINGER, J. L.; LELOIR, L. F. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars. **Journal of Biology Chemistry**, v. 217, p. 959-966, 1955.

ROESSING, A. C. Situação mundial de oleaginosas. **Informe econômico CNPSo**, v. 2, p. 9-10, 1995.

RUPP, H.; ZOLLER, O.; ZIMMERLI, B. Bestimmung der isoflavone daidzein und genistein in sojahaltigen produkten. **Mitteilungen aus dem Gebeite der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene**, v. 91, n. 5, p. 199-223, 2000.

SASAKI, I.; NAGAYAMA, H. Induction of beta-glucosidase in *Botrytis cinerea* by cell wall fractions of the host plant. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 61, n. 7, p. 1073-1076, 1997.

SCALBERT, A.; MORAND, C.; MANACH, C.; RÉMÉSY, C. Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 56, p. 276-282, 2002.

SCHRAMM, D. D.; GERMAN, J. B. Potential effects of flavonoids on the etiology of vascular disease. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 9, n. 10, p. 560-566, 1998.

SETCHELL, K. D. R.; CASSIDY, A. Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. **Journal of Nutrition**, v. 129 (supl.), p. 758-767, 1999.

SGARBIERI, V. C.; GARRUTI, E. C.; GUZMÁN, E. C. Soybeans as an extender of common beans. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 58, n. 3, p. 522-526, 1981.

SHAHIDI, F.; WANASUNDARA, P. K. J. P. D. Phenolic antioxidants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 32, n. 1, p. 67-103, 1992.

SHERTZER, H. G.; PUGA, A.; CHANG, C. Y.; SMITH, P.; NEBERT, D. W.; SETCHELL, K. D. R.; DALTON, T. P. Inhibition of CYP1A1 enzyme activity in mouse hepatoma cell culture by soybean isoflavones. **Chemico Biological Interactions**, v. 123, n. 1, p. 31-49, 1999.

SIMONNE, A. H.; SMITH, M.; WEAVER, D. B.; VAIL, T.; BARNES, S.; WEI, C. I. Retention and changes of soy isoflavones and carotenoids in immature soybean seeds (Edamame) during processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 6061-6069, 2000.

SKIBOLA, C. F.; SMITH, M. T. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 29, n. 3-4, p. 375-383, 2000.

SMACCHI, E.; GOBBERTI, M. Bioactive peptides in dairy products: synthesis and interaction with proteolytic enzymes. **Food Microbiology**, v. 17, p. 129-141, 2000.

SOKHEY, A. S.; HANNA, M. A. Properties of irradiated starches. **Food Structure**, v. 12, p. 397-410, 1993.

SONG, T.; BARUA, K.; BUSEMAN, G.; MURPHY, P. A. Soy isoflavones analysis: quality control and a new internal standard. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 68 (supl.), p. 1474-1479, 1998.

SRINIVASAN, K.; MURAKAMI, M.; NAKASHIMADA, Y.; NISHIO, N. Efficient production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by the rumen anaerobic fungus, *Neocallimastix frontalis*, in a repeated batch culture. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 91, n. 2, p. 153-158, 2001.

STROHEKER, T.; CHAGNON, M. C.; PINNERT, M. F.; BERGES, R.; LAVIER, M. C. C. Estrogenic effects of food wrap packaging xeno estrogens and flavonoids in female Wistar rats: a comparative study. **Reproductive Toxicology**, v. 17, p. 421-432, 2003.

TAJALDEEN, S. J.; JAFFAR, W. N. Cellulase activity of a thermotolerant *Aspergillus niveus* isolated from desert soil. **Mycological Research**, v. 96, p. 14-18, 1992.

TENGBORG, C.; GALBE, B.; ZACCHI, G. Influence of enzyme loading and physical parameters on the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated softwood.

Biotechnology Progress, v. 17, n. 1, p. 110-117, 2001.

TIKKANEN, M.; ADLERCREUTZ, H. Dietary soy-derived isoflavone phytoestrogens. **Biochemical Pharmacology**, v. 60, p. 1-5, 2000.

TSUKAMOTO, C.; KUDOU, S.; KIKUCHI, A.; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; ONO, T.; KITAMURA, K.; OKUBO, K. Isoflavones in soybean products: composition, concentration, and physiological effects. **Documentos da Embrapa**, v. 169, n. 1, p. 9-14, 2001.

VAN DER SCHOUW, Y. T.; DE KLEIJN, M. J. J.; PEETERS, P. H. M.; GROBBEE, D. E. Phyto-oestrogens and cardiovascular disease risk. **Nutrition Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 10, n. 3, p. 154-167, 2000.

VERNETTI, F. J. História e importância da soja no Brasil. **A Lavoura**, v. 81, p. 21-24, 1977.

VICENT, A.; FITZPATRICK, L. A. Soy isoflavones: are they useful in menopause? **Mayo Clinical Proceedings**, v. 75, n. 11, p. 1174-1184, 2000.

VIGNA, G. B.; PANSINI, F.; BONACCORSI, G.; ALBERTAZZI, P.; DONEGA, P.; ZANOTTI, L.; DE ALOYSIO, D.; MOLLICA, G.; FELLIN, R. Plasma lipoproteins in soy-treated postmenopausal women: a double-blind, placebo-controlled trial. **Nutrition Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 10, n. 6, p. 315-322, 2000.

VITTI, D. M. S. S.; DEL MASTRO, N. L.; KIKUCHI, O. K.; NOGUEIRA, N. L. Electron irradiation of high fiber by-products. Effects on chemical composition and digestibility. **Scientia Agricola**, v. 55, p. 159-171, 1998.

WANG, C. C.; PRASAIN, J.; BARNES, S. Review of the methods used in the determination of phytochemistry. **Journal of Chromatography B**, v. 777, p. 3-28, 2002.

WANG, D.; KURASAWA, E.; YAMAGUCHI, Y.; KUBOTA, K.; KOBAYASHI, A. Analysis of glycosidically bound aroma precursors in tea leaves. II. Changes in glycoside contents and glycosidase activities in tea leaves during the black tea manufacturing process. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 1900-1903, 2001.

WANG, C.; MA, Q.; PAGADALA, S.; SHERRARD, M. S.; KRISHNAN, P.G. Changes of isoflavones during processing of soy protein isolates. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 75, p. 337-341, 1998.

WANG , H. J.; MURPHY, P. A. Isoflavone content in commercial soybean foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 2, p. 1666-1673, 1994.

WANGEN, K. E.; DUNCAN, A. M.; XU, X.; KURZER, M. S. Soy isoflavones improve plasma lipids in normocholesterolemic and mildly hypercholesterolemic postmenopausal women. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, n. 2, p. 225-231, 2001.

WEISBURGER, J. H. Eat to live, not live to eat. **Nutrition**, v. 16, n. 4, p. 767-773, 2000.

WITHERS, S. G. Mechanisms of glycosyl transferases and hydrolases. **Carbohydrate Polymers**, v. 44, p. 325-337, 2001.

WOLF, W. D.; COWAN, J. C. **Soybean as a protein source**. Butterworth, 150 p., 1971.

WOLTERS, T. C.; LANGERAK, D. I.; CURZIO, O. A.; CROCI, C. A. Irradiation effect on onion keeping-quality after sea-shipment from Argentine to Netherlands. **Journal of Food Science**, v. 55, p. 1181-1182, 1990.

WONG, C. K.; KEUNG, W. M. Bovine adrenal 3-beta-hydroxysteroid dehydrogenase/5-ene-4ene isomerase: characterization and its inhibition by isoflavones. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 71, n. 5-6, p. 191-202, 1999.

WONG, D. W. S. Cellulolytic enzymes. IN: **Food enzymes: structure and mechanism**. Chapman and Hall, p. 85-123, 1995.

WU, E. S.; LOCH, J. T.; TODER, B. H.; BORRELLI, A. R.; GAWLAK, D.; RADOV, L. A.; GENSMANTEL, N. P. Flavones. 3. Synthesis, biological activities, and conformational analysis of isoflavone derivatives and related compounds. **Journal of Medical Chemistry**, v. 35, p. 3519-3525, 1992.

XU, X.; HARRIS, K. S.; WANG, H. J.; MURPHY, P. A.; HENDRICH, S. Bioavailability of soybean isoflavonas depends upon gut microflora in women. **Journal of Nutrition**, v. 125, p. 2307-2315, 1995.

ZHENG, J. B.; RAMIREZ, V. D. Inhibition of mitochondrial proton F0F1-ATPase/ATP synthase by polyphenolic phytochemicals. **British Journal of Pharmacology**, v. 130, n. 5, p. 1115-1123, 2000.