

## Efeitos de genótipos, ambientes e de tratamentos hidrotérmicos na concentração de isoflavonas agliconas em grãos de soja<sup>(1)</sup>

Mercedes Concórdia Carrão-Panizzi<sup>(2)</sup>, Aline Silva Simão<sup>(3)</sup> e Akio Kikuchi<sup>(4)</sup>

Resumo – O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos de tratamentos hidrotérmicos, da variabilidade genética e de ambientes no teor de isoflavonas agliconas em grãos de soja [*Glycine max* (L.) Merrill]. O estudo foi realizado com as cultivares de soja BR 36, FEPAGRO RS-10 e BRS 155, cultivadas em Londrina, em Capanema e em Palmas, PR, na safra 1999/2000, mediante tratamentos hidrotérmicos de 40, 50 e 60°C por 12 e 18 horas. As maiores concentrações de isoflavonas totais (280 mg/100 g) foram observadas nos grãos colhidos em Palmas, onde a temperatura média durante o enchimento de vagens foi mais baixa (19°C). Em Londrina (23°C), houve menor concentração de isoflavonas (140 mg/100 g). A cultivar BRS 155 apresentou o maior teor de isoflavonas totais em Palmas e em Londrina. Grãos não-tratados da BRS 155 apresentaram em média 4,0 mg/100 g de agliconas, as quais aumentaram para 52 mg/100 g, após os tratamentos hidrotérmicos. O tratamento a 50°C por 12 horas foi mais efetivo no desenvolvimento de isoflavonas agliconas. A 60°C, houve redução das agliconas, decorrente da inativação das  $\beta$ -glicosidases. As formas malonil, que são termicamente instáveis, também foram reduzidas nas temperaturas mais altas.

Termos para indexação: *Glycine max*, glicosídeo, alimento funcional, tratamento térmico.

### Effects of genotypes, environments and hydrothermal treatments on the isoflavone aglycone concentration in soybean grains

Abstract – The objective of this work was to assess the effects of hydrothermal treatments and the environmental and genetic variability on the isoflavone aglycones concentration in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] grains. The study was carried out with the soybean cultivars BR 36, FEPAGRO RS-10, and BRS 155, cultivated in three locals of Paraná State (Londrina, Capanema, and Palmas), during 1999/2000 soybean season, submitted to hydrothermal treatments at 40, 50 and 60°C for 12 and 18 hours. Higher concentrations of total isoflavones (280 mg/100 g) were observed in grains harvested in Palmas, where the average temperature during pod filling was 19°C. In Londrina (23°C), there was lower concentration of isoflavones (140 mg/100 g). The cultivar BRS 155 presented the highest content of total isoflavones in Palmas and in Londrina. Non-treated grains of BRS 155 showed in average 4.0 mg/100 g of aglycones, which increased to 52 mg/100 g, after hydrothermal treatments. The treatment at 50°C for 12 hours was the most effective in developing isoflavone aglycones. At 60°C, there was a decrease of the aglycones, due to inactivation of  $\beta$ -glycosidases. Malonyl forms, which are thermal unstable, were reduced at higher temperatures.

Index terms: *Glycine max*, glycosides, functional foods, heat treatment.

### Introdução

No Brasil, a soja tem recebido atenção pública considerável, por seus potenciais benefícios para a saúde humana, prevenindo doenças crônicas. Estudos epidemiológicos mostraram uma incidência menor de câncer relacionado com hormônios na Ásia do que em países Ocidentais. A genisteína é o principal fator na prevenção do câncer (Peterson & Barnes, 1993). A dieta tradicional dos países asiáticos, rica em soja e com altos teores de

<sup>(1)</sup> Aceito para publicação em 29 de maio de 2003.

<sup>(2)</sup> Embrapa-Labex/USDA-ARS, National Center for Agricultural Utilization Research (NCAUR), 1815 N University St., Peoria, IL, 61604, USA. E-mail: panizzim@ncaur.usda.gov

<sup>(3)</sup> Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Soja, Caixa Postal 231, CEP 86001-970 Londrina, PR. E-mail: aline.quimica@bol.com.br

<sup>(4)</sup> National Agricultural Research Center for Western Region, Department of Crop Breeding, Soybean Breeding Laboratory, Kagawa 765-8508, Japão. E-mail: akiokiku@affrc.go.jp

isoflavonas, foi fator determinante em estudos conduzidos sobre este tema (Coward et al., 1993).

As isoflavonas ocorrem naturalmente nos grãos de soja e na maioria dos produtos de soja ocidentais, como  $\beta$ -glicosídeos conjugados (Coward et al., 1998). Beta-glicosidases (Matsuura et al., 1989) e enzimas intestinais (Tam et al., 1998) hidrolisam as isoflavonas conjugadas glicosídicas desenvolvendo as formas agliconas. Vários estudos estão sendo realizados para definir como ocorre a absorção intestinal destes compostos em humanos. Setchell et al. (2001) constataram que as isoflavonas glicosídicas não são absorvidas intactas: a biodisponibilidade requer uma hidrólise inicial do açúcar, para que sejam transportadas pela circulação periférica.

As isoflavonas agliconas (daidzeína e genisteína), compostos mais prontamente disponíveis, são encontradas em concentrações maiores em alimentos como “tempeh” e “miso”. O processo de fermentação na obtenção destes alimentos causa redução dos glicosídeos e formação de agliconas (Coward et al., 1998). Variabilidade genética e efeitos do ambiente afetam as concentrações de isoflavonas em grãos de soja (Tsukamoto et al., 1995; Carrão-Panizzi et al., 1998, 1999). Métodos de processamento associados a matéria-prima com altos níveis de isoflavonas podem favorecer maior desenvolvimento de isoflavonas agliconas.

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos de tratamentos hidrotérmicos, variabilidade genética das cultivares de soja, e diferentes locais de cultivo, no teor de isoflavonas agliconas.

### Material e Métodos

Foram realizados dois experimentos, usando-se o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial com três repetições. No primeiro experimento, os tratamentos foram constituídos pela combinação de três cultivares de soja (BRS 155, FEPAGRO RS-10 e BR 36), três locais de cultivo (safra 1999/2000) no Estado do Paraná (Palmas, Londrina e Capanema) e dois tratamentos hidrotérmicos dos grãos de soja imersos por 18 horas, em água destilada e deionizada, sob temperaturas de 50 e 60°C. No segundo experimento, os tratamentos foram constituídos pela combinação de três locais de cultivo (Palmas, Londrina e Capanema), três temperaturas (40, 50 e 60°C), e dois períodos de imersão (12 e 18 horas) dos grãos da cultivar de soja BRS 155 em água destilada e

deionizada. Após os tratamentos hidrotérmicos, os grãos (amostras de 10 g) foram lavados com água fria, secados em estufa ventilada e moídos em moinhos domésticos (Braun model KSM 2B).

Na extração das isoflavonas, amostras de 100 mg de grãos de soja moídos foram colocadas em tubos de ensaio com 4,0 mL de etanol aquoso a 70%, contendo 0,1% de ácido acético, à temperatura ambiente por cinco horas, e agitados a cada 15 minutos.

Nas análises de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), 1,5 mL de amostra foi centrifugado por 10 minutos a 13.500 rpm, a 10°C (Centrífuga Eppendorf mod. 5417R). A seguir, 80  $\mu$ L do sobrenadante foram transferidos para as bandejas do auto-aplicador de amostras do cromatógrafo e 10  $\mu$ L foram injetados no cromatógrafo. As análises de isoflavonas foram realizadas em colunas de cromatografia ODS C-18 (YMC-Pack ODS-AM), S-5 mm, 120 A (250 x 4,6 mm I.D.). Na fase móvel, o solvente A foi acetonitrila com 0,1% de ácido acético e o solvente B foi água com 0,1% de ácido acético. As condições iniciais foram 20% do solvente B em gradiente linear, passando para 50%, depois de 20 minutos. O efluente foi monitorado a 260 nm. As soluções padrões de daidzina, daidzeína, genistina e genisteína foram preparadas de padrões da SIGMA.

Antes de testar os tratamentos pela ANOVA, os dados foram avaliados quanto à distribuição normal (Shapiro & Wilk, 1965), homogeneidade de variância (Hartley, 1940; Burr & Foster, 1972) e aditividade do modelo (Tukey, 1949). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (Cochran & Cox, 1957). As análises estatísticas foram realizadas por meio do sistema SAS Institute (1997).

### Resultados e Discussão

Em Palmas, onde a temperatura média durante o período de enchimento de grãos foi de 19,2°C, houve maior desenvolvimento de isoflavonas (Figura 1). Em Londrina e Capanema, as temperaturas médias mais altas de 23,2°C e de 23,7°C, respectivamente, podem ter sido responsáveis pela redução no teor de isoflavonas. Temperaturas mais baixas durante o enchimento de vagens são determinantes no aumento da concentração de isoflavonas em soja (Tsukamoto et al., 1995), assim como os locais de cultivo (Eldridge & Kwolek, 1983; Kitamura et al., 1991).

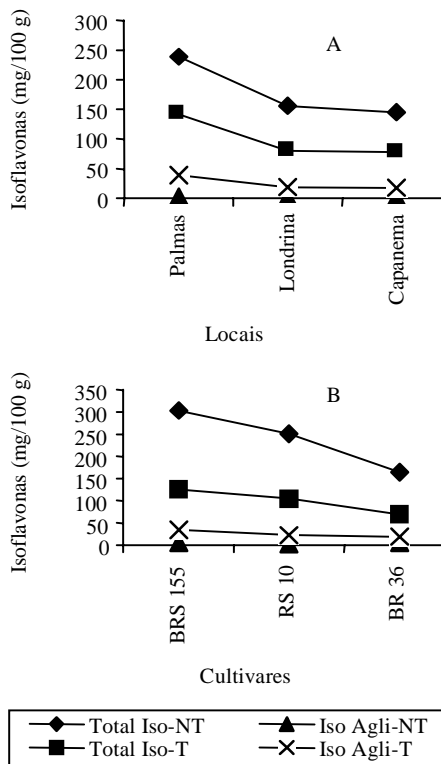
No Brasil, a soja é produzida em regiões de latitudes de 33° S até o Equador, e os efeitos dessas amplas condições ambientais, na concentração de isoflavonas, foram registrados por Carrão-Panizzi et al. (1999). Apesar de Palmas e Capanema estarem localizadas quase na mesma latitude (26° S e 25° S),

as diferenças nas altitudes (1.035 m e 368 m) causam diferenças ambientais responsáveis pelas concentrações diferentes de isoflavonas. Quando os grãos foram tratados hidrotêrmicamente, ocorreu 40% de redução no teor de isoflavonas, mas as diferenças observadas entre os locais foram mantidas (Figura 1A).

Em grãos secos de soja sob boas condições de armazenamento não há formação de agliconas. Neste estudo, os grãos que não sofreram tratamento hidrotérmico apresentaram concentrações totais das agliconas muito reduzidas (Figura 1A). Após os tratamentos térmicos, as concentrações de agliconas nos grãos aumentaram oito vezes, enquanto as diferenças ambientais permaneceram. Quando

semeada em Palmas, a cultivar BRS 155 apresentou os níveis mais altos de isoflavonas totais em grãos tratados e não-tratados (Figura 1B), o que pode ser um efeito genético. Essa variabilidade também foi observada quando houve o desenvolvimento de agliconas. A BRS 155 é uma cultivar de soja especial, que apresenta um terço da concentração de inibidor de tripsina normalmente registrada em cultivares convencionais (Carrão-Panizzi et al., 2000). A cultivar BR 36 tem sido reportada como uma cultivar que apresenta reduzido teor de isoflavona (Carrão-Panizzi & Kitamura, 1995; Carrão-Panizzi et al., 1998). No presente estudo, essa cultivar também apresentou os menores teores de isoflavonas em todos os locais de cultivo. No Brasil, a 'BR 36' é muito cultivada pelos produtores de soja orgânica, por causa do seu sabor mais suave, do tamanho moderado dos grãos e da cor do hilo (marrom-claro) que aumentam sua aceitabilidade para o consumo humano. Entretanto, o teor reduzido de isoflavonas pode dificultar seu uso no processamento de alimentos funcionais.

A 50°C, houve um maior desenvolvimento de isoflavonas agliconas (Tabela 1). A 60°C, a redução no teor de agliconas pode ter sido decorrente da inativação das  $\beta$ -glicosidases, como observado por Matsuura & Obata (1993). Em Palmas, a cultivar BRS 155 apresentou maiores concentrações daqueles compostos do que as cultivares BRS 36 e RS-10. O local de cultivo afetou as concentrações totais de isoflavonas do mesmo modo que afetou o total de agliconas (Tabela 1). As concentrações totais de isoflavonas diminuíram após tratamentos hidrotérmicos dos grãos por 18 horas (Tabela 2).



**Figura 1.** Valor médio das concentrações de isoflavonas totais (Total Iso) e de isoflavonas agliconas (Iso Agli) em grãos tratados (T) e não-tratados (NT) hidrotêrmicamente por 18 horas a 50°C e 60°C, de três cultivares de soja semeadas em diferentes locais do Estado do Paraná (A), e de cultivares de soja semeadas em Palmas, no Estado do Paraná (B).

**Tabela 1.** Concentração de agliconas e isoflavonas totais (mg/100 g) em grãos de cultivares de soja semeadas em diferentes locais do Estado do Paraná, submetidos a tratamentos hidrotérmicos por 18 horas<sup>(1)</sup>.

Cultivares	Palmas		Londrina		Capanema	
	50°C	60°C	50°C	60°C	50°C	60°C
Agliconas						
BR 36	37,6bAa	25,1bBa	19,4bAb	7,1aBb	17,5bAb	7,2bBb
RS-10	41,8bAa	20,0bBa	28,8aAb	9,0aBb	24,5abAb	10,9abBb
BRS 155	75,7aAa	34,6aBa	36,7aAb	12,8aBb	32,3aAb	17,9aBb
Isoflavonas totais						
BR 36	105,9cAa	90,6cBa	70,2bAb	54,1bBb	53,6cAb	46,0cAb
RS-10	153,1bAa	125,8bBa	93,9aAb	93,9aAb	81,8bAb	78,7bAb
BRS 155	195,7aAa	180,6aBa	88,7aAc	77,5aAc	108,0aAb	102,7aAb

<sup>(1)</sup>Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade; médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas linhas, em cada local, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade; médias seguidas pela mesma letra em itálico nas linhas, em cada temperatura, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

**Tabela 2.** Concentração dos compostos isoflavonas (mg/100 g), em grãos de cultivares de soja produzidos em Palmas, no Estado do Paraná, submetidos a tratamentos hidrotérmicos por 18 horas<sup>(1)</sup>.

Tratamento	Daidzina	Genistina	Malonil daidzina	Malonil genistina	Daidzeína	Genisteína	Isoflavona total
RS-10							
Grãos não-tratados	20,6a	28,7c	78,5a	120,7a	0,8c	1,2c	250,5a
50°C	21,9a	32,9b	16,7b	39,8b	18,1a	23,7a	153,1b
60°C	25,0a	42,4a	12,2b	26,1c	8,6b	11,1b	125,8c
BR 36							
Grãos não-tratados	11,0a	19,2b	45,5a	84,4a	1,6c	2,6c	164, 5a
50°C	8,9a	19,4b	10,2b	30,0b	15,5a	22,1a	106,0b
60°C	11,2a	26,0a	7,3c	19,8c	10,7b	14,4b	90,6bc
BRS 155							
Grãos não-tratados	23,4a	35,3a	96,1a	143,8a	1,6c	2,3c	302,5a
50°C	15,6b	26,2b	15,2b	28,2b	21,0a	29,8a	195,7b
60°C	26,2a	39,2a	12,7b	22,8bc	11,3b	15,2b	180,6bc

<sup>(1)</sup>Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

A 60°C, as isoflavonas glicosídicas, daidzina e genistina aumentaram suas concentrações. Comparando-se os grãos não-tratados com os que receberam tratamentos hidrotérmicos, as formas malonil foram acentuadamente reduzidas. As formas malonil são termicamente instáveis e sob altas temperaturas (80°C) se convertem nas formas glicosídicas (Kudou et al., 1991). A 50°C, houve maior desenvolvimento de isoflavonas agliconas (Tabela 2).

As concentrações e as formas de isoflavonas variam nos produtos de soja em decorrência de diferentes métodos de processamento (Coward et al., 1998). Para que ocorra absorção após administração oral, as isoflavonas glicosídicas dos grãos de soja requerem uma hidrólise inicial do açúcar para serem convertidas em daidzeína e genisteína, que são as formas biologicamente ativas (Setchell et al., 2001). Isoflavonas glicosídicas são hidrolisadas pelas enzimas  $\beta$ -glicosidases, que têm atividade ótima em pH entre 4,3 e 7,0 e à temperatura de 45°C (Matsuura & Obata, 1993). A hidrólise é tempo-dependente e as  $\beta$ -glicosidases gradualmente perdem atividade. A 55°C, 80% da atividade original foi mantida, enquanto a 60°C, a enzima foi inativada (Matsuura & Obata, 1993). Park et al. (2001) verificaram que a enzima  $\beta$ -glicosidase de *Aspergillus oryzae* foi mais eficaz na hidrólise das formas glicosídicas do que nas formas malonil glicosídicas.

Os efeitos dos tratamentos hidrotérmicos foram evidenciados no experimento que considerou somente a cultivar BRS 155, semeada em Palmas. O tratamento hidrotérmico a 50°C por 12 horas proporcionou melhor condição para o desenvolvimento de isoflavonas agliconas, daidzeína e genisteína (Tabela 3). O tratamento de 18 horas a

**Tabela 3.** Concentração de agliconas e de isoflavonas totais (mg/100 g) em grãos de soja da cultivar BRS 155, semeada em diferentes locais do Estado do Paraná, submetidos a tratamentos hidrotérmicos por períodos de tempos definidos<sup>(1)</sup>.

Tempe- ratura	Palmas		Londrina		Capanema	
	12 horas	18 horas	12 horas	18 horas	12 horas	18 horas
Agliconas						
40°C	67,9bBa	87,4aAa	24,3aBb	35,7aAb	26,1bBb	46,5aAb
50°C	86,3aAa	75,7aAa	41,0aAb	36,7aAb	44,9aAb	32,3aABb
60°C	27,2aCa	34,6aBa	13,7aBa	12,8aBb	17,9aBa	17,9aBb
Isoflavonas totais						
40°C	274,0aAa	241,4bAa	126,8aAb	133,2aAb	151,4aAb	143,0aAb
50°C	225,4aBa	195,7bBa	159,0aAb	88,7bBb	120,8aAb	107,0aBb
60°C	167,1aCa	180,6aBa	78,3aBb	77,5aBb	101,9aBb	102,7aBb

<sup>(1)</sup>Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas linhas, em cada local, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade; médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade; médias seguidas pela mesma letra em itálico nas linhas, em cada período de tempo, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

40°C foi similar ao anterior. Nesse caso, a temperatura menor foi compensada pelo período de exposição mais longo. A 60°C, as concentrações de agliconas diminuíram em ambos os períodos. A exposição prolongada à temperatura mais alta reduziu os teores totais de isoflavonas (Tabela 3). Os resultados desse segundo experimento seguiram a mesma tendência observada no primeiro, ou seja, quando a temperatura foi mais alta e o período de exposição foi mais longo, as formas malonil reduziram, ao passo que os glicosídeos, daidzina e genistina aumentaram (Tabela 4). Coward et al. (1998) observaram que a extração aquosa a quente aumenta o teor dos glicosídeos. Maiores concentrações de daidzeína e genisteína foram observadas nos tratamentos a 50°C por 12 horas e a 40°C por 18 horas (Tabela 4).

**Tabela 4.** Concentrações dos compostos de isoflavonas (mg/100 g) em grãos da cultivar de soja BRS 155 semeada em diferentes locais do Estado do Paraná, em razão da temperatura e do tempo de submersão (12 e 18 horas) em água destilada e deionizada<sup>(1)</sup>.

Tempe- -ratura	Daidzina		Genistina		Malonil daidzina		Malonil genistina		Daidzeína		Genisteína	
	12	18	12	18	12	18	12	18	12	18	12	18
40°C	27,9aA	12,1cB	30,7bA	15,6cB	58,0aA	47,7aB	89,5aA	78,4aB	27,6bB	35,1aA	40,3aB	52,3aA
50°C	14,8bB	22,6bA	25,8bB	36,0bA	37,1bA	18,8bB	61,4bA	42,5bB	36,8aA	32,4aA	49,4aA	43,3aA
60°C	31,4aA	34,6aA	47,1aB	56,1aA	20,6cA	18,7bA	40,7cA	36,7bA	11,9cA	14,3bA	15,3bA	20,2bA
CV (%)	16,1		13,2		18,7		12,9		15,1		15,9	

<sup>(1)</sup>Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas, e pela mesma letra maiúscula nas linhas, em cada composto, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

A escolha de cultivares, que geneticamente apresentam teores elevados de isoflavonas, de locais de cultivo, onde a temperatura média é mais baixa durante o período de enchimento de grãos, e de tratamentos hidrotérmicos dos grãos, com temperaturas e períodos de tempo adequados, proporciona maior desenvolvimento de isoflavonas agliconas (compostos biodisponíveis responsáveis por efeitos benéficos à saúde humana), garantindo a obtenção de matéria-prima mais adequada para processamentos de alimentos funcionais à base de soja.

### Conclusões

1. A variabilidade no teor de isoflavonas na soja é determinada geneticamente.
2. Temperaturas mais frias durante o período de enchimento de vagens aumentam as concentrações de isoflavonas.
3. O tratamento hidrotérmico dos grãos a 50°C por 12 horas é eficiente no desenvolvimento de isoflavona agliconas.

### Agradecimentos

Aos Drs. José Marcos Gontijo Mandarino e José Erivaldo, da Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Soja, pelo suporte nas análises químicas e pelo auxílio na análise estatística.

### Referências

BURR, I. W.; FOSTER, L. A. **A test for equality of variances**. West Lafayette: University of Purdue, 1972. 26 p. (Mimeo Series, 282).

CARRÃO-PANIZZI, M. C.; ALMEIDA, L. A.; KIHHL, R. A. S.; MIRANDA, L. C.; KIKUCHI, A.; MANDARINO, J. M. G.; BORDIGNON, J. R.; SHIMANUKI, S.; DEGAWA, H.; TSUKAMOTO, C. Breeding efforts for nutritional and food processing quality of soybean at Embrapa, Brazil. In: INTERNATIONAL SOYBEAN PROCESSING AND UTILIZATION CONFERENCE, 3., 2000, Tsukuba. **Proceedings...** Tsukuba: The Japanese Society for Food Science and Technology, 2000. p. 37-40.

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

CARRÃO-PANIZZI, M. C.; KITAMURA, K. Isoflavone content in Brazilian soybean cultivars. **Breeding Science**, Tokyo, v. 45, n. 3, p. 295-300, 1995.

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

COCHRAN, W. G.; COX, G. M. **Experimental designs**. New York: J. Wiley, 1957. 611 p.

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

COWARD, L.; SMITH, M.; KIRK, M.; BARNES, S. Chemical modification of isoflavones in soyfoods during cooking and processing. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 68, n. 6, p. 1486S-1491S, 1998. Supplement.



- ELDRIDGE, A.; KWOLEK, W. Soybean isoflavones: effect of environment and variety on composition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 31, n. 2, p. 394-396, 1983.
- HARTLEY, H. O. Testing the homogeneity of a set of variances. **Biometrika**, Oxford, v. 31, p. 249-255, 1940.
- KITAMURA, K.; IGITA, K.; KIKUCHI, K.; KUDOU, S.; OKUBO, K. Low isoflavone content in early maturing cultivars, so called summer-type soybeans (*Glycine max* (L.) Merrill). **Japanese Journal of Breeding**, Tokyo, v. 41, p. 651-654, 1991.
- KUDOU, S.; FLEURY, Y.; WELTI, D.; MAGNOLATO, D.; UCHIDA, T.; KITAMURA, K.; OKUBO, K. Malonyl isoflavone glycosides in soybeans seeds (*Glycine max* Merrill). **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 55, p. 2227-2233, 1991.
- MATSUURA, M.; OBATA, A.  $\beta$ -glucosidases from soybean hydrolyse daidzin and genistin. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 58, n. 1, p. 144-147, 1993.
- MATSUURA, M.; OBATA, A.; FUKUSHIMA, D. Objectionable flavor of soymilk developed during the soaking of soybeans and its control. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 54, p. 602-605, 1989.
- PARK, Y. K.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; SCAMPARINI, A. R. P. Biotransformação de 2-glicosil isoflavonas de soja em isoflavonas agliconas por 2-glicosidase fúngica. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE OS BENEFÍCIOS DA SOJA PARA A SAÚDE HUMANA, 1., 2001, Londrina. **Anais...** Londrina: Embrapa-CNPSo, 2001. p. 33-36. (Documentos, 169).
- 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**, New York, v. 22, n. 4, p. 335-345, 1993.
- SAS INSTITUTE (Cary, Estados Unidos). **SAS/STAT software: changes and enhancements through release 6.12**. Cary, 1997. 1167 p.
- SETCHELL, K. D. R.; BROWN, N. M.; DESAI, P.; ZIMMER-NECHEMIAS, L.; WOLFE, B. E.; BRASHEAR, W. T.; KIRSCHNER, A. S.; CASSIDY, A.; HEUBI, J. E. Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 131, p. 1362S-1375S, 2001.
- SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An analysis of variance test for normality. **Biometrika**, Oxford, v. 52, p. 591-611, 1965.
- TAM, D. M.; GARDNER, C. D.; HASKELL, W. L. Potential health benefits of dietary phytoestrogens: a review of the clinical, epidemiological and mechanistic evidence. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Bethesda, v. 83, p. 2223-2235, 1998.
- TSUKAMOTO, C.; SHIMADA, S.; IGITA, K.; KUDOU, S.; KOKUBUN, M.; OKUBO, K.; KITAMURA, K. Factors affecting isoflavones content in soybean seeds: changes in isoflavones, saponins and composition of fatty acids at different temperatures during seed development. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v. 43, p. 1184-1192, 1995.
- TUKEY, J. W. One degree of freedom for non-additivity. **Biometrics**, Washington, v. 5, p. 232-242, 1949.