

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Processos de purificação do extrato de soja: obtenção de fração enriquecida em isoflavonas para incorporação em nanoemulsões visando uso tópico e isolamento de derivados furânicos

MARINA CARDOSO NEMITZ

Porto Alegre, 2013.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Processos de purificação do extrato de soja: obtenção de fração
enriquecida em isoflavonas para incorporação em nanoemulsões
visando uso tópico e isolamento de derivados furânicos**

Dissertação apresentada por
MARINA CARDOSO NEMITZ para
obtenção do GRAU DE MESTRE
em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Helder Ferreira Teixeira
Co-orientador: Profa. Dr. Gilsane von Poser

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 17.09.2013, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Margareth Linde Athayde
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

Profa. Dr. Letícia Scherer Koester
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Prof. Dr. José Angelo Silveira Zuanazzi
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

CPI – Catalogação na Publicação

Nemitz, Marina

Processos de purificação do extrato de soja: obtenção de fração enriquecida em isoflavonas para incorporação em nanoemulsões visando uso tópico e isolamento de derivados furânicos / Marina Nemitz. - 2013.
136 f.

Orientador: Helder Teixeira.

Coorientadora: Gilsane von Poser.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Soja. 2. Isoflavonas. 3. Nanoemulsões. 4. Derivados Furânicos. I. Teixeira, Helder, orient. II. von Poser, Gilsane, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de ficha Catalográfica da UFRGS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi subvencionado pela CAPES e realizado nas dependências do Laboratório de Desenvolvimento Galênico e do Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

*“Se podemos sonhar, também podemos
tornar nossos sonhos realidade.”*

Walt Disney

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer aos meus orientadores Prof. Dr. Helder Teixeira e Profa. Dra. Gilsane von Poser pelo conhecimento transmitido continuamente e pela amizade construída. Ao prof. Helder, em particular, agradeço pela oportunidade de orientação de mestrado e por continuar me proporcionando seguimento deste trabalho em doutoramento. À profa. Gilsane agradeço pelo acolhimento em seu laboratório, entusiasmo e ajuda ininterrupta, essenciais para realização desta dissertação. Vocês são exemplos em que me espelharei sempre.

Aos colegas dos laboratórios (606 e 504) pelo amparo, amizade, companheirismo e momentos de descontração. Em especial às colegas e amigas Bruna, Sara e Letícia que me divertem desde o início e se tornaram muito importantes, à Débora pelo incentivo e ajuda nos momentos em que muito precisei, à Fernanda, Dirnete e Fabíola pelo auxílio em alguns experimentos, e ao Gari por estar sempre disposto a ajudar.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS e a todos os colegas, professores e funcionários que fazem parte desta caminhada.

Em especial agradeço à minha família pelo apoio e torcida na busca de todos meus sonhos. À minha mãe Márcia por ter me ensinado os principais valores da vida. Ao meu pai Moisés pelo incentivo, confiança, carinho, dedicação e por sempre possibilitar conforto para seguimento dos meus sonhos. Às minhas irmãs Marcela e Mariane, minha sobrinha Thaís e meus cunhados, pelo amor, amizade, compreensão e incentivo contínuo. À família Todeschini pela força, torcida e carinho.

A todos os amigos e familiares que, mesmo não citados, contribuíram de alguma maneira para a conclusão deste trabalho.

E por fim, agradeço ao Vítor, a pessoa que mais compartilhou este momento, sempre me incentivando nesta jornada. Obrigada pelo amor demonstrado diariamente, por todas as ajudas, motivação, confiança, torcida, compreensão e paciência. Sem você tudo seria mais difícil, você é minha inspiração e meu exemplo.

RESUMO

As isoflavonas são compostos fenólicos presentes em algumas leguminosas, encontradas em maior quantidade nas sementes da soja. Estas substâncias apresentam diversas ações benéficas sobre a pele, estando estas atribuídas principalmente as suas formas agliconas. Neste contexto, o presente trabalho objetivou a obtenção de uma fração enriquecida em isoflavonas agliconas (FIA) visando incorporação em nanoemulsões (NE) para aplicação tópica. Complementarmente, o trabalho objetivou o isolamento e identificação de dois compostos majoritários em relação às isoflavonas observados durante uma das etapas de obtenção da FIA. Para obtenção das isoflavonas agliconas (IA), diversas etapas e condições extrativas foram avaliadas. Com isso, foi possível obtenção de uma FIA com elevado grau de pureza (92%). As NE contendo FIA foram produzidas e as gotículas apresentaram tamanho nanométrico, índice de polidispersão baixo e potencial zeta considerado satisfatório. A retenção cutânea das IA a partir das NE foi demonstrada em pele suína por experimento *in vitro* em células de difusão tipo Franz, confirmando viabilidade da formulação para aplicação tópica. Os compostos majoritários e desconhecidos formados durante o processo de hidrólise do extrato de soja foram identificados como 5-hidroxiacetilfurfural (HMF) e 5-etoximetil-2-furfural (EMF), sendo o último relatado pela primeira vez na soja. Ambos são derivados dos açúcares em condições extremas de pH, classificados como derivados furânicos, com grande importância no setor de biocombustíveis.

Palavras-chave: Soja; Fração enriquecida em isoflavonas agliconas; Nanoemulsões; Uso tópico; Derivados furânicos; Biocombustíveis.

ABSTRACT

Purification processes of soybeans: production of an isoflavone-rich fraction for incorporation into topical nanoemulsions and isolation of furanic derivatives

Isoflavones are phenolic compounds found in several leguminous, mainly in soybean seeds. These compounds have beneficial actions on the skin, being largely attributed to their aglycone forms. In this context, the present study aimed to obtain an isoflavone aglycone-rich fraction (IAF), intended to be incorporated into topical nanoemulsions (NE). In addition, the study aimed to isolate and identify two major unknown compounds formed during the steps of the IAF production. To obtain the isoflavone aglycones (IA) from soybeans, several steps and conditions were performed. Thus, it was possible to obtain an IAF with high purity (92%). The IAF-loaded NE were produced and the main physicochemical properties were evaluated, showing a nanometric droplet size with low polydispersity index and satisfactory ζ -potential. The skin retention of IA from NE was demonstrated by porcine ear skin mounted in Franz diffusion cells, confirming the viability of the formulation for topical application. The majority and unknown compounds formed during the acid hydrolysis of soybean extract have been identified as 5-hydroxymethylfurfural (HMF) and 5-ethoxymethyl-2-furfural (EMF), the latter being reported for the first time in soybeans. Both are derived from sugars, classified as furanic derivatives, with great importance in the field of biofuels.

Key-words: Soybean seeds; Isoflavone aglycone-rich fraction; topical nanoemulsions; furanic derivatives; biofuels.

LISTA DE FIGURAS

O conteúdo que compõe esta página foi retirado deste documento, pois compromete a confidencialidade dos dados dos capítulos.

LISTA DE TABELAS

O conteúdo que compõe esta página foi retirado deste documento, pois compromete a confidencialidade dos dados dos capítulos.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	21
OBJETIVOS	25
Objetivo geral	27
Objetivos específicos	27
CAPÍTULO I. Métodos de obtenção e conversão de isoflavonas em formas bioativas e incorporação em sistemas de uso tópico.	29
1.1. Introdução.....	31
1.2. Artigo de revisão - Métodos de obtenção e conversão de isoflavonas em formas bioativas e incorporação em sistemas de uso tópico	33
1.2.1. Abstract	35
1.2.2. Introdução.....	36
1.2.3. Ação das isoflavonas sobre a pele	38
1.2.4. Obtenção de extrato de soja contendo isoflavonas	41
1.2.5. Incorporação das isoflavonas em sistemas de uso tópico.....	53
1.2.6. Considerações finais	61
1.2.7. Referências	62
CAPÍTULO II. Incorporação de isoflavonas obtidas de soja em nanoemulsões tópicas	69
2.1. Introdução.....	71
2.2. Artigo científico - Incorporation of isoflavones obtained from a soybean-rich cultivar into topical nanoemulsions.	73
2.2.1. Abstract	75
2.2.2. Introduction.....	76
2.2.3. Materials and Methods	77
2.2.4. Results and discussion	82
2.2.5. Conclusions	92
2.2.6. Acknowledgements	92
2.2.7. References	93

CAPÍTULO III. Composição química de sementes de soja após hidrólise ácida em meio hidroetanólico e isolamento de derivados furânicos	97
3.1. Introdução.....	99
3.2. Artigo científico - Chemical composition of soybeans after acid hydrolysis in ethanol-water media and isolation of furanic derivatives	101
3.2.1. Abstract	103
3.2.2. Introduction.....	104
3.2.3. Materials and Methods	105
3.2.4. Results and discussion	108
3.2.5. Conclusions	114
3.2.6. Acknowledgements	115
3.2.7. References	115
DISCUSSÃO GERAL.....	119
CONCLUSÕES	127
REFERÊNCIAS.....	131

A soja, *Glycine max* L. Merr, é uma leguminosa amplamente distribuída pelo mundo, com grande importância econômica (ZUANAZZI & MAYORGA, 2010). O Brasil é atualmente o segundo maior produtor mundial desta planta, apresentando impacto significativo nas exportações do país (EMBRAPA, 2013). Esta ampla produção se deve, dentre muitos fatores, ao grande esforço dispensado pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, especialmente no desenvolvimento de novas cultivares de soja que possibilitam o incremento no teor produtivo das substâncias presentes no seu grão (EMBRAPA, 2013).

Diversos são os produtos que podem ser gerados a partir da soja e, conseqüentemente, apresentam diferentes aplicações com interesse em diferentes áreas industriais. Para o bom aproveitamento dos recursos que o material vegetal pode fornecer, além da utilização de cultivares com tecnologia diferenciada, os processos extrativos aplicados são determinantes para a geração do produto final. Alguns exemplos de produtos do seu grão são: (1) óleo vegetal; (2) farinha de soja utilizada na fabricação de alimentos; (3) produção de derivados tais como queijos e leite; (4) biodiesel obtido pela transesterificação do óleo de soja; (5) bioetanol obtido a partir dos carboidratos das suas cascas; (6) produção de fitoterápicos devido presença de compostos estrogênicos; entre outros (MANDARINO & ROESSING, 2001; SCHIRMER-MICHEL *et al.*, 2008; LEVIS *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2012; MILAZZO *et al.*, 2013).

A soja é constituída principalmente por proteínas, óleos, carboidratos, vitaminas e polifenóis (CHEN *et al.*, 2012). Nos seus grãos, assim como em seus derivados, as características biológicas de interesse na área de indústria farmacêutica são geralmente atribuídas às isoflavonas, cujas propriedades são associadas à redução de sintomas relacionados ao climatério (BARNES, 1998; SETCHELL, 1998), e mais recentemente, à atividade antioxidante e anti-envelhecimento da pele (KAO & CHEN, 2006; HUANG *et al.*, 2010). Estas últimas estando vinculadas especialmente às suas formas agliconas, devido a sua capacidade de penetrar na pele e, assim, exercer as ações terapêuticas (SCHMID *et al.*, 2003).

Neste contexto, a obtenção das isoflavonas agliconas a partir da soja, seguida da incorporação em formulações tópicas torna-se de grande atratividade para a área

farmacêutica e cosmética. Para contemplar esta idéia, primeiramente deve ser efetuada a extração da soja com realização de hidrólise mediada por catalisadores, uma vez que as isoflavonas ocorrem preferencialmente na forma de glicosídeos na planta *in natura* (ROSTAGNO *et al.*, 2009). Posteriormente, no desenvolvimento de formulações, a característica de baixa hidrossolubilidade das isoflavonas agliconas é um fator preponderante a ser considerado. Neste sentido, o uso de nanotecnologia é uma alternativa para a veiculação destas substâncias, possibilitando com isso, a incorporação a sistemas tópicos hidrofílicos, que possuem melhor aceitação perante os usuários (SILVA *et al.*, 2009).

Cabe ressaltar, ainda, que durante o procedimento de hidrólise do extrato de soja para obtenção de isoflavonas agliconas, diferentes substâncias podem ser geradas, caracterizando-se como contaminantes ou até com propriedades importantes a serem avaliadas (GENOVESE & LAJOLO, 2001; SCHWARTZ & SONTAG, 2009). No entanto, geralmente os estudos descrevem o comportamento das isoflavonas durante a hidrólise (ROSTAGNO *et al.*, 2009), sendo que os demais compostos originados nestas condições, muitas vezes não são explorados.

Com base no exposto, a extração de uma cultivar de soja enriquecida em isoflavonas, buscando obtenção das formas agliconas, seguido de etapas de purificação e incorporação da fração em sistemas nanoemulsionados de uso tópico, foram os alvos para execução deste trabalho. Complementarmente, devido à escassa literatura envolvendo a caracterização de compostos formados após hidrólise ácida do extrato de soja, o isolamento de compostos desconhecidos formados nestas condições também foi considerado para a realização dos estudos.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Realizar extração da semente desengordurada de soja seguida de hidrólise ácida e etapas de purificação a fim de obter uma fração enriquecida em isoflavonas agliconas, visando incorporação em sistemas nanoemulsionados para uso tópico; bem como isolar e caracterizar constituintes remanescentes no extrato após etapa de fracionamento das isoflavonas.

Objetivos específicos

- Obter fração enriquecida em isoflavonas agliconas (FIA) a partir de sementes de soja;
- Avaliar a viabilidade de incorporação da FIA em nanoemulsões, caracterizando-as através de ensaios físico-químicos;
- Avaliar a retenção cutânea das isoflavonas através de experimento *in vitro* com pele suína após 8 h da aplicação da nanoemulsão contendo FIA.
- Isolar, identificar e avaliar comportamento dos compostos desconhecidos obtidos durante processos de obtenção da FIA;

CAPÍTULO I

Métodos de obtenção e conversão de isoflavonas em formas bioativas e
incorporação em sistemas de uso tópico

1.1. Introdução

Durante a extração de compostos presentes em plantas diferentes parâmetros podem influenciar no rendimento destes ao final do processo. Assim, a polaridade, quantidade de solvente, temperatura, proporção de droga:solvente, tipo de amostra e tempo de extração são alguns exemplos dos fatores que podem influenciar a extração dos compostos de interesse a partir de materiais vegetais (SEIDEL, 2006).

Na literatura, os relatos de estudos extrativos de isoflavonas da soja geralmente avaliam diferentes técnicas e condições dos métodos, para fins de comparação de rendimentos ou em alguns casos, otimização de processos (ROSTAGNO *et al.*, 2009). No caso específico da soja, também é importante a escolha dos tipos de tratamentos complementares que serão realizados, sendo o desengorduramento e a hidrólise os principais exemplos (GIANNOCCARO, WANG & CHEN, 2006).

As isoflavonas têm sido avaliadas quanto suas ações sobre a pele. Ampla literatura existe quanto às atividades tópicas dos compostos isolados, e recentemente sobre atividades dos extratos de soja brutos, hidrolisados ou purificados (SCHMID & ZULLI, 2002; SUDEL *et al.*, 2005).

Focando na ação sobre a pele, estudos vêm descrevendo o desenvolvimento de formulações tópicas contendo tanto estas substâncias isoladas, quanto os extratos de soja. Diversas são as formulações que estão sendo propostas, apresentando descrições desde sua incorporação à sistemas tradicionais, como emulsões óleo em água, até estudos mais diferenciados utilizando nanotecnologia (DWIECKI *et al.*, 2009; VARGAS *et al.*, 2012; ZAMPIERI *et al.*, 2013).

Para melhor relatar a vasta gama de literatura acerca do tema exposto, este capítulo é apresentado na forma de artigo de revisão (páginas 33-67), com intuito de ser submetido a um periódico da área, e por este motivo seu conteúdo não está disponível neste documento.

CAPÍTULO II

Incorporação de isoflavonas obtidas de soja em nanoemulsões tópicas

2.1. Introdução

A obtenção de isoflavonas na forma de agliconas é interessante para o setor cosmético e farmacêutico devido às diversas atividades biológicas que estas apresentam. A extração da soja seguida de procedimento de hidrólise e purificação tem sido a metodologia mais descrita para a obtenção das principais isoflavonas da soja na forma livre, quais sejam, genisteína, daidzeína e gliciteína (ROSTAGNO *et al.*, 2009). A incorporação dessas isoflavonas em produtos de uso tópico, geralmente de natureza hidrofílica, como hidrogéis ou emulsões óleo em água, representa um desafio farmacotécnico devido à reduzida hidrossolubilidade desses compostos polifenólicos (KITAGAWA *et al.*, 2010).

Neste sentido, nanoemulsões têm sido consideradas como um potencial sistema para administração tópica de moléculas de reduzida hidrossolubilidade, que podem estar localizadas no núcleo oleoso e/ou interface da nanoestrutura. Esses sistemas são dispersões nanométricas de gotículas oleosas em uma fase aquosa externa, estabilizada por um sistema tensoativo (BOUCHEMAL *et al.*, 2004, ANTON & VANDAMME, 2011). Devido ao reduzido tamanho da gotícula, tais sistemas apresentam como vantagem a possibilidade de formação de um depósito mais uniforme sobre a pele e uma superfície de contato superior aos sistemas convencionais. Assim, relatos de aumento na permeação cutânea de substâncias ativas a partir das nanoemulsões têm sido descritos (FASOLO *et al.*, 2009).

Estudos prévios realizados pelo nosso grupo de pesquisa (SILVA *et al.* 2009, VARGAS *et al.*, 2012) demonstraram a preparação, caracterização e permeação cutânea de nanoemulsões contendo a isoflavona genisteína. A escolha dos constituintes da formulação influenciou as características físico-químicas, bem como melhorou a retenção cutânea *in vitro* da genisteína. Tais resultados demonstram, portanto, a boa perspectiva destes sistemas visando o uso tópico da genisteína. Em continuidade, o presente capítulo descreve a obtenção de uma fração enriquecida em isoflavonas agliconas a partir de sementes de soja de uma cultivar rica nestes compostos, bem como sua incorporação em nanoemulsões para uso tópico.

Os resultados obtidos durante experimentos descritos neste capítulo (páginas 73-96) não se encontram disponíveis neste documento devido pretensão de depósito de patente.

CAPÍTULO III

Composição química de sementes de soja após hidrólise ácida em meio
hidroetanólico e isolamento de derivados furânicos

3.1. Introdução

Os compostos de interesse farmacêutico obtidos após extração dos grãos de soja desengordurados são geralmente as isoflavonas e as saponinas (RICKERT *et al.*, 2004). Uma etapa adicional de hidrólise ácida ou enzimática para transformação até as formas bioativas destes compostos é por vezes necessária. Após tal etapa, além da obtenção das isoflavonas agliconas e dos triterpenos (RUPASINGHE *et al.*, 2003; ROSTAGNO *et al.*, 2009), diversos compostos podem ser formados e a sua identificação torna-se importante para caracterização do perfil químico do extrato obtido. A presença de compostos desconhecidos formados após hidrólise ácida da soja tem sido relatada, sem, contudo, estudos sobre o isolamento e identificação dos mesmos (GENOVESE & LAJOLO, 2001; SCHWARTZ & SONTAG, 2009).

As sementes da soja são constituídas por óleo (~20%), proteínas (~60%), carboidratos (~35%), minerais (~5%), entre outros compostos (CARRÃO-PANIZZI & MANDARINO, 1998; CHEN *et al.*, 2012). Os carboidratos insolúveis das sementes da soja consistem em um complexo de polissacarídeos como a celulose, hemicelulose e pectina. A sacarose é o principal açúcar solúvel presente nos grãos de soja e representa cerca de 5% do total de carboidratos (CARRÃO-PANIZZI & MANDARINO, 1998). Devido presença dos açúcares, já é descrito a geração de produtos de degradação destes compostos após hidrólise ácida de cascas de soja ou durante reação de Maillard da farinha de soja (SHIRMER-MICHEL *et al.*, 2008; RÚFIAN-HENARES *et al.*, 2009). No primeiro caso é relatada a produção de etanol, importante biocombustível. No segundo caso, é descrita a produção de furfural e 5-hidroximetilfurfural (HMF), ambos compostos voláteis conhecidos como flavorizantes de alimentos durante seu processamento.

O presente capítulo descreve a determinação dos compostos majoritários formados após hidrólise ácida das sementes desengorduradas de soja, visando obter informações sobre os produtos que a matéria-prima utilizada ao longo do estudo pode fornecer, bem como a sua importância no setor farmacêutico ou demais setores industriais. Os resultados obtidos foram redigidos na forma de artigo científico (páginas 101-117), com intuito de submeter a um periódico da área, e por este motivo o seu conteúdo não se encontra disponível neste documento.

DISCUSSÃO GERAL

As sementes de soja são uma potencial fonte de geração de produtos e subprodutos para diferentes áreas industriais, tais como alimentícia, farmacêutica, cosmética e química. Os produtos gerados com esta matéria-prima estão sendo constantemente estudados, e diversas linhas de investigação têm sido conduzidas. Dentre estas, é promissor os estudos acerca da utilização das isoflavonas da soja, uma vez que é bem relatada sua importância na área clínica.

Desta forma, o presente trabalho realizou procedimentos de obtenção de uma fração enriquecida em isoflavonas agliconas da soja (FIA) para uso tópico devido as ações benéficas que tais substâncias apresentam sobre a pele. No decorrer do trabalho foi necessária a utilização de hidrólise ácida para a transformação das formas glicosídicas até formas bioativas: genisteína, daidzeína e gliciteína. Contudo, após o processo de hidrólise, pôde-se observar através dos resultados obtidos a presença de dois compostos majoritários em relação às isoflavonas. Tal fato possibilitou uma frente paralela de pesquisa, pois além da retirada destes interferentes para aquisição da fração pura em isoflavonas agliconas, buscou-se a identificação destes compostos desconhecidos, uma vez que não existiam relatos na literatura sobre a sua identidade.

Para organizar as frentes de pesquisa utilizadas na elaboração deste trabalho, os assuntos e resultados foram divididos em três capítulos. Na primeira etapa do trabalho (Capítulo I), foi realizada uma busca de literatura acerca de processos de obtenção das isoflavonas a partir de sementes e derivados da soja, bem como a ação das isoflavonas na pele e formulações tópicas que estão sendo desenvolvidas para incorporação de tais compostos. O artigo de revisão gerado (**item 1.2**) permitiu uma melhor compreensão do estado da arte para a utilização destes compostos pela via tópica, auxiliando na definição de qual formulação se adequaria para incorporação da FIA que seria obtida no decorrer deste trabalho.

O conteúdo que compõe as páginas 122 à 125 foi retirado deste documento pois compromete a confidencialidade dos dados dos capítulos.

CONCLUSÕES

O conteúdo que compõe a página 129 foi retirado deste documento pois compromete a confidencialidade dos dados dos capítulos.

REFERÊNCIAS

ANTON, N.; VANDAMME, T.F. Nano-emulsions and micro-emulsions: clarifications of the critical differences. **Pharmaceutical Research**, v. 28, p. 978 - 985, 2011.

ÁVILA, M.R.; BRACCINI, A.L; ALBRECHT, L.P.; SCAPIM, C.A.; MANDARINO, J.C.G.; BAZO, G.L. CABRAL, Y.C.F. Effect of storage period on isoflavone content and physiological quality of conventional and transgenic soybean seeds. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 33, p. 149 - 161, 2011.

BARNES, S. Evolution of the health benefits of soy isoflavones. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 217, p. 386 - 396, 1998.

BOUCHEMAL, K.; BRIANÇON, S.; PERRIER, E.; FESSI, H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 280, p. 241 - 251, 2004.

CAPUANO, E.; FOGLIANO, V. Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies. **Food Science and Technology**, v. 44, p. 793 – 810, 2011.

CARRÃO-PANIZZI, M.C.; MANDARINO, J.M.G. **SOJA - Potencial de uso na dieta brasileira**, Londrina: EMBRAPA-CNPSo, (EMBRAPA-CNPSo. Documentos, 113), 1998. 16p.

CHEN K.I.; CHEN, K.I.; ERH, M.H.; SU, N.W.; LIU, W.H.; CHOU, C.C.; CHENG, K.C. Soyfoods and soybean products: from traditional use to modern applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, p. 9 - 22, 2012.

DUTTA, S.; DE, S.; ALAM, M.I.; ABU-OMAR; M.M.; SAHA, B. Direct conversion of cellulose and lignocellulosic biomass into chemicals and biofuel with metal chloride catalysts. **Journal of Catalysis**, v. 288, p. 8 - 15, 2012.

DWIECKI, K.; NEUNERT, G.; POLEWSKI, P.; POLEWSKI, K.; J. Antioxidant activity of daidzein, a natural antioxidant, and its spectroscopic properties in organic solvents and phosphatidylcholine liposomes. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 96, p. 242 - 248, 2009.

EMBRAPA SOJA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=22&cod_pai=16>. Acesso em 01/07/2013.

FASOLO, D.; BASSANI, V.; TEIXEIRA, H. F. Development of topical nanoemulsions containing quercetin and 3-O-methylquercetin. **Die Pharmazie**, v. 64, p. 1 - 5, 2009.

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

GIANNOCCARO, E.; WANG, Y.; CHEN, P. Effects of Solvent, Temperature, Time, Solvent-to-Sample Ratio, Sample Size, and Defatting on the Extraction of Soluble Sugars in Soybean. **Journal of food science**, v. 71, n. 1, p. 59 – 64, 2006.

GRUTER, G. J. M.; DAUTZENBERG, F. Method for the synthesis of 5-alkoxymethylfurfural ethers and their use. **European Patent Application**, EP 1834950A1, 2007.

HU, L.; ZHAO, G.; HAO, W.; TANG, X.; SUN, Y.; LIN, L.; LIU, S. Catalytic conversion of biomass-derived carbohydrates into fuels and chemicals via furanic aldehydes. **RSC Advances**, v. 2, p. 11184 - 11206, 2012.

HUANG, C-C.; HSU, B-Y.; WU, N-L.; TSUI, W-H.; LIN, T-J.; SU, C-C. ; HUNG, C-F. Anti-photoaging effects of soy isoflavone extract (aglycone and acetylglucoside form) from Soybean. **International Journal of Molecular Science**, v. 12, p. 4782 - 4795, 2010.

KAO, T.H.; CHEN, B.H. Functional components in soybean cake and their effects on antioxidant activity. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 54, p. 7544 – 7555, 2006.

KITAGAWA, S.; INOUE, K.; TERAOKA, R.; MORITA, S-Y. Enhanced skin delivery of genistein and other two isoflavones by microemulsion and prevention against UV irradiation-induced erythema formation. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 58, n. 3, p. 398 - 401, 2010.

LEVIS, S.; STRICKMAN-STEIN, N.; DOERGE, D.R.; KRISCHER, J. Design and baseline characteristics of the soy phytoestrogens as replacement estrogen (SPARE) study – A clinical trial of the effects of soy isoflavones in menopausal women. **Contemporary Clinical Trials**, 31, 293 - 302, 2010.

MANDARINO, J.M.G.; ROESSING, A.C.; **Tecnologia para produção do óleo de soja: descrição das etapas, equipamentos, produtos e subprodutos**, Londrina: Embrapa Soja, 2001, 40p.

MILAZZO, M.F.; SPINA, F.; PRIMERANO, P.; BART, J.C.J. Soy biodiesel pathways: Global prospects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 26, p. 579 - 624, 2013.

RICKERT, D.A.; MEYER, M.A.; HU, J.; MURPHY, P.A. Effect of extraction pH and temperature on isoflavone and saponin partitioning and profile during soy protein isolate production. **Journal of Food Science**, v. 69, n. 8, p. C623 - C631, 2004.

ROSTAGNO, M.A.; ARAÚJO, J.M.A.; SANDI, D. Supercritical fluid extraction of isoflavones from soybean flour. **Food Chemistry**, v. 78, p. 111 - 117, 2002.

ROSTAGNO, M.A.; VILLARES, A.; GUILLAMÓN, E.; GÁRCIA-LAFUENTE, A.; MARTINÉZ, J.A. Sample preparation for the analysis of isoflavone from soybean and soy foods. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 2 - 29, 2009.

RUFÍAN-HENARES, J.A.; DELGADO-ANDRADE, C.; MORALES, F.J. Assessing the Maillard reaction development during the toasting process of common flours employed by the cereal products industry. **Food Chemistry**, v. 114, p. 93 - 99, 2009.

RUPASINGHE, H.P.V.; JACKSON, C.J. C.; POYSA, V.; BERARDO, C. D., BEWLEY J. D.; JENKINSON J. Soyasapogenol A and B distribution in soybean (*Glycine max* L. Merr.) in relation to seed physiology, genetic variability, and growing location. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 51, p. 5888 - 5894, 2003.

SCHIRMER-MICHEL, A.C.; FLORES, S.H.; HERTZ, P.F.; MATOS, G.S.; AYUB, M.A.Z. Production of ethanol from soybean hull hydrolysate by osmotolerant *Candida guilliermondii* NRRL Y-2075. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 2898 - 2904, 2008.

SCHMID, D.; ZULLI, F.; NISSEN, H-P.; PRIEUR, H. Penetration and metabolism of isoflavones in human skin. **Cosmetics & Toiletries Magazine**, v. 118, p. 71 - 74, 2003.

SCHMID, D.; ZULLI, F. Topically applied soy isoflavones increase skin thickness. **Cosmetics & Toiletries Magazine**, v. 117, n.6, p. 45 - 50, 2002.

SCHWARTZ, H.; SONTAG, G., Comparison of sample preparation methods for analysis of isoflavones in foodstuffs. **Analytica Chimica Acta**, v. 633, p. 204 - 215, 2009.

SEIDEL, V. **Initial and bulk extraction**, em: Natural Products Isolation, 2nd ed. Editado por Satyajit D. Sarker, Zahid Latif, Alexander I. Gray. Humana Press Inc.: Totowa, 2006.

SETCHELL, K.D. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. **American Journal Clinical of Nutrition**, v.134, n.6, p.1333S - 1343S, 1998. Supplement.

SILVA, A.P.C.; B. NUNES, R.; DE OLIVEIRA, M.C.; KOESTER L. S.; MAYORGA, P.; BASSANI, V. L.; TEIXEIRA, H. F. Development of topical nanoemulsions containing the isoflavone genistein, **Die Pharmazie**, v. 64, p. 32 - 35, 2009.

SUDEL, K. M.; VENZKE, K.; MIELKE, H.; BREITENBACH, U.; MUNDT, C.; JASPERS, S.; KOOP, U.; SAUERMAN, K.; KNUBMANN-HARTIG, E.; MOLL, I.; GERCKEN, G.; YOUNG, A. R.; F. STAB', WENCK, H.; GALLINAT, S. Novel aspects of intrinsic and extrinsic aging of human skin: beneficial effects of soy extract. **Photochemistry and Photobiology**, v. 81, p. 581 - 587, 2005.

van PUTTEN, R.J.; van DER WAAL, J.C.; DE JONG, E.; RASRENDRA, C.B.; HEERES, H.J.; de VRIES J.G. Hydroxymethylfurfural, A versatile platform chemical made from renewable resources. **Chemical Reviews**, v. 113, p. 1499 - 1597, 2013.

VARGAS, B.A.; BIDONE, J.; OLIVEIRA, K.L.; KOESTER, L.S.; BASSANI, V.L.; TEIXEIRA, H.F. Development of topical hydrogels containing genistein-loaded nanoemulsions. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 8, p. 1 - 7, 2012.

WASHINGTON, C. Stability of lipid emulsions for drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 20, p. 131 - 145, 1996.

ZAMPIERI, A.L.T.C.; FERREIRA, F.S.; RESENDE, É.C.; GAETI, M.P. N.; DINIZ, D.G.A.; TAVEIRA, S.F.; LIMA, E.M. Biodegradable polymeric nanocapsules based on poly (DL-lactide) for genistein topical delivery: obtention, characterization and skin permeation studies. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 9, p. 527 - 534, 2012.

ZUANAZZI, J. A. S.; MAYORGA, P. Fitoprodutos e desenvolvimento económico. **Quimica Nova**, v. 33, n. 6, 1421 - 1428, 2010.