

INÊS CHAMEL JOSÉ

**ESTABILIDADE OXIDATIVA E DE ISOFLAVONAS DE GRÃOS DE SOJA
COM AUSÊNCIA DE LIPOXIGENASES E COM REDUZIDO TEOR DE ÁCIDO
LINOLÊNICO DURANTE O ARMAZENAMENTO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2005

INÊS CHAMEL JOSÉ

**ESTABILIDADE OXIDATIVA E DE ISOFLAVONAS DE GRÃOS DE SOJA
COM AUSÊNCIA DE LIPOXIGENASES E COM REDUZIDO TEOR DE ÁCIDO
LINOLÊNICO DURANTE O ARMAZENAMENTO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 29 de julho de 2005.

Prof. José Benício Paes Chaves
(Conselheiro)

Prof. Marco Túlio Coelho Silva
(Conselheiro)

Maria Regina Araújo Gomes

Prof. Sebastião Tavares de Rezende

Prof. Maurilio Alves Moreira
(Orientador)

À minha amada e saudosa mãe, que, apesar de não ter podido estar ao meu lado até a conclusão deste trabalho, foi fonte de incentivo, força e otimismo.

Ao meu pai, fonte de ensinamentos e presença constante em minha vida.

Ao Aroldo, exemplo de amor e dedicação ilimitados.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença constante.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Tecnologia de Alimentos e ao Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), pela oportunidade de realizar este Curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Maurilio Alves Moreira, pela orientação segura, pelo incentivo na realização deste trabalho e pela amizade.

Ao professor José Benício Paes Chaves, pelos conhecimentos transmitidos, pela atenção a mim dispensada e pela valiosa colaboração.

Ao professor Marco Túlio Coelho Silva, pela amizade e pelas sugestões.

Ao professor Everaldo Gonçalves de Barros, pela amizade e pelo apoio constante.

Ao professor Sebastião Tavares de Rezende, pela amizade e pelo constante incentivo.

Aos meus irmãos Elias e Eduardo, à minha cunhada Maria do Socorro e aos meus sobrinhos André e Tiago, pelos momentos felizes e pelo apoio irrestrito.

Ao meu amigo Newton Deniz Piovesan, pela convivência fraterna e pelas sugestões.

Ao Jander Mendes Gouvêa, pelo apoio e pelos momentos agradáveis de convivência no laboratório.

Ao Fábio Ramos Alves, pela amizade e por tornar o trabalho experimental menos penoso e solitário quando se estendia até a madrugada.

À estudante Ranielle Aparecida Reis Fagundes, pela colaboração na execução do trabalho experimental e, principalmente, pela dedicação e amizade.

À estudante Josiane Isabela S. Rodrigues, pela colaboração nas análises dos teores de isoflavonas.

Ao Carlos Itajair Gomes (Pardal), pela confecção das câmaras de armazenamento dos grãos.

Ao Pedro Manoel do Nascimento, pela confecção de algumas vidrarias necessárias ao experimento.

À Gláucia Virgínia da Silva, pela presteza no preparo da vidraria utilizada na execução do experimento.

Aos funcionários e colegas do BIOAGRO, pela agradável convivência.

A todos que, de algum modo, contribuíram para o êxito deste trabalho.

BIOGRAFIA

INÊS CHAMEL JOSÉ, filha de Miguel José e Maria do Carmo Ubaldo José, nasceu em Visconde do Rio Branco, MG, onde cursou o primeiro e o segundo grau.

Em 1985, graduou-se em Engenharia de Alimentos pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG.

Em março de 1993, concluiu o Curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela UFV.

Foi bolsista do Programa RHAE/CNPq, na categoria de Desenvolvimento Tecnológico Industrial, de maio de 1993 a junho de 1995, desenvolvendo atividades de pesquisa no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO)/UFV.

De julho de 1995 a julho de 1999, atuou como Pesquisadora da Fundação Arthur Bernardes, desenvolvendo atividades no BIOAGRO/UFV.

Em agosto de 1999, iniciou o Curso de Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos na UFV, submetendo-se à defesa de tese em 29 de julho de 2005.

Atualmente, leciona na Universidade Presidente Antônio Carlos/ Campus V, em Leopoldina, MG, e na Faculdade de Minas, em Muriaé, MG.

CONTEÚDO

RESUMO	ix	
ABSTRACT	xii	
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1	
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4	
2.1. Importância Econômica da Soja e Derivados.....	4	
2.2. Classificação, Comercialização e Armazenamento de Soja	6	
2.3. Importância da Soja como Alimento.....	7	
2.4. Compostos Relacionados com o Sabor e Odor Característicos de Soja e Produtos Derivados.....	10	
2.5. Melhoramento Genético da Qualidade da Soja.....	19	
2.5.1. Melhoramento pela Redução do Sabor <i>Beany</i>	20	
2.5.2. Melhoramento da Qualidade do Óleo.....	25	
2.6. Índices de Oxidação.....	29	
3. REFERÊNCIAS	35	
CAPÍTULO 1		
EFEITO DAS ISOENZIMAS LIPOXIGENASES E DO TEOR DE ÁCIDO LINOLÊNICO NA ESTABILIDADE OXIDATIVA DE GRÃOS DE SOJA ARMAZENADOS		46
1. INTRODUÇÃO.....	46	
2. MATERIAL E MÉTODOS	49	
2.1. Material Genético	49	

2.2. Análises para Seleção dos Materiais Genéticos	50
2.2.1. Testes Colorimétricos para a Detecção de Lipoxigenases.....	50
2.2.2. Determinação de Ácidos Graxos.....	51
2.3. Caracterização Bioquímica dos Grãos	51
2.3.1. Determinação de Umidade.....	51
2.3.2. Determinação de Proteínas.....	52
2.3.3. Determinação de Lipídeos	52
2.3.4. Determinação de Cinzas	52
2.3.5. Determinação de Carboidratos Totais.....	52
2.3.6. Análise Eletroforética de Proteínas	52
2.4. Armazenamento dos Grãos de Soja	53
2.5. Avaliação da Qualidade dos Grãos Armazenados	54
2.5.1. Determinação de Ácidos Graxos.....	54
2.5.2. Determinação do Conteúdo de Hexanal	54
2.5.3. Determinação do Índice de TBA (Ácido 2-Tiobarbitúrico)	55
2.6. Análise Estatística	56
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
3.1. Caracterização do Material Genético.....	57
3.2. Avaliação da Qualidade dos Grãos Armazenados	62
3.2.1. Composição em Ácidos Graxos	62
3.2.2. Índices de Oxidação.....	70
4. CONCLUSÕES.....	77
5. REFERÊNCIAS	78
CAPÍTULO 2	
TEORES DE ISOFLAVONAS EM GRÃOS DE SOJA ARMAZENADOS	83
1. INTRODUÇÃO.....	83
2. MATERIAL E MÉTODOS	85
2.1. Material Genético	85
2.2. Armazenamento dos Grãos de Soja	86
2.3. Determinação de Isoflavonas.....	87
2.4. Ensaio Enzimático de β -Glicosidases	88
2.4.1. Preparo do Extrato Enzimático.....	88
2.4.2. Determinação da Atividade de β -Glicosidase.....	88
2.4.3. Determinação do Tempo de Reação.....	89

2.4.4. Efeito do pH	89
2.4.5. Efeito da Temperatura.....	89
2.5. Análise Estatística	89
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	91
3.1. Teores de Isoflavonas Durante o Armazenamento.....	91
3.2. Ensaio Enzimático de β -Glicosidases	103
3.2.1. Determinação do Tempo de Reação.....	103
3.2.2. Efeito do pH	103
3.2.3. Efeito da Temperatura.....	106
4. CONCLUSÕES.....	109
5. REFERÊNCIAS	110

RESUMO

JOSÉ, Inês Chamel, D. S., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2005.
Estabilidade oxidativa e de isoflavonas de grãos de soja com ausência de lipoxigenases e com reduzido teor de ácido linolênico durante o armazenamento. Orientador: Maurilio Alves Moreira. Conselheiros: José Benício Paes Chaves e Marco Túlio Coelho Silva.

Para avaliar a estabilidade oxidativa e de isoflavonas de grãos de soja com ausência das isoenzimas lipoxigenases (LOX) e com reduzido teor de ácido linolênico, os grãos foram armazenados a 25 e 35 °C, por oito meses. Os efeitos das LOX e do teor de ácido linolênico na estabilidade oxidativa de grãos foram avaliados utilizando-se quatro genótipos de soja contrastantes quanto à presença ou ausência de LOX (LOX⁺ ou LOX⁻) e quanto ao teor de ácido linolênico normal (LNN^N) ou reduzido (LNN^R). Devido à alta porcentagem de grãos quebrados, normalmente utilizados para fins industriais, a soja foi armazenada nas formas de grãos inteiros e quebrados. Como as LOX atuam tanto sobre o ácido linoléico quanto sobre o linolênico, as determinações do teor de hexanal e do índice do ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) foram utilizadas como índices de oxidação, por quantificarem produtos obtidos por rotas metabólicas distintas. As avaliações foram realizadas no início do armazenamento e após dois, quatro, seis e oito meses. O período de armazenamento considerado não foi suficiente para que as alterações nos

teores de ácidos graxos apresentassem tendência definida. Os grãos dos genótipos LOX⁻, inteiros e quebrados, independentemente dos diferentes teores de ácido linolênico e da temperatura a que foram submetidos, apresentaram praticamente os mesmos teores médios de hexanal produzido, ao longo do período de armazenamento. Entretanto, os grãos dos genótipos LOX⁺, inteiros e quebrados, já mostravam, no início do armazenamento, produção de hexanal no mínimo duas vezes maior que a dos genótipos LOX⁻, havendo, no decorrer do tempo, aumento significativo desses teores. As maiores quantidades de hexanal produzido durante o armazenamento foram observadas para o genótipo LOX⁺LNN^R, nas formas de grãos inteiros e quebrados, ocorrendo maior produção a 35 °C. Esse genótipo apresentou maior teor de ácido linoléico que o genótipo LOX⁺LNN^N, podendo a maior produção desse aldeído em genótipos LOX⁺LNN^R ser justificada pelo fato de o hexanal ser formado a partir do 13-hidroperóxido derivado do ácido linoléico. Os valores de índice de TBA de grãos dos genótipos LOX⁻, inteiros e quebrados, como verificado para os teores de hexanal, mostraram-se bem mais baixos que aqueles obtidos para grãos dos genótipos LOX⁺, durante todo o período de armazenamento, em ambas as temperaturas. Reafirma-se, assim, o envolvimento das LOX na oxidação de ácidos graxos poliinsaturados. Entre os genótipos LOX⁻, os grãos tanto inteiros quanto quebrados de LOX⁻LNN^R apresentaram menores índices de TBA que os de LOX⁻LNN^N. Porém, nos genótipos LOX⁻ foi observado aumento no índice de TBA durante o armazenamento, nas duas condições de temperatura, o que pode ser explicado pela produção de aldeídos por vias oxidativas não-enzimáticas. Entre os genótipos LOX⁺, grãos inteiros e quebrados de LOX⁺LNN^R apresentaram menores índices de TBA que os de LOX⁺LNN^N, mantendo-se esses valores constantes ao longo do tempo. Substâncias reativas com TBA são produzidas em maiores quantidades a partir de ácidos graxos contendo três ou mais insaturações, justificando, assim, o fato de genótipos com baixos teores de ácido linolênico terem apresentado índices de TBA mais baixos, tanto na presença quanto na ausência de LOX. Para avaliar a estabilidade das diferentes isoflavonas de soja, foram utilizados grãos intactos dos genótipos LOX⁻LNN^R e LOX⁺LNN^N, sendo os teores de isoflavonas determinados no início do armazenamento e após dois, quatro e oito meses. A composição de

isoflavonas dos grãos, de ambos os genótipos de soja, não se manteve estável nas duas condições de armazenamento consideradas. No processo de interconversão de formas, parece ocorrerem eventos simultâneos envolvendo descarboxilação dos malonilglicosídeos para acetilglicosídeos, desesterificação de malonil e acetilglicosídeos para β -glicosídeos, bem como uma possível transformação desses para as formas agliconas. Além desses eventos, processos de síntese podem estar envolvidos, pois ligeiro incremento no teor de isoflavonas foi observado. O aumento de malonilglicetina, ou das formas agliconas, talvez possa ser resultado de síntese, porém o envolvimento das isoenzimas β -glicosidases no aumento das isoflavonas agliconas também deve ser considerado.

ABSTRACT

JOSÉ, Inês Chamel, D. S., Universidade Federal de Viçosa, July 2005.
Isoflavone and oxidative stability of soybean grains lacking lipoxygenases and with low linolenic acid content during storage.
Adviser: Maurilio Alves Moreira. Committee Members: José Benício Paes Chaves and Marco Túlio Coelho Silva.

To evaluate the isoflavone and oxidative stability in soybean lacking lipoxygenase (LOX) isoenzymes and low linolenic acid content, grains were stored at 25 and 35 °C, for eight months. The effects of LOX and linolenic acid content on oxidative stability were evaluated in four contrasting soybean genotypes for the presence or absence of LOX (LOX⁺ or LOX⁻) and for normal (LNN^N) or reduced (LNN^R) linolenic acid content. Due to the high percentage of broken grains, usually destined for processing industries, whole and broken grains were stored. Given that LOX affects linolenic as well as linoleic acids, the determinations of the hexanal content and the 2-thiobarbituric acid (TBA) value were used as oxidation indexes, since they quantify products obtained by different metabolic pathways. The assays were carried out at the beginning of the storage and after two, four, six and eight months. The storage period was not enough for the alterations in the fatty acid content to present a defined tendency. Whole and broken LOX⁻ grains, independent of the different linolenic acid content and the storage temperature, had almost the same mean hexanal

content along the storage period. However, whole and broken LOX⁺ grains already shown, at the beginning of storage, at least twofold larger hexanal production than LOX⁻ genotypes, occurring significant increase in hexanal content with time. The largest amounts of produced hexanal during the storage were found for whole and broken LOX⁺LNN^R grains, occurring larger production at 35 °C. This genotype showed higher linoleic acid content than LOX⁺LNN^N genotype. This is explained by the fact that hexanal is formed from 13-hydroperoxide derived from linoleic acid. During the whole storage period, TBA values for the whole and broken LOX⁻ grains, as found for hexanal content, showed much lower values than those obtained for LOX⁺ grains, in both temperatures. It is therefore confirmed the involvement of LOX in the oxidation of polyunsaturated fatty acids. Among the LOX⁻ genotypes, both whole and broken LOX⁻LNN^R grains had lower TBA values than LOX⁻LNN^N. However, there was an increase in the TBA value during storage for LOX⁻ genotypes, in both temperatures, which can be explained by the production of aldehydes via non-enzymatic oxidative pathways. Among LOX⁺ genotypes, whole and broken LOX⁺LNN^R grains had lower TBA values than LOX⁺LNN^N, with constant TBA values along the time. TBA-reacting substances are produced in larger amounts only from fatty acids containing three or more unsaturations, which justify the fact that genotypes with low linolenic acid content showed lower TBA values in the presence and in the absence of LOX. Intact grains of genotypes LOX⁻LNN^R and LOX⁺LNN^N were used to evaluate the stability of the different soybean isoflavones. Isoflavone content was determined at the beginning of storage and after two, four and eight months. Composition of the grain isoflavones from both soybean genotypes was not stable under the two storage conditions. In the process of form interconversion, it seems that occur simultaneous events involving malonyl glycoside decarboxylation to acetyl glycosides, malonyl and acetylglycosides deesterification to β -glycosides, as well as their possible transformation to aglycones. Besides these events, synthesis processes may be involved, as a slight increase in isoflavone content was observed. The increase in malonyl glycitin or aglycones maybe the result of synthesis, however the involvement of β -glycosidase isoenzymes in the increase of aglycone isoflavones should also be considered.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A soja é uma leguminosa com uma combinação única de óleo (20%) e proteína (40%) de alta qualidade. Seu potencial como opção saudável e nutritiva de alimentação é imenso, porém ainda não totalmente explorado (SOUSA, 2000). A soja é importante não somente pelo seu valor nutritivo, mas também por apresentar vários constituintes biologicamente ativos, que atuam na prevenção de doenças cardiovasculares, câncer, osteoporose e na redução de colesterol, além de amenizar os sintomas da menopausa (PUMAR, 2000). Dados experimentais e clínicos têm mostrado que as isoflavonas presentes no grão representam alternativa promissora na prevenção e, ou, tratamento de diversas doenças crônicas (SETCHELL, 1998; MESSINA, 2000).

Felizmente, a pesquisa sobre a soja e alimentos à base de soja acelerou-se a uma taxa extraordinária recentemente, e haverá muito mais informações definitivas sobre o papel dos alimentos à base de soja na prevenção e tratamento de doenças num futuro bastante próximo. Para homens, mulheres e crianças, a soja parece ser uma das fontes de alimentos mais nutritivas da natureza (KLEIN, 2000).

Há, entretanto, grande limitação ao uso direto de produtos protéicos derivados de soja na alimentação humana nos países ocidentais. Essa limitação se deve, principalmente, ao fato de tais produtos apresentarem sabores indesejáveis com relação aos padrões de palatabilidade desses povos,

comprometendo suas propriedades sensoriais e diminuindo sua aceitabilidade (MORAIS et al., 1996).

Uma pesquisa sobre a atitude do consumidor em relação à soja e produtos derivados foi realizada por Behrens e Silva (2004), com 100 indivíduos. De forma geral, a atitude dos entrevistados foi positiva, porém os autores concluíram que as indústrias alimentícias que desejam lançar no mercado produtos à base de soja devem investir tanto nos aspectos sensoriais do produto quanto na divulgação dos benefícios do consumo de soja à saúde humana, a fim de levantar expectativas positivas nos consumidores e estimular a compra e o consumo desses produtos.

Há dois grupos principais de sabores objetáveis nos produtos protéicos de soja. Um deles é composto pelos voláteis, responsáveis pelos odores “gramíneo” (“grassy”) e “beany”; o outro, pelos compostos não-voláteis, responsáveis pelo gosto amargo e pela adstringência (HSIEH et al., 1981).

Uma vez que a principal causa do desenvolvimento de sabor indesejável em produtos protéicos de soja é a ação de lipoxigenases sobre os ácidos linoléico e linolênico, várias tentativas para melhorar o sabor de produtos de soja têm se concentrado em torno de métodos para a inibição ou inativação dessa enzima. Porém, esses métodos apresentam desvantagens e limitações (LIU, 1997). A obtenção de cultivares sem as isoenzimas lipoxigenases tem sido a solução mais efetiva para reduzir o sabor indesejável associado a produtos protéicos de soja (KOBAYASHI et al., 1995; NISHIBA et al., 1995; FURUTA et al., 1996; TORRES-PENARANDA et al., 1998).

Quanto à qualidade do óleo de soja, a principal meta dos programas de melhoramento genético tem sido o aumento de sua estabilidade oxidativa, pela redução no teor de ácido linolênico e pelo aumento no teor de ácido oléico. Segundo Araújo (2004), os ácidos graxos insaturados são oxidados a velocidades diferentes. O ácido linoléico é oxidado 64 vezes mais rápido que o oléico e o linolênico, 100 vezes mais rápido do que este. Além disso, é bom ressaltar que, recentemente, consumidores têm requerido alimentos saudáveis; assim, a peroxidação de lipídeos em alimentos, que também leva a substâncias tóxicas e prejuízo nutricional, deve ser evitada (NISHIBA et al., 1995). Alguns estudos sugerem que os produtos da peroxidação de lipídeos podem estar envolvidos em várias doenças (HAUMANN, 1993).

Um dos objetivos do Programa de Melhoramento Genético de Soja em execução no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), da Universidade Federal de Viçosa, é a obtenção de novas variedades com sementes de melhor qualidade e sabor para alimentação humana. Como resultado desse programa, encontra-se disponível uma linhagem com ausência das isoenzimas lipoxigenases e baixo teor de ácido linolênico, que se apresenta como bastante promissora para a obtenção de produtos de soja de melhor aceitação para consumo humano. Espera-se que a associação dessas características em um único cultivar possibilite o desenvolvimento de produtos de melhor sabor e maior estabilidade e também a adaptação de processos para obtenção de produtos de melhor qualidade.

Este estudo teve como objetivo a avaliação da estabilidade oxidativa e de isoflavonas de grãos de soja sem lipoxigenases e com reduzido teor de ácido linolênico, armazenados por oito meses sob duas temperaturas, 25 e 35 °C. Para avaliar o efeito das isoenzimas lipoxigenases e do teor de ácido linolênico na estabilidade oxidativa de grãos, foram utilizados quatro genótipos de soja contrastantes quanto à presença ou ausência de lipoxigenases e ao teor de ácido linolênico normal ou reduzido, armazenados nas formas de grãos inteiros e quebrados. As determinações dos teores dos principais ácidos graxos componentes da fração lipídica, do teor de hexanal e do índice de TBA foram utilizadas na avaliação da qualidade dos grãos ao longo do armazenamento. As determinações dos teores das diferentes formas de isoflavonas, ao longo do tempo, foram utilizadas na avaliação da estabilidade desses compostos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Importância Econômica da Soja e Derivados

A soja é uma planta da família das leguminosas, sendo um dos mais antigos produtos cultivados pelo homem (VIOLA, 1999). Após seu surgimento na China, a soja permaneceu no Oriente por dois milênios. Só foi chegar ao Ocidente no século XV e começo do século XVI, onde, no entanto, permaneceu durante quatro séculos como uma simples curiosidade. Somente no século XX é que a soja se expandiu e cresceu de importância no Ocidente, constituindo-se, atualmente, na mais importante oleaginosa em produção no mundo sob cultivo extensivo (ANUÁRIO, [2001]), dominando o mercado mundial tanto de proteína vegetal quanto de óleo comestível (USDA, 2004).

No mundo foram produzidas cerca de 216,9 milhões de toneladas de soja no ano de 2004, o que representa 57% da produção anual de sementes oleaginosas. Os Estados Unidos, o Brasil, a Argentina, a China e a Índia são os seus maiores produtores, sendo o Brasil o segundo maior produtor, com uma produção estimada em 53 milhões de toneladas, o que corresponde a 24% da produção mundial desse grão (USDA, 2004). A soja é hoje a principal cultura agrícola do país, representando mais de 10% das suas exportações (NETO, 2004). O Brasil é o segundo maior exportador mundial de grãos, farelo e óleo de soja. O complexo soja, que reúne a cadeia produtiva de soja em grão, farelo e óleo, é um dos principais itens da balança comercial brasileira, com

exportações de 10,048 bilhões de dólares em 2004, colocando o país na liderança mundial nas exportações do setor em valor (ABIOVE, 2005).

A principal utilização da soja, tanto no Brasil quanto no resto do mundo, é como matéria-prima para a indústria de extração de óleo que produz óleo degomado e farelo, que por sua vez são matérias-primas de vários segmentos industriais. A fração óleo é usada, principalmente, pela indústria alimentícia na produção de óleos refinados, gorduras hidrogenadas, margarinas e maioneses, dentre outros. O farelo é usado na indústria de rações para alimentação animal. Somente pequena fração do resíduo desengordurado se destina à alimentação humana na produção de texturizados para embutidos, além de outros (MOREIRA et al., 2001). Segundo Barnes e Kim (1999), nos Estados Unidos 95% do resíduo desengordurado tem sido utilizado em rações para animais.

No Brasil, de toda a soja produzida, cerca de 38% é exportada em grãos (ABIOVE, 2005), sendo o volume restante industrializado no próprio país, alcançando o mercado externo na forma de farelo e óleo, principalmente. A maior parte do farelo produzido pelas indústrias esmagadoras no Brasil destina-se à exportação (cerca de 65%), sendo a maior parte do óleo bruto produzido destinada ao mercado interno (em torno de 75%) (MOREIRA et al., 2001). O valor das exportações de grãos de soja em 2004 foi de 5,395 bilhões de dólares; de farelo, 3,271 bilhões de dólares; e de óleo de soja, 1,382 bilhão de dólares (ABIOVE, 2005).

A produção mundial de soja vem aumentando anualmente (USDA, 2004). As taxas de expansão da produção no Brasil têm atingido índices anuais de até 24,6%, conforme ocorrido na safra 2002/03, em relação à safra anterior. Nesse ritmo, em cerca de três a quatro anos o Brasil será o líder mundial em produção de soja (NETO, 2004). Esse crescente aumento se deve, principalmente, à combinação de óleo, proteína e elevada produtividade da soja. Com isso, essa oleaginosa se torna mais competitiva em relação às outras, sendo a planta que mais produz proteína por hectare, além de produzir óleo.

2.2. Classificação, Comercialização e Armazenamento de Soja

As especificações para a padronização, classificação e comercialização da soja em grão são estabelecidas pela Portaria nº 262, de 23 de novembro de 1983, do Ministério da Agricultura, em vigor a partir de 1º de janeiro de 1984. A classificação que visa determinar a qualidade da soja em grão é feita conforme os seguintes limites máximos de tolerância: 14% de umidade, 30% de grãos quebrados, 1% de impurezas ou matérias estranhas, 8% de grãos avariados e 10% de grãos esverdeados (MAPA, 2005).

As indústrias de processamento e as empresas de recebimento de soja utilizam o padrão também denominado 14-1-8, ou seja, 14% de tolerância máxima para o teor de umidade, 1% para impurezas e matérias estranhas e 8% para grãos avariados. A carga de soja com valores acima dessa tolerância sofre descontos conforme a tabela da empresa recebedora. Esses descontos visam compensar os custos de remoção de umidade em excesso, da impureza e matérias estranhas e do manuseio de soja com grãos avariados. Por exemplo, a soja verde afeta a qualidade do óleo, e a quebrada aumenta o teor de ácidos graxos livres (LAZZARI, 1999).

As empresas que processam o grão de soja em farinhas e farelos utilizados na alimentação humana adotam padrões específicos de recebimento. A farinha integral e o farelo branco desengordurado são matérias-primas para embutidos, produtos de panificação, produção de chocolates, barras achocolatadas, bebidas fortificadas e outros usos. Sabor, odor e cor são características importantes para a indústria. Assim, a escolha de determinadas variedades de soja é feita procurando-se as melhores características para a finalidade específica (LAZZARI, 1999).

A composição e as qualidades física, sanitária e nutricional do grão de soja dependem de vários fatores: genética da semente, práticas culturais, condições climáticas durante o desenvolvimento, colheita, recebimento e, também, o armazenamento (LAZZARI, 2000).

Várias mudanças físicas, químicas e biológicas ocorrem em grãos durante o armazenamento, dependendo das condições dos grãos a serem armazenados e das condições e tempo de armazenamento (NARAYAN et al., 1988a). Quando essas mudanças físicas e químicas alcançam certo limite,

causam a deterioração do grão. A qualidade e a aceitação dos produtos obtidos a partir desses grãos são conseqüentemente afetadas (NARAYAN et al., 1988b).

Os grãos, no ambiente de estocagem, comportam-se como um ecossistema, no qual os elementos bióticos (grãos, insetos e microflora) e abióticos (impurezas, ar intergranular, vapor d'água e estrutura de armazenagem) são afetados, tanto química quanto biologicamente, por fatores ambientais como temperatura, umidade e composição do ar. Esses componentes são as variáveis do sistema e estão continuamente interagindo entre si. Os principais fatores externos que afetam o ecossistema da massa de grãos são a temperatura e a umidade relativa que prevalecem no local de estocagem. A ação combinada desses fatores no local de estocagem determina, em termos práticos, a atividade de todos os componentes bióticos do sistema, os quais conduzem a um armazenamento seguro ou perdas do produto. A composição do gás atmosférico é um fator ambiental adicional que afeta os componentes do ecossistema. Com exceção do armazenamento em estruturas herméticas, a composição do ar não se altera acentuadamente. Mudanças na composição gasosa atmosférica, entretanto, ocorrem no ar intergranular da massa de grãos, devido à atividade dos insetos e da microflora. No armazenamento sob atmosfera controlada, o ar ambiente pode ser excluído da massa de grãos, e uma composição artificial de gases pode ser introduzida e mantida no sistema (ATHIÉ et al., 1998).

2.3. Importância da Soja como Alimento

A soja possui uma composição química única, apresentando o maior teor de proteínas (cerca de 40%) entre os cereais e outras leguminosas. Contém ainda em torno de 20% de óleo, o segundo maior teor entre as leguminosas comestíveis (amendoim, 48%; e grão-de-bico, 5%). Outros componentes valiosos encontrados na soja são os fosfolipídeos, as vitaminas e os minerais. Em média, óleo e proteína juntos constituem cerca de 60% do grão, em base seca. A matéria seca restante é composta principalmente de carboidratos (cerca de 35%) e cinzas (cerca de 5%). A composição química da

soja, entretanto, depende de muitos fatores, incluindo variedade, época de cultivo, localização geográfica e condições ambientais (LIU, 1997).

Além de estarem presentes em quantidades elevadas, o óleo e a proteína de soja apresentam alto valor nutricional. O óleo de soja contém alta proporção de ácidos graxos insaturados, como o linoléico e linolênico, sendo, então, um óleo saudável. A proteína de soja contém todos os aminoácidos essenciais, sendo a maioria deles presente em quantidades equiparadas às requeridas por humanos e animais. Possui um escore de aminoácido corrigido pela digestibilidade da proteína (PDCAAS) muito próximo de 1, a mais alta pontuação possível e a mesma obtida para proteínas de origem animal, como a albumina do ovo e a caseína (LIU, 2000).

Nas últimas décadas, pesquisadores têm salientado os benefícios de produtos de soja para a saúde. A soja é importante não somente pelo seu valor nutritivo, mas também por apresentar vários constituintes biologicamente ativos, que atuam na prevenção de doenças cardiovasculares, câncer, osteoporose e na redução de colesterol, além de amenizar os sintomas da menopausa (PUMAR, 2000).

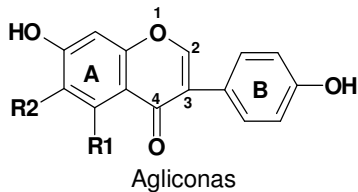
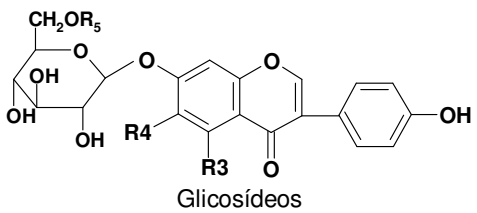
Nos anos de 1990, a determinação de fitoquímicos, substâncias não-nutritivas, mas que apresentam atividade biológica capaz de prevenir doenças e manter a saúde, é comparável à descoberta das vitaminas no início do século XX. Muitos dos fitoquímicos encontrados em diferentes plantas constituem os princípios ativos de fitoterápicos e de medicamentos alopáticos, além de estarem presentes em muitos alimentos. A soja é a planta que apresenta o maior número de fitoquímicos, sendo alguns desses também encontrados nos teores mais elevados já observados (CARRÃO-PANIZZI, 2001).

Entre os fitoquímicos importantes encontrados em soja estão a lecitina, os oligossacarídeos, as isoflavonas, os tocoferóis, os fitosteróis, os fitatos, os inibidores de tripsina (LIU, 2000), as saponinas, os ácidos fenólicos (BARNES e KIM, 1999) e os ácidos graxos ômega-3, os quais a colocam como primordial ingrediente para o processamento de alimentos funcionais, ou seja, aqueles que atuam na fisiologia do organismo, protegendo e estimulando a saúde (CARRÃO-PANIZZI, 2001). Em geral, a maior parte dessas substâncias está associada aos subprodutos do processamento da soja. Alguns industriais têm se empenhado em recuperar algumas delas e torná-las comercialmente

disponíveis como ingredientes para alimentos funcionais ou suplemento dietético. Elas representam um novo tipo de uso da soja como alimento (LIU, 2000).

Em produtos à base de soja, 12 formas de isoflavonas foram identificadas (Figura 1), três agliconas (genisteína, daidzeína e gliciteína) e nove glicosídeos (genistina, daidzina, glicitina e suas formas acetiladas e maloniladas: 6"-O-acetilgenistina, 6"-O-acetildaidzina, 6"-O-acetilglicitina, 6"-O-malonilgenistina, 6"-O-malonildaidzina, 6"-O-malonilglicitina) (WANG e MURPHY, 1994; SONG et al., 1998).

A característica estrutural básica dos flavonóides é o núcleo flavona (Figura 1), o qual se constitui de dois anéis benzênicos (A e B) ligados através do anel heterocíclico pirano. A posição do grupo fenil B no anel heterocíclico constitui a distinção entre as classes flavonóides e isoflavonóides, sendo que na primeira o grupo fenil B se localiza na posição 2 e na segunda, na posição 3 (HARBORNE, 1994; WANG e MURPHY, 1994).

 <p>Agliconas</p>	R1	R2	Composto	
		OH	H	Genisteína
	H	H	Daidzeína	
	H	OCH3	Gliciteína	
 <p>Glicosídeos</p>	R3	R4	R5	Composto
		OH	H	H
	H	H	H	Daidzina
	H	OCH3	H	Glicitina
	OH	H	COCH3	6"-O-acetilgenistina
	H	H	COCH3	6"-O-acetildaidzina
	H	OCH3	COCH3	6"-O-acetilglicitina
	OH	H	COCH2COOH	6"-O-malonilgenistina
	H	H	COCH2COOH	6"-O-malonildaidzina
	H	OCH3	COCH2COOH	6"-O-malonilglicitina

Fonte: Wang e Murphy (1994)

Figura 1 - Estruturas químicas das isoflavonas encontradas em grãos e produtos de soja.

Dados experimentais e clínicos têm apontado que as isoflavonas representam alternativa promissora na prevenção e, ou, tratamento de diversas doenças crônicas, incluindo câncer, sintomas da menopausa, osteoporose e doenças cardiovasculares (SETCHELL, 1998; MESSINA, 2000).

Em 1999, o Food and Drug Administration (FDA) aprovou e autorizou a impressão de uma declaração de saúde (“health claim”) nos rótulos de alimentos industrializados que contenham soja, sugerindo: “dietas com baixo conteúdo de colesterol e gorduras saturadas e que incluam 25 gramas de proteínas de soja, podem reduzir os riscos de doenças cardiovasculares”. As proteínas e as isoflavonas da soja agem sinergisticamente na redução do colesterol plasmático (particularmente o LDL e o VLDL), aumentam a relação HDL:LDL, reduzem o tamanho das placas ateroscleróticas, aumentam a elasticidade das artérias (coronárias) e reduzem a pressão arterial, evitando as doenças cardiovasculares como o infarto do miocárdio, a aterosclerose e as trombooses (CARRÃO-PANIZZI, 2001).

2.4. Compostos Relacionados com o Sabor e Odor Característicos de Soja e Produtos Derivados

Há dois grupos principais de sabores objetáveis nos produtos protéicos de soja. Um deles é composto pelos voláteis, responsáveis pelos odores gramíneo (“grassy”) e “beany”; o outro, pelos compostos não-voláteis, responsáveis pelo gosto amargo e pela adstringência (HSIEH et al., 1981).

A característica sensorial “beany” é um fator que restringe a utilização de produtos de soja por muitos consumidores em culturas ocidentais. Diversos compostos voláteis têm sido apontados por contribuir potencialmente para o sabor “beany”. Esses compreendem vários álcoois, aldeídos, cetonas, pirazinas e furanos (VARA-UBOL et al., 2004).

Tornou-se evidente, pelas pesquisas desenvolvidas por Wilkens et al. (1967), Mustakas et al. (1969), Kon et al. (1970) e Nelson et al. (1976), que as isoenzimas lipoxigenases são responsáveis, ainda que parcialmente, pelo desenvolvimento do sabor característico dos produtos protéicos de soja.

Nesses estudos, alcançou-se melhoria no sabor pela inativação dessas isoenzimas.

Wilkens et al. (1967) produziram um extrato hidrossolúvel de soja de sabor suave pela trituração, em água quente, de grãos descascados. Mustakas et al. (1969) mostraram que grãos tratados pelo calor antes da moagem resultava em farinha integral de soja de bom sabor, mesmo após dois anos de armazenamento. Já Kon et al. (1970) obtiveram a inibição da lipoxigenase pela moagem sob condições ácidas e a produção de um extrato hidrossolúvel de sabor suave, enquanto Nelson et al. (1976) observaram que, para a eliminação efetiva do sabor “beany”, o extrato de soja pode ser produzido por branqueamento dos grãos já macerados, antes da trituração.

Inúmeros trabalhos de pesquisa relacionados por Cowan et al. (1973), Maga (1973), Eskin et al. (1977) e Rackis et al. (1979) buscaram identificar os diversos compostos presentes nos derivados protéicos de soja, na tentativa de relacioná-los a atributos sensoriais característicos desses produtos.

O sabor “beany” é normalmente citado como sendo proveniente, principalmente, da degradação oxidativa de ácidos graxos pela ação das isoenzimas lipoxigenases (WOLF, 1975). O primeiro estudo realizado na tentativa de identificar os componentes responsáveis pelo gosto amargo e sabor “beany” parece ter sido realizado por Teeter et al. (1955), utilizando farinhas de soja.

Mattick e Hand (1969) isolaram e identificaram a etil vinil cetona como componente volátil que contribui para o odor e sabor de “feijão cru”, em destilado obtido de grãos de soja triturados em água destilada.

Wilkens e Lin (1970), isolando a fração volátil do extrato de soja (obtido após a hidratação dos grãos por duas horas a 40 °C e a trituração a 25 °C), verificaram ser ela extremamente complexa. Em resultados de cromatografia a gás, esses autores detectaram 80 picos, sendo 41 compostos identificados, possuindo a maior parte destes odor indesejável. Identificaram, dentre eles, hexanal, hexanol, 2-hexenal, 1-octen-3-ol, etil vinil cetona e 2-pentil furano, correspondendo o hexanal a 25% da amostra volátil. Concluíram, então, que o sabor “green-beany”, típico em produtos de soja, pode, provavelmente, ser atribuído a uma mistura de muitos compostos. Já Takahashi et al. (1979) relataram que aldeídos como hexanal e pentanal parecem ser os principais

responsáveis pelo sabor “green-beany” de produtos de soja. Esses autores observaram grande redução no odor “beany” após incubarem o extrato de soja com aldeído oxidase, sob condições aeróbicas.

Em estudo conduzido por Hsieh et al. (1981), os constituintes voláteis de farinha desengordurada de soja foram isolados e, em seguida, fracionados por cromatografia gasosa. As frações com odores “beany”, gramíneo (“grassy”) e de feijão verde (“green”) característicos foram identificadas, sendo nove álcoois, seis aldeídos, nove cetonas e 2-pentil furano. Etil vinil cetona e 2-pentil furano foram apontados como compostos-chave responsáveis por esses odores em farinha de soja; outros compostos principais foram: hexanal, hexanol, pentanol e 1-octen-3-ol.

De acordo com Hashim e Chaveron (1995), o hexanal tem forte odor gramíneo e quando seu conteúdo foi superior a 25 ppb, em extrato de soja, sua presença pôde ser detectada por todos os provadores. Embora o hexanol possua acentuado odor gramíneo e oxidado (“painty”), seu limiar (threshold) é muito maior que o de hexanal.

Wang et al. (1998) mostraram que o extrato hidrossolúvel de soja com pronunciado sabor “beany” continha uma concentração de hexanal e hexanol muito maior que o extrato de sabor suave. O conteúdo total desses dois componentes no extrato foi linearmente correlacionado com a atividade de lipoxigenase nos grãos de soja.

O objetivo do trabalho conduzido por Boatright e Lei (1999) foi determinar os principais odores e os compostos correspondentes que contribuem para o odor “beany” de uma solução aquosa de isolado protéico de soja. Os principais compostos foram: dimetil trissulfeto; trans,trans-2,4-decadienal; 2-pentil piridina; trans,trans-2,4-nonadienal; hexanal; acetofenona e 1-octen-3-ona. Boatright e Lei (2000) e Lei e Boatright (2001) revelaram a presença de outro composto contendo enxofre, o metanotiol no “headspace” de soluções de isolado e de concentrado protéico de soja. A presença de metanotiol e dimetil trissulfeto em extrato de soja e sua contribuição para o odor desse produto foram relatadas por Boatright (2002). Ang e Boatright (2003) quantificaram a concentração de hexanal, metanotiol, 2-pentil furano e dimetil trissulfeto no “headspace” de uma solução de isolado protéico de soja. Uma tentativa de simulação do odor característico do isolado protéico foi

realizada combinando esses quatro compostos para recriar a concentração encontrada no “headspace” da solução de isolado protéico de soja. As características sensoriais dos compostos combinados foram comparadas com as de cada composto individualmente. A mistura de compostos apresentou maior semelhança com o odor característico do isolado protéico de soja que qualquer composto individual.

Alguns compostos químicos que têm sido citados como “beany” por alguns autores não o são por outros. É provável também que alguns desses compostos possam ter uma característica “beany” apenas em uma faixa específica de concentração (VARA-UBOL et al., 2004).

Na maioria das pesquisas, os odores são descritos por indivíduos ao cheirar o efluente de um cromatógrafo a gás, e em nenhuma dessas parece utilizar provadores treinados em análise sensorial descritiva, para descrever o odor característico de compostos químicos potencialmente “beany”. O termo sensorial “beany” tem sido usado extensivamente, porém ele foi definido insuficientemente. “Beany” parece não ser um atributo único, mas sim abranger vários atributos sensoriais que devem ser identificados e descritos claramente para unificar o conceito “beany” entre os pesquisadores (VARA-UBOL et al., 2004).

O estudo conduzido por Vara-Ubol et al. (2004) teve como objetivos: identificar e definir atributos sensoriais que conferem características “beany” e examinar compostos químicos que têm sido associados ou descritos na literatura como “beany” ou presentes no “headspace” de feijões ou outra leguminosa, definindo o odor característico desses em vários níveis de intensidade, usando termos bem definidos, estabelecidos por um painel sensorial altamente treinado. O painel foi composto por cinco provadores descritivos com vasta experiência em descrição de odor. Os provadores avaliaram várias amostras de feijão, soja, extrato de soja e tofu, apresentados em diferentes formas, para definir o termo “beany”. Os compostos químicos avaliados foram: 3-metil-1-butanol; pentanol; hexanol; 1-octen-3-ol; propanal; pentanal; hexanal; octanal; trans,trans-2,4-heptadienal; trans-2-hexenal; trans-2-octenal; trans-2-nonenal; trans,trans-2,4-nonadienal; trans,trans-2,4-decadienal; acetofenona; 2-heptanona; 1-octen-3-ona; 3-isopropil-2-metoxi pirazina; e 2-pentil furano. À exceção de octanal e 2-pentil furano, todos os

compostos foram dissolvidos em propileno glicol e diluídos em sete diferentes concentrações (100.000, 10.000, 5.000, 1.000, 100, 10 e 1 ppm) a partir de uma solução-estoque de 100.000 ppm. Os provadores determinaram que uma combinação de vários atributos sensoriais compõe a característica “beany”. Hexanol, hexanal e 2-pentil furano, os quais têm sido mais freqüentemente citados na literatura como parte de uma mistura de compostos responsáveis pelo sabor e odor “beany”, ficaram entre os compostos químicos que o painel sensorial não percebeu como “beany” em nenhum nível, quando cheirados isoladamente. Em certos níveis, esses compostos apresentaram algum atributo componente da característica, mas não forneceram um odor “beany” global. Segundo esses autores, é possível que os compostos que têm alguma característica relacionada a “beany”, mas não o caráter “beany” global, possam tê-lo quando combinados com outros compostos. Porém, combinações não foram estudadas nesta pesquisa. Os compostos que apresentaram característica “beany” em alguma concentração foram: 3-metil-1-butanol; pentanol; 1-octen-3-ol; 2,4-heptadienal; acetofenona; 1-octen-3-ona; e 3-isopropil-2-metoxi pirazina.

Torres-Penaranda et al. (1998) utilizaram, para avaliar extrato hidrossolúvel de soja e tofu, três painéis sensoriais, de países diferentes (Estados Unidos, Japão e China), igualmente treinados, objetivando indicar diferenças na percepção sensorial entre as culturas. Eles constataram que os provadores tinham dificuldade em descrever o caráter específico associado com o sabor “beany” em soja e que o uso desse termo pode ser inapropriado, uma vez que é complexo e tem significado diferente para pessoas de diferentes culturas.

Em um estudo seguinte, Torres-Penaranda e Reitmeier (2001) descreveram o conceito “beaniness” como um complexo de diferentes atributos, abrangendo descritores como soja, verde (não maduro), grama, vegetais frescos, feijão cru, pungente e desagradável. O padrão para “beany” (também chamado “cru como hexanal”) foi de 50 ppm de hexanal em óleo de açafrão.

Um vocabulário descritivo foi desenvolvido por Day N’Kouka et al. (2004) para descrever totalmente as características sensoriais de extrato hidrossolúvel de soja. Vários dos termos utilizados já haviam sido usados em

pesquisas anteriores para descrever produtos de soja, porém o termo “beany”, usado com frequência para descrever soja, não foi usado porque seu significado é ambíguo. Segundo esses autores, os provadores concordaram que os termos verde (“green”), ou soja crua (“raw soy”), foram representativos da característica denominada “beany”.

Quanto ao gosto amargo, de acordo com Goossens (1974), ele é formado por deterioração oxidativa de aminoácidos e por hidrólise enzimática. Os resultados de Sessa et al. (1974) indicaram que a oxidação não-enzimática de ácidos graxos insaturados ligados à fosfatidilcolina faz com que desenvolva gosto amargo. Entretanto, Fujimaki et al. (1965) e Sessa et al. (1979), citados por Kitamura (1984), atribuíram como principais constituintes responsáveis tanto pelo sabor “grassy-beany” quanto pelo gosto amargo os álcoois e aldeídos, produtos secundários resultantes também da ação das lipoxigenases. Rackis et al. (1972) demonstraram a existência de correlação entre o aumento superior a três vezes no gosto amargo e o aumento na atividade da lipoxigenase, em grãos de soja durante a maturação.

Huang et al. (1981) e Okubo et al. (1983), mencionados por Kitamura et al. (1991), consideraram ser a adstringência e o gosto amargo causados por isoflavonas e saponinas. Ainda, segundo Okubo et al. (1983), como a maior parte das saponinas está presente no hipocótilo das sementes, a adstringência a elas atribuída pode ser reduzida por remoção mecânica do hipocótilo.

Kalbrener et al. (1974), utilizando lipoxigenase de soja, prepararam hidroperóxidos de ácidos linoléico e linolênico. Após a purificação por cromatografia com ácido silícico, sabores associados com esses hidroperóxidos, ou seus produtos de decomposição, foram caracterizados por um painel sensorial treinado. Embora as respostas para hidroperóxidos não tenham sido as mesmas que para a dispersão de 0,25% de farinha de soja produzida sem tratamento térmico, utilizada como controle, elas foram similares para as principais categorias, ou seja, sabor “gramíneo”/“beany”, gosto amargo e adstringência.

Na literatura, normalmente a adstringência não aparece associada a produtos de degradação lipídica; em produtos de soja, é geralmente atribuída a substâncias polifenólicas interagindo com mucoproteínas na boca e garganta (CHIEN e SNYDER, 1983).

Apesar do efeito benéfico das isoflavonas para a saúde humana, a daidzeína e a genisteína são citadas na literatura como responsáveis pelo gosto amargo e pela adstringência em derivados de soja, tendo suas concentrações aumentadas durante a imersão dos grãos em água (MATSUURA et al., 1989; ARAÚJO et al., 1997). Segundo Carrão-Panizzi et al. (1999), a adstringência é causada pelas formas agliconas de isoflavonas, presentes em quantidades relativamente baixas na semente de soja. Pela ação da enzima β -glicosidase, os glicosídeos daidzina e genistina são hidrolisados, formando as agliconas daidzeína e genisteína, que têm sido relacionadas com o aumento do gosto amargo e da adstringência da soja, que limita o seu consumo em países ocidentais.

Matsuura et al. (1989) demonstraram que aumento em daidzeína e genisteína pela ação de β -glicosidase em soja durante o processo de preparo do extrato hidrossolúvel resultou em incremento no sabor residual indesejável. Araújo et al. (1997) também demonstraram que a β -glicosidase é responsável pela liberação de daidzeína e genisteína em grãos de soja imersos em água.

Em uma revisão de literatura sobre gosto amargo, Drewnowski e Gomez-Carneros (2000) citaram trabalhos em que genisteína e daidzeína são apontadas como compostos que conferem gosto amargo e adstringência e genistina e daidzina, adstringência.

Segundo Kudou et al. (1991), todas as isoflavonas produzem efeito indesejável no sabor, como gosto amargo, adstringência e sensação de boca seca. Os valores de limiar de detecção das diferentes formas de isoflavonas, obtidos por esses autores, são apresentados na Tabela 1.

As plantas produzem uma variedade de compostos de baixa massa molecular, denominados metabólitos secundários, que desempenham diversas funções na planta, principalmente na defesa contra patógenos e predadores (GENOVESE e LAJOLO, 2001). As isoflavonas são metabólitos secundários de distribuição limitada no reino vegetal, estando quase que restritas à subfamília Papilionoideae das Leguminosae, na qual a semente de soja se destaca como a maior fonte (DEWICK, 1994). Assim, a soja é uma fonte rica e quase que única de isoflavonas na dieta humana. O teor de isoflavonas em grãos de soja

de diferentes genótipos apresenta uma variação de aproximadamente 1 a 4 mg.g⁻¹ (MESSINA, 2000).

Tabela 1 - Valores de limiar de detecção das isoflavonas de soja

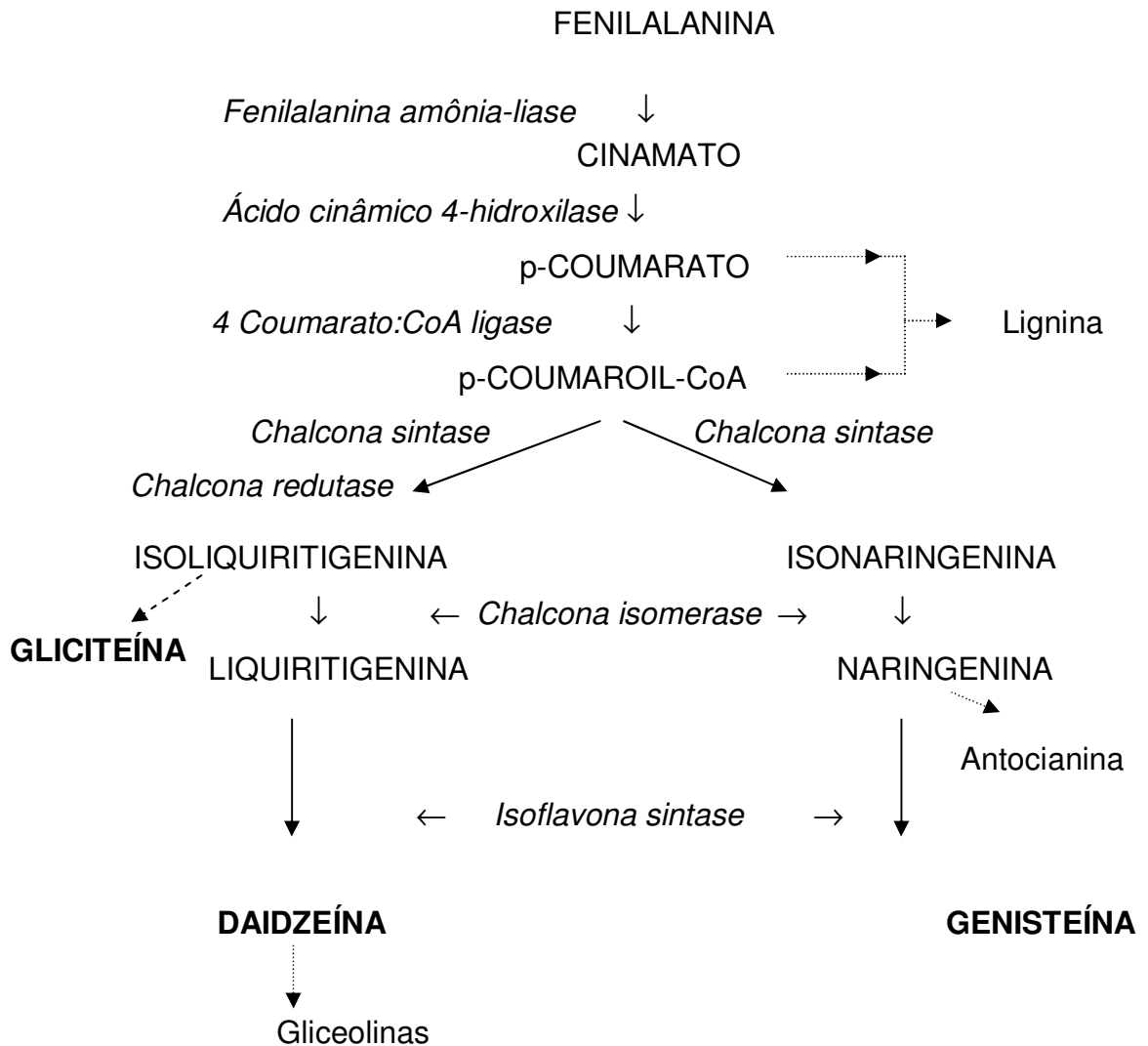
Isoflavona	Valor de Limiar (mM)					
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
Daidzeína			X			
Daidzina		X				
6''-O-Acetildaidzina			X			
6''-O-Malonildaidzina				X		
Gliciteína				X		
Glicitina			X			
6''-O-Acetilglicitina					X	
6''-O-Malonilglicitina					X	
Genisteína		X				
Genistina	X					
6''-O-Acetilgenistina		X				
6''-O-Malonilgenistina		X				

Fonte: Kudou et al. (1991)

Em soja, as isoflavonas são constitutivamente expressas em alguns tecidos, como sementes e raízes, enquanto em outros tecidos como hipocótilo e folhas elas podem estar presentes constitutivamente, mas são adicionalmente induzidas em resposta a determinado tratamento ou ataque de patógenos (GRAHAM e GRAHAM, 1991).

As isoflavonas exibem ampla atividade biológica nas plantas, desempenhando papel importante nas interações planta–microrganismo e planta–inseto (DÉNARIÉ et al., 1996). Em soja, as isoflavonas tanto atraem a bactéria *Rhizobium* quanto induzem a expressão do gene para iniciar a formação do nódulo na raiz para fixação de nitrogênio (PUEPPKE, 1996). Tem sido demonstrado que esses compostos desempenham papel importante em mecanismos de defesa, na resposta ao ataque de patógenos (DIXON e STEELE, 1999) e de insetos (LIU et al., 1992). Sabe-se também que várias isoflavonas possuem atividade antifúngica (RIVERA-VARGAS et al., 1993) e

que são precursoras de fitoalexinas (gliceolinas em soja – Figura 2) em várias espécies vegetais (YU et al., 2000) atuando no mecanismo de defesa.



Fonte: Yu et al. (2003)

Figura 2 - Diagrama simplificado da via dos fenilpropanóides mostrando intermediários e enzimas envolvidas na síntese das isoflavonas daidzeína, genisteína e gliciteína. As setas pontilhadas representam múltiplos passos enzimáticos, e a seta tracejada indica passos especulativos.

Está bem estabelecida a existência de trocas de sinais entre rizóbio e leguminosas (DÉNARIÉ et al., 1996). As isoflavonas são importantes na

relação simbiótica de leguminosas com bactérias dos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* e *Sinorhizobium*, genericamente denominados rizóbio, na formação de nódulos na raiz capaz de converter o nitrogênio atmosférico em amônia, que será usada pelas plantas para o seu crescimento e desenvolvimento. A planta secreta isoflavonas na rizosfera, e esses metabólitos são percebidos pela bactéria. As isoflavonas interagem como uma proteína regulatória do rizóbio, Nod D, que ativa a transcrição de vários genes *nod* no rizóbio. O resultado é a produção de lipoquitooligossacarídeos, chamados de fatores *nod*, que em baixas concentrações induzem a formação de nódulos (PUEPPKE, 1996; XIAN-ZHI e DIXON, 2000; BRENDNAREK et al., 2001).

Heterodera glycines Ichinohe, o nematóide de cisto é uma das pragas mais destrutivas em plantações de soja. Esse nematóide existe no solo e infecta as raízes de plantas de soja suscetíveis, impedindo a fixação simbiótica do nitrogênio, suprimindo a nodulação e reduzindo a eficiência de fixação do nitrogênio. Como resultado, plantas de soja infectadas são normalmente atrofiadas e destituídas de clorofila. As fitoalexinas, chamadas gliceolinas, são freqüentemente sintetizadas e acumuladas nas raízes de plantas de soja, em resposta à inoculação do nematóide de cisto (HUANG e BARKER, 1991).

2.5. Melhoramento Genético da Qualidade da Soja

Alguns fatores relacionados à composição do grão, e estranhamente compostos citados como tendo efeito benéfico, limitam a utilização da soja. Assim, alterações genéticas podem torná-la ainda mais adequada à utilização industrial, bem como para consumo direto.

Dentre os problemas associados à soja estão o sabor e odor “beany”, a instabilidade oxidativa e a presença de fatores antinutricionais, como os inibidores de proteases e os oligossacarídeos rafinose e estaquiose.

Há uma tendência, dos novos programas de melhoramento de soja, para o desenvolvimento de grãos com uma composição tal que maximize os benefícios à saúde, de humanos e animais, dos alimentos e rações preparados

com ingredientes de soja. Isso pode levar a um maior valor do produto final, como também a novas formas de utilização da soja.

Em 1986, teve início um programa de Melhoramento de Soja na UFV, tendo como um dos objetivos a obtenção de novas variedades com sementes de melhor qualidade para alimentação humana. Constitui meta desse programa desenvolver um germoplasma de soja adaptado, com sementes contendo genes que determinam: ausência das isoenzimas lipoxigenases; altos teores de proteína; teores reduzidos de ácido linolênico e altos teores de ácido oléico; ausência do inibidor de tripsina Kunitz; teores reduzidos dos açúcares rafinose e estaquiose; teores reduzidos de lectinas; altos teores de isoflavonas; e cotilédones e hilo claros. Fatores relacionados à produtividade e adaptação dos cultivares à faixa mais ampla de condições ambientais, bem como resistência às enfermidades, também são enfocados.

2.5.1. Melhoramento pela Redução do Sabor *Beany*

Existem duas causas principais e relacionadas para o desenvolvimento de sabores e odores indesejáveis em produtos de soja. Uma é a alta proporção de ácidos graxos insaturados na fração óleo do grão e a outra, a abundante presença de lipoxigenases (WOLF, 1975). Essa enzima constitui cerca de 1% do total de proteínas do grão (AXELROD, 1974).

As isoenzimas lipoxigenases (linoleato: oxigênio oxidoreductase, EC 1.13.11.12) são dioxigenases que catalisam a hidroxidação inicial de compostos que apresentam, em sua estrutura, o grupo cis,cis-1,4-pentadieno e, indiscutivelmente, contribuem para a instabilidade de ácidos graxos poliinsaturados do grão de soja (AXELROD et al., 1981; MACK et al., 1987). Dentre os ácidos graxos presentes no óleo de soja, o linoléico e o linolênico apresentam tal estrutura, correspondendo, em valores médios, a 50 e 9% da fração lipídica, respectivamente.

Em cotilédones de soja foram isoladas quatro isoenzimas lipoxigenases (LOX), denominadas lipoxigenase 1 (LOX1), lipoxigenase 2 (LOX2), lipoxigenase 3a (LOX3a) e lipoxigenase 3b (LOX3b). Entretanto, as isoenzimas LOX3a e LOX3b são tão similares em suas propriedades que não podem ser distinguidas, exceto pelo comportamento de eluição em hidroxiapatita ou CM-

Sephadex (AXELROD, 1974), e podem, para fins analíticos, ser consideradas idênticas (AXELROD et al., 1981). Em mutantes de ocorrência natural, com ausência de atividade de LOX3 (KITAMURA et al., 1983; KITAMURA, 1984), tanto LOX3a quanto LOX3b estão ausentes. Por essa razão, parece que qualquer diferença entre LOX3a e LOX3b resulta de modificação pós-tradução, não refletindo suas origens de *loci* genéticos distintos. E isso tem levado a maioria dos pesquisadores a associar com cotilédones de soja apenas três isoenzimas: LOX1, LOX2 e LOX3 (HILDEDRAND et al., 1988, citado por SIEDOW, 1991).

Os produtos primários da ação catalítica dessas enzimas são 9 e 13-hidroperóxidos, que, decompostos enzimaticamente ou não, formam uma gama de compostos, como aldeídos, cetonas e álcoois, muitos dos quais perceptíveis em concentrações extremamente baixas (ESKIN et al., 1977) e capazes de interagir com macrocomponentes do grão (TAKAHASHI et al., 1980). Dentre esses compostos, os aldeídos são os mais sensíveis à percepção sensorial em alimentos (STIER, 1978, citado por CABRAL, 1979). A ação das LOX é quase instantânea e, uma vez desenvolvido o sabor indesejável, é praticamente impossível eliminá-lo ou mascará-lo (NELSON et al., 1971).

Quando o tecido celular de cotilédones de soja é rompido ou danificado de qualquer forma, na presença de até mesmo pequeno teor de umidade, ocorre o desenvolvimento de um sabor “painty” (oxidado), ou “beany”, altamente indesejável (NELSON et al., 1971). Durante a colheita, o transporte, o armazenamento e o processamento da soja, qualquer dano físico permite contato direto entre a enzima e o substrato. Alto conteúdo de umidade e alta temperatura promovem essa interação. Embora o tratamento térmico e outros meios químicos e físicos tenham sido efetivos para inativar as LOX em soja e controlar o desenvolvimento do sabor “beany”, a maioria deles tem alguma desvantagem. Por exemplo, tratamento térmico suficiente para inativar as LOX freqüentemente resulta em alguma insolubilização da proteína e perda de funcionalidade e, além disso, podem gerar um desagradável odor “cozido” ou “tostado” (LIU, 1997).

Na maioria dos casos, os fatores externos que favorecem a hidroperoxidação enzimática de ácidos graxos insaturados não podem ser facilmente controlados (LIU, 1997). Assim, sendo o problema do sabor “beany”

resultante, em grande parte, da atividade das isoenzimas lipoxigenases (RACKIS et al., 1979), a obtenção de cultivares com ausência dessas isoenzimas tem sido a solução mais efetiva para reduzir o sabor indesejável associado a produtos protéicos de soja (KOBAYASHI et al., 1995; NISHIBA et al., 1995; FURUTA et al., 1996; TORRES-PENARANDA et al., 1998). Segundo Liu (1997), a obtenção de linhagens com baixo teor de ácido linolênico tem sido efetiva para melhorar a estabilidade oxidativa e o sabor do óleo de soja, entretanto seu efeito no controle do sabor “beany” do farelo de soja parece ser muito menos significativa.

Kobayashi et al. (1995) analisaram os compostos voláteis extraídos, por destilação e extração simultâneas, de extratos hidrossolúveis obtidos de grãos de soja de variedades normal e com ausência de lipoxigenases, utilizando cromatografia a gás/olfatometria e cromatografia a gás acoplada a um espectrômetro de massas. Os principais constituintes voláteis do extrato de soja normal foram hexanal, 1-penten-3-ol, trans-2-hexenal, 2-pentil furano, 1-pentanol, cis-2-pentenol, trans-2-heptenal, hexanol, nonanal, 1-octen-3-ol e trans,trans-2,4-decadienal, todos referidos como sendo produtos da degradação de ácidos graxos poliinsaturados. Pelos cromatogramas obtidos, foi possível observar que quase todos os picos referentes aos compostos voláteis oriundos dos extratos hidrossolúveis produzidos de linhagens com ausências de LOX2 e LOX3, ou com ausência das três isoenzimas, foram nitidamente menores que aqueles obtidos da variedade normal. Os referidos autores concluíram que os principais compostos identificados, que contribuem para o odor “beany”, são: trans,trans-2,4-nonadienal, trans,trans-2,4-decadienal, hexanal, 2-pentil furano, 1-octen-3-ona, trans-2-nonenal e trans,cis-2,4-nonadienal.

Wilson (1996) resumiu estudos comparando o desempenho de soja contendo LOX e soja isenta de LOX para o preparo de alimentos como extrato hidrossolúvel e tofu. Ele concluiu que as linhagens sem LOX têm as propriedades funcionais da soja normal, porém com menos sabor “beany”. E, assim, segundo esse autor, os produtos tradicionais de soja feitos de linhagens isentas de LOX podem se tornar mais aceitáveis nas dietas ocidentais. Além disso, pode ser possível substituir concentrados e isolados protéicos de soja, mais caros, por farinha de soja isenta de LOX como ingrediente para alimentos.

Também segundo Wilson (1996), os produtos obtidos de soja sem LOX, por possuírem o sabor mais suave, podem apresentar a adstringência mais pronunciada. Porém, Torres-Penaranda et al. (1998) obtiveram extratos hidrossolúveis de grãos de soja sem LOX com menos adstringência que os obtidos da linhagem com presença de LOX. Eles relataram que menos adstringência era esperada, uma vez que as LOX podem contribuir para a adstringência.

Os pesquisadores envolvidos no Programa de Melhoramento da Qualidade da Soja do BIOAGRO/UFV, inicialmente, concentraram esforços no sentido de transferir os genes que determinam a ausência de lipoxigenases (alelos nulos), pelo método dos retrocruzamentos assistidos por microanálises bioquímicas não destrutivas, para variedades-elite plantadas nas regiões do Brasil central. Várias linhagens totalmente isentas de LOX foram obtidas como resultado do programa de retrocruzamento. Salienta-se que essas linhagens foram também selecionadas com base na sua similaridade genética com os respectivos progenitores recorrentes, por meio de análises com marcadores moleculares. Essas linhagens têm sido avaliadas em testes de produtividade nas regiões mineiras de Viçosa, Florestal, São Gotardo e Capinópolis (MOREIRA et al., 2001).

O papel fisiológico das isoenzimas lipoxigenases em tecidos vegetais ainda é pouco definido, e muitas tentativas vêm sendo feitas no sentido de alcançar esse objetivo. Múltiplas formas de LOX foram identificadas em muitas espécies de plantas. Mack et al. (1987), Hildebrand (1989), Siedow (1991) e Rosahl (1996), avaliando as possíveis funções das LOX vegetais, descreveram o envolvimento dessas enzimas em quatro áreas principais da fisiologia da planta: crescimento e desenvolvimento; senescência; resposta a ferimentos e proteção contra danos causados por insetos e patógenos; e biossíntese das moléculas regulatórias. Staswick (1990, 1994) sugeriu que algumas LOX de soja atuam no armazenamento temporário de nitrogênio durante o crescimento vegetativo, fazendo parte das proteínas de reserva vegetativa de soja. Estudos recentes propõem um papel para LOX no metabolismo da planta, especificamente na mobilização de reservas de carbono durante a germinação de sementes de algumas espécies de plantas, como pepino, utilizando como substratos triacilgliceróis (FULLER et al., 2001).

Considerando-se a presença de múltiplas isoenzimas de LOX em plantas, é possível que as isoenzimas individualmente desenvolvam funções fisiológicas distintas nas plantas (SARAVITZ e SIEDOW, 1995). Em soja, os genes que codificam as LOX estão organizados em uma grande família multigênica contendo, pelo menos, oito membros. Destes, três são expressos na semente durante o seu enchimento; em tecidos vegetativos de soja são expressos cinco genes de LOX. A expressão diferencial desses genes poderia explicar as diversas funções atribuídas a essa classe de enzimas (BUNKER et al., 1995; STEPHENSON et al., 1998). Fuller et al. (2001) relataram que, dentre as oito formas de isoenzimas LOX de soja já clonadas, cinco são de tecidos vegetativos (VLXs), e os produtos dos genes são denominados VLXA, VLXB, VLXC, VLXD e VLXE.

Taketa (2000) avaliou diversas características agronômicas, como altura da planta e da primeira vagem, nível de acamamento, *stand* final, qualidade visual da semente e produção de grãos, em 16 linhagens de soja com ausência de LOX desenvolvidas pelo Programa de Melhoramento da UFV, em conjunto com o BIOAGRO/UFV. Observou que a ausência das três isoenzimas lipoxigenases nas sementes não afetou, de forma significativa, as características agronômicas avaliadas, mostrando-se promissoras para o cultivo comercial, pelo fato de apresentarem desempenho produtivo semelhante ao das variedades comerciais utilizadas como padrão.

Martins et al. (2002a), visando elucidar a influência da eliminação genética de LOX nas características agronômicas da planta de soja e nos componentes de produção, a variedade de soja FT-Cristalina RCH e suas linhagens, obtidas por retrocruzamentos, com e sem as três lipoxigenases nas sementes, foram avaliadas em três épocas de semeaduras. Os referidos autores concluíram que a eliminação genética das lipoxigenases das sementes não afetou negativamente as características agronômicas da variedade FT-Cristalina RCH.

Narvel et al. (1998), estudando linhagens sem as três lipoxigenases, também não observaram diferenças significativas entre as linhagens e a variedade comercial de soja FT-Cristalina RCH, nas características agronômicas altura de planta, dias para maturação, peso de sementes, produção e teores de óleo e proteínas das sementes.

Martins et al. (2002b), visando elucidar a participação das lipoxigenases no processo de resistência da soja a patógenos, variedades normais de soja (FT-Cristalina RCH, Doko RC e IAC-12) e respectivas linhagens obtidas por retrocruzamentos, com e sem as três lipoxigenases nas sementes, foram testadas quanto às suas resistências ao cancro-da-haste (*Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*), à cercosporiose (*Cercospora sojina* Hara) e ao oídio (*Microsphaera diffusa* Cke. & Pk.). Todos os materiais genéticos foram resistentes ao cancro-da-haste. Com relação à cercosporiose, não foi observado relação entre a retirada dos genes que codificam lipoxigenases nas sementes com a resistência à cercosporiose. No caso do oídio, as linhagens com presença de LOX ou com ausência de LOX apresentaram-se similares ou pouco mais resistentes que os respectivos progenitores recorrentes.

2.5.2. Melhoramento da Qualidade do Óleo

O óleo de soja é o líder mundial dos óleos vegetais e corresponde a 30% dos óleos vegetais consumidos no mundo (USDA, 2004). A maior utilização do óleo de soja na alimentação humana é na cocção dos alimentos, nas frituras e na produção de margarinas e gorduras vegetais (MOREIRA et al., 2001). Além do uso na alimentação, o óleo degomado é o segundo produto da soja mais utilizado na alimentação animal, sendo usado, predominantemente, no preparo de rações de frangos de corte e suínos, não havendo informações precisas do volume consumido (LIMA, 1999).

O óleo de soja tem o menor custo de produção entre os óleos vegetais, pois é um co-produto do farelo de soja (YADAV, 1996). Durante o processamento, os componentes extraídos da soja por solvente orgânico, como o hexano, são classificados como óleo bruto, cujos principais componentes são os triacilgliceróis. Componentes secundários incluem fosfolípídeos, material insaponificável, ácidos graxos livres e traços de metais. O material insaponificável consiste de tocoferóis, fitosteróis e hidrocarbonetos (LIU, 1997). O óleo bruto é, então, refinado para a obtenção do produto final livre de impurezas (KINNEY, 1996), contendo o óleo, após o processamento, acima de 99% de triacilgliceróis (LIU, 1997).

Triacilgliceróis são lipídeos neutros, consistindo de três ácidos graxos ligados a um glicerol. As propriedades funcionais e estabilidade oxidativa, bem como o valor nutricional de óleos comestíveis em geral e de soja em particular, são determinados por sua composição em ácidos graxos, configuração geométrica e distribuição posicional desses ácidos (LIU, 1997).

Cada óleo ou gordura natural tem uma composição única em ácidos graxos. Como muitos outros óleos de origem vegetal, os ácidos graxos do óleo de soja são, em sua maioria, insaturados (LIU, 1997). O óleo de soja é composto de cinco ácidos graxos principais: palmítico (16:0), esteárico (18:0), oléico (18:1), linoléico (18:2) e linolênico (18:3) (YADAV, 1996).

A composição média do óleo de soja é cerca de 15% de ácidos graxos saturados, 25% de ácido monoinsaturado e 60% de ácidos poliinsaturados. O alto teor de ácidos graxos poliinsaturados é responsável pela redução da estabilidade oxidativa e da qualidade (sabor e odor) do óleo de soja. Para tentar resolver esse problema, nos Estados Unidos o óleo de soja comercial é hidrogenado para aumentar a estabilidade oxidativa. No entanto, a necessidade de hidrogenação acaba reduzindo o atrativo econômico de se usar a fração óleo da soja. Além do mais, mesmo o óleo de soja hidrogenado possui odores desagradáveis que são atribuídos à presença do isolinoleato, produto da hidrogenação (YADAV, 1996). No processo de hidrogenação industrial ocorre também a formação de grande quantidade de ácidos graxos trans, chegando a valores ao redor de 50%. Os efeitos adversos dos ácidos graxos trans têm sido muito questionados, pois se tem tentado correlacionar a presença deles em dietas com incidência de doenças cardiovasculares (MANCINI FILHO e CHEMIN, 1996).

Como outros óleos comestíveis, além de seu papel na culinária, o óleo de soja supri-nos com calorias, ácidos graxos essenciais e vitaminas lipossolúveis. Uma vez que o óleo de soja não hidrogenado contém cerca de 53% de ácido linoléico e 8% de ácido linolênico, e o óleo parcialmente hidrogenado possui, ainda, cerca de 23% de ácido linoléico e 3% de ácido linolênico, o óleo de soja é uma excelente fonte de ácidos graxos essenciais. Os ácidos linoléico e linolênico são considerados essenciais porque mamíferos, incluindo os humanos, são incapazes de sintetizá-los. Mais especificamente, células do nosso corpo não são capazes de introduzir duplas ligações entre o

grupo metil terminal e a primeira dupla ligação situada na cadeia carbônica do respectivo ácido graxo. A única alternativa do organismo é introduzir grupos acetil para alongar a cadeia carbônica e formar novas duplas ligações entre a última dupla ligação e o grupo carboxílico do ácido graxo. Em outras palavras, a síntese dos ácidos araquidônico (20:4) e docosaexaenóico (22:6), os dois importantes precursores de prostaglandinas e outros eicosanóides, depende do suprimento pela dieta dos ácidos linoléico e linolênico (LIU, 1997).

A estabilidade natural do óleo de soja poderia, assim, resultar em baixo custo de processamento e melhoria do sabor (YADAV, 1996), sendo interessante, nesse ponto, ressaltar a tendência do consumidor atual em optar por produtos mais saudáveis.

Os principais objetivos em programas visando à alteração dos teores de ácidos graxos são o aumento do teor de ácido oléico e a redução do teor de ácido linolênico. Dessa forma, diferentes genótipos com baixo conteúdo de ácido linolênico foram desenvolvidos (WILSON et al., 1981; HAMMOND e FEHR, 1983; WILCOX et al., 1984; TAKAGI et al., 1990). Genótipos de soja com conteúdo de ácido oléico acima de 30% também foram desenvolvidos por melhoramento convencional (FEHR e CURTISS, 2004). Alternativamente, utilizando mutação induzida, novas fontes para alto teor de ácido oléico foram obtidas (RAHMAM e TAKAGI, 1996). Pelo uso de ferramentas de engenharia genética, genótipos de soja com conteúdo de ácido oléico superior a 80% foram obtidos (KINNEY, 1994; KINNEY, 1996). Segundo Araújo (2004), os ácidos graxos insaturados são oxidados a velocidades diferentes. O ácido linoléico é oxidado 64 vezes mais rápido que o oléico e o linolênico, 100 vezes mais rápido do que este.

Um exemplo do sucesso das linhagens de soja mutantes com baixo teor de ácido linolênico quanto à estabilidade oxidativa foi descrito no trabalho de Liu e White (1992). Eles compararam a estabilidade oxidativa do óleo de duas variedades comerciais de soja (com conteúdo de ácido linolênico de 7,5 e 8%) com quatro linhagens desenvolvidas no Programa de Melhoramento da Iowa State University, com baixo teor de ácido linolênico (entre 1,5 e 2%) e com o óleo de canola. Todos os óleos sofreram o mesmo processamento, foram refinados nas mesmas condições laboratoriais, sem aditivos, e estocados a 60 °C por 15 dias. Os óleos das quatro linhagens mutantes com

baixo teor de ácido linolênico foram mais estáveis que as duas variedades comerciais de soja. O óleo de canola foi muito menos estável que o óleo das duas variedades comerciais de soja em todos os testes químicos e sensoriais realizados. A qualidade do sabor e aroma foi negativamente correlacionada com o teor de ácido linolênico.

Diversas linhagens estão disponíveis no Programa de Melhoramento da Qualidade da Soja do BIOAGRO/UFV, com níveis reduzidos de ácido linolênico, obtidas por retrocruzamentos assistidos por microanálises bioquímicas não-destrutivas das sementes e marcadores moleculares, derivadas de variedades-elite adaptadas às regiões do Brasil central. Do cruzamento entre linhagens UFV TN (linhagens com ausência de LOX) e BARC 12 (acesso norte-americano), linhagem doadora de genes que determinam modificações na composição da fração óleo, foram selecionadas sementes que combinam ausência de lipoxigenases com baixo teor de ácido linolênico (MOREIRA et al., 2001).

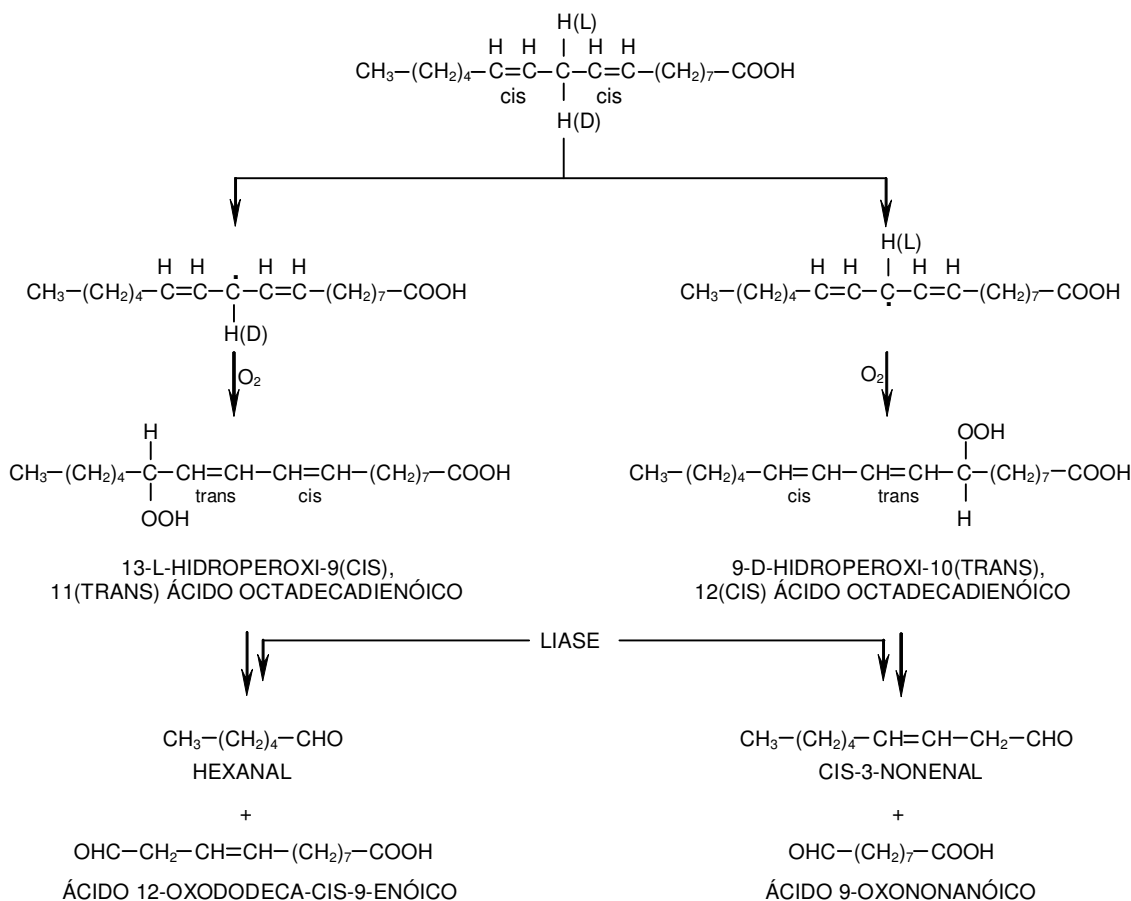
Um primeiro trabalho realizado com grãos oriundos do programa de melhoramento, isentos de lipoxigenases e com menor teor de ácido linolênico (3,7%), teve por objetivo o desenvolvimento de um produto protéico-calórico de alto valor nutritivo, estabilidade e aceitabilidade, constituído de farinha de mandioca e farinha integral de soja. O produto consistiu de uma farofa temperada, preparada a partir de uma farinha mista, cujo processamento incluiu a mistura de farinha de soja e farinha de mandioca na proporção de 1:1, com umidificação seguida de tratamento térmico (autoclavagem a 120 °C, por 10 e 20 minutos). O alimento obtido, constituindo uma boa fonte protéico-calórica, foi submetido a teste de aceitação. Como controle, o produto foi preparado utilizando também farinha de grãos de uma variedade de soja comercial. Em termos de aceitação, observou-se uma diferença significativa entre os produtos elaborados a partir dos diferentes genótipos de soja, sendo preferido aquele à base de soja melhorada. Na farofa obtida à base de soja comercial, foram observados níveis de hexanal mais elevados que naquela da linhagem melhorada, evidenciando-se a correlação entre atividade de lipoxigenases e oxidação de produtos de soja, o que resulta em diminuição da qualidade sensorial (TIBÚRCIO, 2000).

2.6. Índices de Oxidação

A oxidação de lipídeos é um processo extremamente complexo envolvendo numerosas reações que causam uma variedade de mudanças físicas e químicas. Essas reações, com frequência, ocorrem simultânea e competitivamente. Uma vez que a decomposição oxidativa é de importância fundamental com respeito à aceitabilidade e qualidade nutricional de produtos alimentícios, muitos métodos foram desenvolvidos para avaliá-la. Entretanto, um único teste possivelmente não pode medir todos os eventos oxidativos de uma vez, nem ser igualmente útil em todos os estádios do processo oxidativo e para todas as gorduras, todos os alimentos e todas as condições de processamento. Na melhor das hipóteses, um teste pode monitorar apenas algumas mudanças em sistemas específicos sob condições específicas. Para muitos propósitos, uma combinação de testes é necessária (NAWAR, 1996).

Vários métodos podem ser utilizados para se estimarem os produtos secundários da oxidação lipídica. As determinações do teor de hexanal (MATOBA et al., 1985; REZENDE et al., 1986, 1988; GOMES et al., 1987, 1989, 1990, 1995; TAKAMURA et al., 1991; MOREIRA et al., 1993; NISHIBA et al., 1995; FURUTA et al., 1996; ZHANG e LEE, 1997) e do índice de TBA (DAVIES et al., 1987; GOMES et al., 1987, 1989, 1990, 1995; MOREIRA et al., 1993; NISHIBA et al., 1995; FURUTA et al., 1996), nos mais diversos procedimentos analíticos, têm sido utilizadas há anos para grãos de soja e produtos derivados.

O hexanal, um aldeído resultante da decomposição de hidroperóxidos formados pela oxidação do ácido linoléico (Figura 3) (CABRAL, 1979; ARAÚJO, 2004), pode ser determinado por cromatografia gasosa, sendo utilizado como um indicador tanto da deterioração de alimentos gordurosos (CABRAL, 1979) quanto de alimentos com teor reduzido de gordura, devido à simplicidade, rapidez e, principalmente, à sensibilidade da técnica (FRITSCH e GALE, 1977). Várias metodologias encontram-se descritas na literatura para o preparo de amostras e separação e quantificação de hexanal. Dentre elas, citam-se: cromatografia gasosa por “head-space” (CABRAL, 1979; MOREIRA et al., 1993; GOMES et al., 1995); cromatografia líquida de alta eficiência, sendo o hexanal determinado como um derivado 2,4-dinitrofenil hidrazona



Fonte: Araújo (2004)

Figura 3 - Oxidação do ácido linoléico e decomposição de hidroperóxidos com formação de hexanal.

(MATOBA et al., 1985); e espectroscopia no infravermelho próximo (ZHANG e LEE, 1997).

Encontrado em todos os produtos relacionados com a soja (HSIEH et al., 1981), o hexanal compreende cerca de 25% dos compostos voláteis do extrato hidrossolúvel dessa leguminosa (WILKENS e LIN, 1970).

De acordo com Cabral (1979), as concentrações de hexanal foram comparadas aos escores obtidos na avaliação sensorial e aos resultados de índice de peróxido, sendo obtidos coeficientes de correlação iguais a 0,89 e 0,86, respectivamente. Gomes et al. (1989) obtiveram um coeficiente de correlação de 0,96 entre o teor de hexanal e a intensidade do sabor característico de extratos hidrossolúveis de soja fluidos, enquanto Gomes et al.

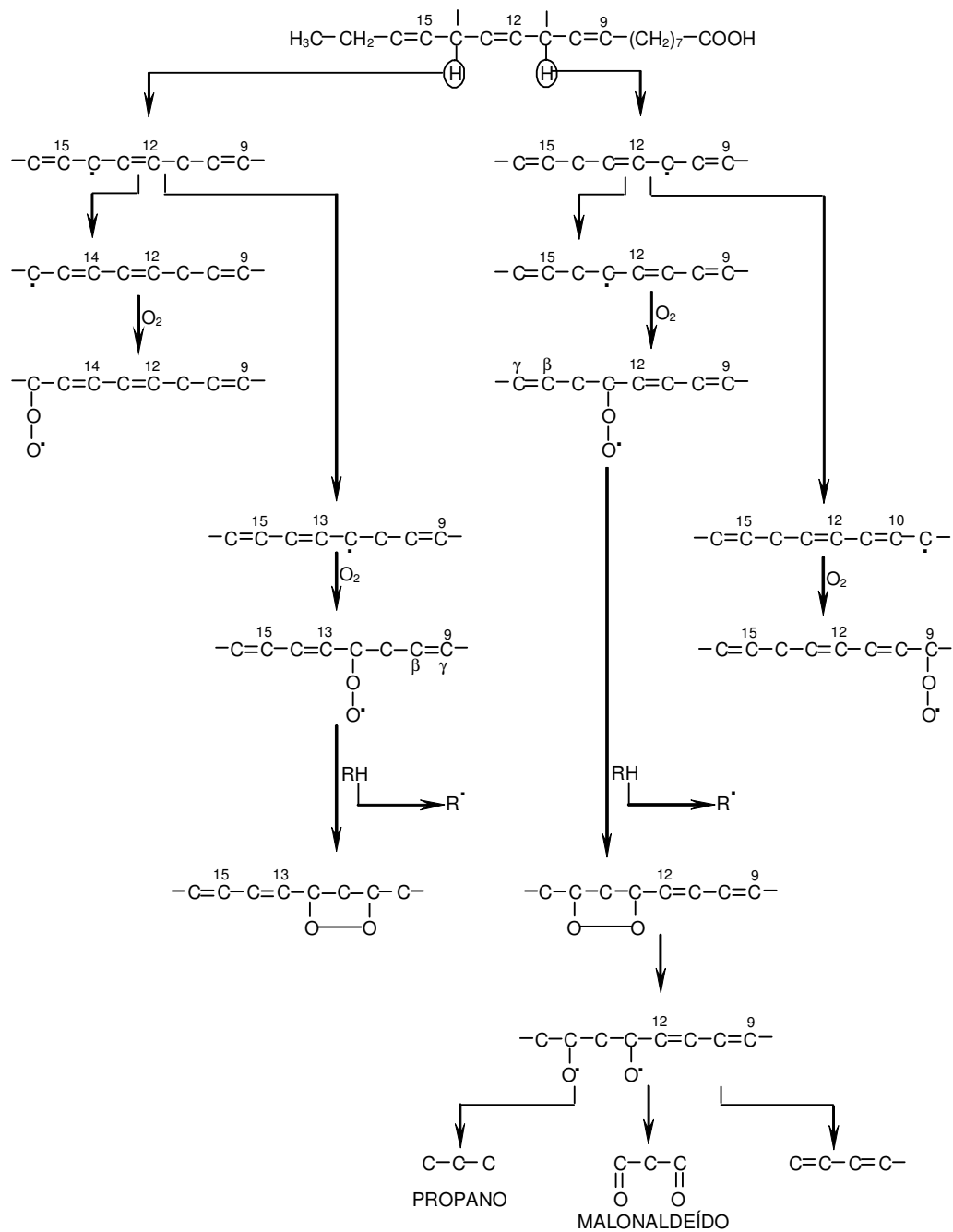
(1990) obtiveram resultados de níveis de hexanal comparáveis aos escores atribuídos por um painel sensorial a extratos hidrossolúveis fluidos e em pó.

O índice de TBA é um dos testes mais amplamente utilizados para avaliar a extensão da oxidação de lipídeos. Produtos de oxidação de sistemas insaturados produzem uma reação de cor com ácido tiobarbitúrico (TBA) (NAWAR, 1996). Acredita-se que a cor resulta da condensação de duas moléculas de TBA com uma de malonaldeído (DAHLE et al., 1962; NAWAR, 1996). O índice de TBA é, entretanto, mais usado na análise de alimentos gordurosos do que na de óleos e gorduras (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

De modo geral, substâncias reativas com TBA são produzidas em quantidades substanciais somente a partir de ácidos graxos contendo três ou mais insaturações (NAWAR, 1996; ARAÚJO, 2004). Dos quatro radicais peróxil produzidos a partir do linolenato, dois possuem insaturação β,γ referente à função peróxido e podem ciclizar-se, formando um anel contendo cinco membros que se decompõe para formar malonaldeído (Figura 4). Tal configuração está ausente nos radicais isoméricos oriundos do ácido linoléico (DAHLE et al., 1962; ARAÚJO, 2004).

A amostra contendo TBA é aquecida e o produto da reação, medido fotometricamente a 532 nm. Durante a fase de aquecimento, que é realizada em condições ácidas, o malonaldeído é liberado a partir do peróxido e reage com o ácido tiobarbitúrico. O teste pode ser realizado diretamente no produto, seguido de extração do pigmento colorido ou, alternativamente, a partir do destilado obtido (ARAÚJO, 2004).

Vários compostos foram encontrados além dos resultantes da oxidação lipídica, que reagem com TBA para produzir o pigmento vermelho característico. Sacarose e alguns compostos encontrados na fumaça da madeira foram relacionados por produzirem coloração vermelha em reação com TBA, e, nesse caso, os resultados precisam ser corrigidos para esses compostos interferentes (DU e BRAMLAGE, 1992; NAWAR, 1996). No entanto, baixos valores de TBA podem ser encontrados se parte do malonaldeído reage com proteínas no sistema oxidado. Além disso, escores sensoriais para sistemas diferentes não podem ser estimados a partir dos valores de TBA (NAWAR, 1996), porque a cor desenvolvida no teste de TBA vai variar de acordo com o perfil de ácidos graxos poliinsaturados de cada amostra. Assim,



Fonte: Dahle et al. (1962)

Figura 4 - Mecanismo proposto de oxidação do ácido linolênico com o peróxido cíclico intermediário na formação de malonaldeído.

em um mesmo nível de oxidação, um material rico em ácidos graxos altamente insaturados desenvolverá mais cor com TBA que um material rico em ácidos graxos menos insaturados (DAHLE et al., 1962). O teste de TBA é geralmente

útil para comparar amostras de um único material em diferentes estádios de oxidação (NAWAR, 1996).

Um procedimento analítico para leite em pó, consistindo na destilação do malonaldeído a partir do leite acidificado, reação de uma fração do destilado com TBA e leitura direta da cor obtida, foi descrito por Sidwell et al. (1955). O procedimento de destilação apresenta várias vantagens sobre outros métodos. O malonaldeído é obtido em uma solução aquosa transparente, de forma que o produto de reação com o ácido tiobarbitúrico não necessita ser extraído com solventes. O tratamento térmico ácido necessário para efetuar a liberação e destilação do malonaldeído das amostras é menos drástico que o requerido para máximo desenvolvimento de cor com o reagente TBA; conseqüentemente, há menos probabilidade de ocorrer oxidação da fração lipídica durante o teste (TARLADGIS et al., 1960). Outras vantagens seriam a ausência da interferência física de proteínas e a não-utilização de solvente como álcool isoamílico ou piridina (SIDWELL et al., 1955). Existem métodos em que outros reagentes como clorofórmio e ácido tricloroacético são utilizados (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

Outros métodos de análise foram desenvolvidos com o mesmo propósito. Uma metodologia para determinação do malonaldeído no destilado aquoso por cromatografia líquida de alta eficiência, em fase reversa, utilizando um detector espectrofotométrico a 254 nm, foi descrita por Kakuda et al. (1981). Suda et al. (1994) desenvolveram um método fluorométrico para determinação de um aducto ácido 1,3-dietil-2-tiobarbitúrico (DETBA) – malonaldeído como um índice de peroxidação de lipídeos em material vegetal. Após a reação entre o DETBA e o tecido vegetal, o aducto foi extraído com acetato de etila e medido por espectrofluorometria ou por cromatografia líquida de alta eficiência, com um detector de fluorescência. A determinação de malonaldeído por cromatografia gasosa requer derivatização prévia, sendo alguns métodos citados por Fernández et al. (1997).

Davies et al. (1987), trabalhando com homogenatos e farinhas resultantes de linhagens de soja com ausência de uma ou mais isoenzimas lipoxigenases, encontraram uma relação direta entre o índice de TBA e as avaliações sensoriais. Os resultados obtidos por Gomes et al. (1990), na avaliação sensorial de extratos hidrossolúveis de soja fluidos e em pó, também

estão de acordo com os da determinação do índice de TBA. Uma boa correlação entre o índice de TBA e os escores atribuídos às características sensoriais referidas como intensificadas pela ação de lipoxigenases nos produtos protéicos de soja foi obtida por Gomes et al. (1995). Foram encontrados coeficientes de correlação iguais a 0,9909 e 0,9960, para as características sabor de “feijão cru” e gosto amargo do extrato hidrossolúvel de soja em pó, respectivamente.

Concluindo, a soja é rica em lipídeos poliinsaturados como os ácidos linoléico e linolênico, e a oxidação desses lipídeos poliinsaturados gerada também pelo processamento pode produzir produtos de degradação com um significativo impacto no sabor, ou seja, sabor “beany”, induzido pela oxidação. Entre os muitos indicadores da oxidação lipídica, o método do ácido tiobarbitúrico é um dos mais amplamente utilizados (WANG et al., 2001).

3. REFERÊNCIAS

ABIOVE - Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais. Disponível em: <<http://www.abiove.com.br/>>. Acesso em: 22 jul. 2005.

ANG, E. C.; BOATRIGT, W. L. Olfactory perception of major odorants found in the headspace of aqueous soy protein isolate slurries. **J. Food Sci.**, v. 68, p. 388-393, 2003.

ANUÁRIO BRASILEIRO DA SOJA 2000. Santa Cruz do Sul, RS: Gazeta Grupo de Comunicações, [2001]. 143 p.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos**: Teoria e prática. 3. ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2004. 478 p.

ARAÚJO, J. M. A.; CARLOS, J. S. S.; SEDYAMA, C. S. Isoflavonas em grãos de soja: importância da atividade de β -glicosidase na formação do sabor amargo e adstringente. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 17, p. 137-141, 1997.

ATHIÉ, I.; CASTRO, M. F. P. M.; GOMES, R. A. R.; VALENTINI, S. R. T. Ecossistema de Armazenagem. In: — **Conservação de grãos**. Campinas, SP: Fundação Cargill, 1998. p. 1-30.

AXELROD, B. Lipoxygenases. **ACS Adv. Chem. Ser.**, v. 136, p. 324-348, 1974.

AXELROD, B.; CHEESBROUGH, T. M.; LAAKSO, S. Lipoxygenase from soybeans. **Methods Enzimol.**, v. 71, p. 441-451, 1981.

BARNES, S.; KIM, H. Soy in the prevention and treatment of chronic diseases. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 1999, Londrina. **Anais...**Londrina, PR: EMBRAPA-SPI, 1999. p. 295-308.

BEHRENS, J. H.; SILVA, M. A. A. P. Atitude do consumidor em relação à soja e produtos derivados. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 24, p. 431-439, 2004.

BOATRRIGHT, W. L. Effect of gallic acid on the aroma constituents of soymilk and soy protein isolates. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 79, p. 317-323, 2002.

BOATRRIGHT, W. L.; LEI, Q. Compounds contributing to the "beany" odor of aqueous solutions of soy protein isolates. **J. Food Sci.**, v. 64, p. 667-670, 1999.

BOATRRIGHT, W. L.; LEI, Q. Headspace evaluation of methanethiol and dimethyl trisulfide in aqueous solutions of soy-protein isolates. **J. Food Sci.**, v. 65, p. 819-821, 2000.

BRENDNAREK, P.; FRANSKI, R.; KERHOAS, L.; EINHORN, L.; WOJTASZER, S.; STOBIECKI, M. Profiling changes in metabolism of isoflavonoids and their conjugates in *Lupinus albus* treated with biotic elicitor. **Phytochemistry**, v. 56, p. 77-85, 2001.

BUNKER, T. W.; KOETJE, D. S.; STEPHENSON, L. C.; CREELMAN, R. A.; MULLET, J. E.; GRIMES, H. D. Sink limitation induces the expression of multiple soybean vegetative lipoxygenase mRNA while the endogenous jasmonic acid level remains low. **The Plant Cell**, v. 7, p. 1319-1331, 1995.

CABRAL, A. C. D. Determinação de hexanal em alimentos com alto teor de matéria graxa por cromatografia gasosa. **Col. ITAL**, v. 10, p. 73-97, 1979.

CARRÃO-PANIZZI, M. Os benefícios da soja para a saúde humana. In: REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL, 23., 2001, Londrina. **Ata...** Londrina, PR: Embrapa Soja, 2001. p. 189-193.

CARRÃO-PANIZZI, M.; BELÉIA, A. D. P.; PRUDÊNCIO-FERREIRA, S. H.; OLIVEIRA, M. C. N.; KITAMURA, K. Effects of isoflavones on beany flavor and astringency of soymilk and cooked whole soybean grains. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 34, p. 1045-1052, 1999.

CHIEN, J. T.; SNYDER, H. E. Detection and control of soymilk astringency. **J. Food Sci.**, v. 48, p. 438-440, 1983.

COWAN, J. C.; RACKIS, J. J.; WOLF, W. J. Soybean protein flavor components: a review. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 50, p. 426-444, 1973.

DAHLE, L. K.; HILL, E. G.; HOLMAN, R. T. The thiobarbituric acid reaction and the autoxidations of polyunsaturated fatty acid methyl esters. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 98, p. 253-261, 1962.

DAVIES, C. S.; NIELSEN, S. S.; NIELSEN, N. C. Flavor improvement of soybean preparations by genetic removal of lipoxygenase-2. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 64, p. 1428-1433, 1987.

DAY N'KOUKA, K.; KLEIN, B. P.; LEE, S. Y. Developing a lexicon for descriptive analysis of soymilks. **J. Food Sci.**, v. 69, p. S259-S263, 2004.

DÉNARIÉ, J.; DEBELLÉ, F.; PROMÉ, J. C. *Rhizobium* lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 65, p. 503-535, 1996.

DEWICK, P. M. Isoflavonoids. In: HARBORNE, J. B. (Ed.). **The flavonoids: advances in search since 1986**. Chapman & Hall, 2-6 Boundary Row, London, 1994, p. 117-238.

DIXON, R. A.; STEELE, C. L. Flavonoids and isoflavonoids – a gold mine for metabolic engineering. **Trends Plant Sci.**, v. 4, p. 394-400, 1999.

DREWNOWSKI, A.; GOMEZ-CARNEROS, C. Bitter taste, phytonutrients, and the consumer: a review. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 72, p. 1424-1435, 2000.

DU, Z.; BRAMLAGE, W. J. Modified thiobarbituric acid assay for measuring lipid oxidation in sugar-rich plant tissue extracts. **J. Agric. Food Chem.**, v. 40, p. 1566-1570, 1992.

ESKIN, N. A. M.; GROSSMAN, S.; PINSKY, A.; WHITAKER, J. R. Biochemistry of lipoxygenase in relation to food quality. **CRC - Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 9, p. 1-40, 1977.

FEHR, W. R.; CURTISS, C. F. Breeding for fatty acid composition of soybean oil. In: INTERNATIONAL SOYBEAN PROCESSING AND UTILIZATION CONFERENCE, 4., Foz do Iguacu, PR. **Proceedings...** Londrina, PR: Embrapa, 2004. p. 815-821.

FERNÁNDEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J. A. Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. **Food Chem.**, v. 59, p. 345-353, 1997.

FRITSCH, C. W.; GALE, J. A. Hexanal as a measure of rancidity in low fat foods. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 54, p. 225-228, 1977.

FULLER, M. A.; WEICHERT, H.; FISCHER, A. M. Activity of soybean lipoxygenase isoforms against esterified fatty acids indicates functional specificity. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 388, p. 146-154, 2001.

FURUTA, S.; NISHIBA, Y.; HAJIKA, M.; IGITA, K.; SUDA, I. DETBA value and hexanal production with the combination of unsaturated fatty acids and extracts prepared from soybean seeds lacking two or three lipoxygenase isozymes. **J. Agric. Food Chem.**, v. 44, p. 236-239, 1996.

GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Determinação de isoflavonas em derivados de soja. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 21, p. 86-93, 2001.

- GOMES, J. C.; JOSÉ, I. C.; COELHO, D. T.; CHAVES, J. B. P.; REZENDE, S. T. Extratos hidrossolúveis produzidos de soja sem lipoxigenases. **Ciênc. Technol. Aliment.**, v. 15, p. 95-103, 1995.
- GOMES, J. C.; OLIVEIRA, S. A. M.; OLIVEIRA, L. M.; COELHO, D. T.; MOREIRA, M. A. Extrato solúvel de soja: sabor e teor de hexanal. **Arq. Biol. Technol.**, v. 32, p. 665-686, 1989.
- GOMES, J. C.; SILVA, M. V.; COELHO, D. T.; CHAVES, J. B. P.; REZENDE, S. T. Extrato solúvel de soja: sabor e aroma, lipoxigenase e hexanal. **Arq. Biol. Technol.**, v. 33, p. 353-368, 1990.
- GOMES, J. C.; VISENTAINER, J. V.; MOREIRA, M. A.; FONTES, E. P. B. F. Atividade de lipoxigenase e o teor de n-hexanal em farinhas de soja. **Arq. Biol. Technol.**, v. 30, p. 481-500, 1987.
- GOOSSENS, A. E. Protein food – its flavours and off-flavours. **Flav. Ind.**, v. 5, p. 273-274, 276, 1974.
- GRAHAM, T. L.; GRAHAM, M. Y. Gliceollin elicitors induce major but distinct shifts in isoflavonoid metabolism in proximal e distal soybean cell populations. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, v. 4, p. 60-68, 1991.
- HAMMOND, E. G.; FEHR, W. R. Registration of A5 germoplasm line of soybean. **Crop Sci.**, v. 23, p.192-193, 1983.
- HARBORNE, J.B. **Flavonoids: Advances in research since 1986.** London: Champman and Hall, 1994. 676 p.
- HASHIM, L.; CLAVERON, H. Isolation and identification of off-flavor components from soy milk. **Develop. Food Sci.**, v. 37A, p. 1007-1019, 1995.
- HAUMANN, B. F. Health implications of lipid oxidation. **INFORM**, v. 4, p. 800, 803, 804, 806-808, 810, 1993.
- HILDEBRAND, D. F. Lipoxygenases. **Physiol. Plant.**, v. 76, p. 249-253, 1989.
- HSIEH, O. A. L.; HUANG, A. S.; CHANG, S. S. Isolation and identification of objectionable volatile flavor compounds in defatted soybean flour. **J. Food Sci.**, v. 47, p. 16-18, 1981.
- HUANG, J. S.; BARKER, K. R. Glyceollin I in Soybean-Cyst Nematode Interactions. **Plant Physiol.**, v. 96, p. 1302-1307, 1991.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz; Métodos químicos e físicos para análise de alimentos.** 3. ed. São Paulo, 1985. v. 1, 533 p.

KAKUDA, Y.; STANLEY, D. W.; VOORT, F. R. Determination of TBA number by high performance liquid chromatography. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 58, p. 773-775, 1981.

KALBRENER, J. E.; WARNER, K.; ELDRIDGE, A. C. Flavors derived from linoleic and linolenic acid hydroperoxides. **Cereal Chem.**, v. 51, p. 406-416, 1974.

KINNEY, A. J. Development of genetically engineered soybean oils for food applications. **J. Food Lipids**, v. 3, p. 273-292, 1996.

KINNEY, A. J. Genetic modification the storage lipids of plants. **Curr. Opin. in Biotech.**, v. 5, p. 144-151, 1994.

KITAMURA, K. Biochemical characterization of lipoxygenase lacking mutants, L-1-less, L-2-less and L-3-less soybeans. **Agric. Biol. Chem.**, v. 48, p. 2339-2346, 1984.

KITAMURA, K.; DAVIES, C. S.; KAIZUMA, N.; NIELSEN, N. C. Genetic analysis of a null-allele for lipoxygenase-3 in soybean seeds. **Crop Sci.**, v. 23, p. 924-927, 1983.

KITAMURA, K.; IGITA, K.; KIKUCHI, A.; KUDOU, S.; OKUBO, K. Low isoflavone content in some early maturing cultivars, so-called "summer-type soybeans" (*Glycine max* (L.) Merrill). **Japan. J. Breed.**, v. 41, p. 651-654, 1991.

KLEIN, L. Benefícios à saúde e à nutrição trazidos pela soja. In: CONGRESSO DE TECNOLOGIA E COMPETITIVIDADE DA SOJA NO MERCADO GLOBAL, 2000, Cuiabá. **Anais...** Cuiabá, MT: Fundação MT, 2000. p. 153-160.

KOBAYASHI, A.; TSUDA, Y.; HIRATA, N.; KUBOTA, K.; KITAMURA, K. Aroma constituents of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] milk lacking lipoxygenase isozymes. **J. Agric. Food Chem.**, v. 43, p. 2449-2452, 1995.

KON, S.; WAGNER, J. R.; GUADAGNI, D. G.; HORVAT, R. J. pH adjustment control of oxidative off-flavors during grinding of raw legume seeds. **J. Food Sci.**, v. 35, p. 343-345, 1970.

KUDOU, S.; FLEURY, Y.; WELTI, D.; MAGNOLATO, D.; UCHIDA, T.; KITAMURA, K.; OKUBO, K. Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds (*Glycine Max* Merrill). **Agric. Biol. Chem.**, v. 55, p. 2227-2233, 1991.

LAZZARI, F. A. Fatores de qualidade do grão da soja para diferentes consumidores. In: CONGRESSO DE TECNOLOGIA E COMPETITIVIDADE DA SOJA NO MERCADO GLOBAL, 2000, Cuiabá. **Anais...** Cuiabá, MT: Fundação MT, 2000. p. 77-85.

LAZZARI, F. A. Fatores de qualidade do grão da soja. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 1999, Londrina. **Anais...** Londrina, PR: Embrapa Soja, 1999. p. 205-210.

LEI, Q.; BOATRIGT, W. L. Compounds contributing to the odor of aqueous slurries of soy protein concentrates. **J. Food Sci.**, v. 66, p. 1306-1310, 2001.

LIMA, G. J. M. M. Importância da qualidade nutricional da soja e de seus subprodutos no mercado de rações: situação atual e perspectivas futuras. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 1999, Londrina. **Anais...** Londrina, PR: Embrapa Soja, 1999. p. 165-175.

LIU, H-R.; WHITE, P. J. Oxidative stability of soybean oils with altered fatty acid compositions. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 69, p. 528-532, 1992.

LIU, K. Expanding soybean food utilization. **Food Technol.**, v. 54, p. 46-48, 50, 52, 54, 56, 58, 2000.

LIU, K. **Soybeans: Chemistry, technology and utilization.** New York: Chapman & Hall, 1997. 532 p.

LIU, S.; NORRIS, D. M.; HARTWIG, E. E.; XU, M. Inducible phytoalexins in juvenile soybean genotypes predic soybean looper resistance in the fully developed plants. **Plant Physiol.**, v. 100, p. 1479-1485, 1992.

MACK, A. J.; PETERMAN, T. K.; SIEDOW, J. N. Lipoxygenase isozymes in higher plants: biochemical properties and physiological role. **Isozymes: Curr. Top. Biol. Med. Res.**, v. 13, p. 127-154, 1987.

MAGA, J. A. A review of flavor investigations associated with the soy products raw soybeans, defatted flakes and flours, and isolates. **J. Agric. Food Chem.**, v. 21, p. 864-868, 1973.

MANCINI FILHO, J.; CHEMIN, S. Implicações nutricionais dos ácidos graxos trans. **Óleos & grãos**, v. 31, p. 41-45, 1996.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em:<<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: 22 jul. 2005.

MARTINS, C. A. O.; SEDIYAMA, C. S.; MOREIRA, M. A.; REIS, M. S.; ROCHA, V. S.; OLIVEIRA, M. G. A. Efeito da eliminação genética das lipoxigenases das sementes sobre as características agronômicas da soja. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 37, p. 1389-1398, 2002a.

MARTINS, C. A. O.; SEDIYAMA, C. S.; OLIVEIRA, M. G. A.; REIS, M. S.; ROCHA, V. S.; MOREIRA, M. A.; GOMES, J. L. L. Resistance to stem canker, frog-eye leaf spot and powdery mildew of soybean lines lacking lipoxygenases in the seeds. **Sci. Agricola**, v. 59, p. 701-705, 2002b.

MATOKA, T.; HIDAKA, H.; NARITA, H.; KITAMURA, K.; KAIZUMA, N.; KITO, M. Lipoxygenase-2 isozyme is responsible for generation of n-hexanal in soybean homogenate. **J. Agric. Food Chem.**, v. 33, p. 852-855, 1985.

- MATSUURA, M.; OBATA, A.; FUKUSHIMA, D. Objectionable flavor of soy milk developed during the soaking of soybeans and its control. **J. Food. Sci.**, v. 54, p. 602-605, 1989.
- MATTICK, L. R.; HAND, D. B. Identification of a volatile component in soybeans that contributes to the raw bean flavor. **J. Agric. Food Chem.**, v. 17, p. 15-17, 1969.
- MESSINA, M. Soyfoods and soybean phyto-oestrogens (isoflavones) as possible alternatives to hormone replacement therapy (HRT). **European J. Cancer**, v. 36, p. S71-S77, 2000.
- MORAIS, A. A. C.; COELHO, D. T.; SILVA, A. L. Processamento. In: MORAIS, A. A. C.; SILVA, A. L. **Soja: Suas aplicações**. Rio de Janeiro: Medsi, 1996. 259 p.
- MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G.; PIOVESAN, N. D.; SCHUSTER, I.; OLIVEIRA, M. G. A.; SEDIYAMA, C. S. Programa de melhoramento genético da qualidade da soja para a agroindústria em desenvolvimento na UFV. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 1., 2001, Goiânia. **Anais...**Goiânia, GO: Embrapa, 2001. 1 CD-ROM.
- MOREIRA, M. A.; TAVARES, S. R.; RAMOS, V.; BARROS, E. G. Hexanal production and TBA number are reduced in soybean [*Glycine Max* (L.) Merr.] seeds lacking lipoxygenase isozymes 2 and 3. **J. Agric. Food Chem.**, v. 41, p. 103-106, 1993.
- MUSTAKAS, G. C.; ALBRECHT, W. J.; MCGHEE, J. E.; BLACK, L. T.; BOOKWALTER, G. N.; GRIFFIN Jr., E. L. Lipoxidase deactivation to improve stability, odor and flavor of full-fat soy flours. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 46, p. 623-626, 1969.
- NARAYAN, R.; CHAUHAN, G. S.; VERNA, N. S. Changes in the quality of soybean during storage. Part 1 – Effect of storage on some physico-chemical properties of soybean. **Food Chem.**, v. 27, p. 13-23, 1988a.
- NARAYAN, R.; CHAUHAN, G. S.; VERNA, N. S. Changes in the quality of soybean during storage. Part 2 – Effect of soybean storage on the sensory qualities of the products made therefrom. **Food Chem.**, v. 30, p. 181-190, 1988b.
- NARVEL, J. M.; FEHR, W. R.; WELKE, G. A. Agronomic and seed traits of soybean lines lacking seed lipoxygenases. **Crop Sci.**, v. 38, p. 926-928, 1998.
- NAWAR, W. W. Lipids. In: FENNEMA, O. R. (Ed.). **Food chemistry**. 3. ed. New York: Marcel Dekker, 1996. p. 225-319.
- NELSON, A. I.; STEINBERG, M. P.; WEI, L. S. Illinois process for preparation of soymilk. **J. Food Sci.**, v. 41, p. 57-61, 1976.

- NELSON, A. I.; WEI, L. S.; STEINBERG, M. P. Food products from whole soybeans. **Soybean Digest**, p. 31-34, 1971.
- NETO, J. B. F. Perspectivas futuras da cultura da soja no Brasil: produção, produtividade, expansão de área. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 3., 2004, Foz do Iguaçu, PR. **Proceedings...** Londrina, PR: Embrapa, 2004. p. 1203-1209.
- NISHIBA, Y.; FURUTA, S.; HAJIKA, M.; IGITA, K.; SUDA, I. Hexanal accumulation and DETBA value in homogenate of soybean seeds lacking two or three lipoxygenase isozymes. **J. Agric. Food Chem.**, v. 43, p. 738-741, 1995.
- PUEPPKE, J. L. The genetics and biochemical basis for nodulation of legumes by Rhizobia. **Crit. Rev. Biotechnol.**, v. 16, p. 1-51, 1996.
- PUMAR, M.; CABRAL, L. C.; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; KIKUCHI, A.; MELLO, J. S. R. Efeito do tempo de maceração do grão de soja (*Glycine Max*) no teor de isoflavonas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 17., 2000, Fortaleza. **Livro de Resumos...** Fortaleza, 2000. v. 2, p. 209.
- RACKIS, J. J.; HONIG, D. H.; SESSA, D. J.; MOSER, H. A. Lipoxygenase and peroxidase activities of soybeans as related to the flavor profile during maturation. **Cereal Chem.**, v. 49, p. 586-597, 1972.
- RACKIS, J. J.; SESSA, D. J.; HONIG, D. H. Flavor problems of vegetable food proteins. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 56, p. 262-271, 1979.
- RAHMAM, S. M.; TAKAGI, Y. Inheritance of high oleic acid content in the seed oil of soybean mutant M23. **Theor. Appl. Genet.**, v. 92, p.179-182, 1996.
- REZENDE, S. T.; FONTES, E. P. B.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G.; SEDIYAMA, T. Efeito da eliminação genética das isozimas lipoxigenases L₁ e L₃ de grãos de soja na produção de n-hexanal em produtos derivados. **Arq. Biol. Tecnol.**, v. 29, p. 571-579, 1986.
- REZENDE, S. T.; MOREIRA, M. A.; MOREIRA, S. M. C.; FONTES, E. P. B.; GOMES, J. C. Efeitos de danos físicos e teor de umidade na produção de n-hexanal em grãos de soja. **Arq. Biol. Tecnol.**, v. 31, p. 433-442, 1988.
- RIVERA-VARGAS, L. I.; SCHMITTHENNER, A. F.; GRAHAM, T. L. Soybean flavonoid effects on and metabolism by *Phytophthora sojae*. **Phytochemistry**, v. 32, p. 851-857, 1993.
- ROSAHL, S. Lipoxygenases in plants – their role in development and stress response. **Z. Naturforsch**, v. 51c, p. 123-138, 1996.
- SARAVITZ, D. M.; SIEDOW, J. N. The lipoxygenase isozymes in soybean [*Glycine Max* (L.) Merr.] leaves – changes during leaf development, after wounding, and following reproductive sink removal. **Plant Physiol.**, v. 107, p. 535-543, 1995.

SESSA, D. J.; WARNER, K.; HONIG, D. H. Soybean phosphatidylcholine develops bitter taste on autoxidation. **J. Food Sci.**, v. 39, p. 69-72, 1974.

SETCHELL, K. D. R. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 6 (Suppl.), p. 1333S-1346S, 1998.

SIDWELL, C. G.; SALWIN, H.; MITCHELL Jr., J. H. Measurement of oxidation in dried milk products with thiobarbituric acid. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 32, p. 13-16, 1955.

SIEDOW, J. N. Plant lipoxygenase: structure and function. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v. 42, p. 145-188, 1991.

SONG, T.; BARUA, K.; BUSEMAN, G.; MURPHY, P. A. Soy isoflavone analysis: quality control and a new internal standard. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 68 (suppl.), p. 1474S-1479S, 1998.

SOUSA, C. B. A logística de industrialização e o consumo dos derivados de soja. In: CONGRESSO DE TECNOLOGIA E COMPETITIVIDADE DA SOJA NO MERCADO GLOBAL, 2000, Cuiabá. **Anais...** Cuiabá, MT: Fundação MT, 2000. p. 123-125.

STASWICK, P. E. Novel regulation of vegetative storage protein genes. **The Plant Cell**, v. 2, p. 1-6, 1990.

STASWICK, P. E. Storage of proteins of vegetative plant tissues. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v. 45, p. 303-322, 1994.

STEPHENSON, L. C.; BUNKER, T. W.; DUBBS, W. E.; GRIMES, H. D. Specific soybean lipoxygenases localize to discrete subcellular compartments and their mRNAs are differentially regulated by source-sink status. **Plant Physiol.**, v. 116, p. 923-933, 1998.

SUDA, I.; FURUTA, S.; NISHIBA, Y. Fluorometric determination of a 1,3-diethyl-2-thiobarbituric acid-malondialdehyde adduct as an index of lipid peroxidation in plant materials. **Biosci. Biotech. Biochem.**, v. 58, p. 14-17, 1994.

TAKAGI, Y.; HOSSAIN, A. B. M. M.; YANAGITA, T.; MUTSUEDA, T.; MURAYAMA, A. Linolenic acid content in soybean improved by X-ray irradiation. **Agric. Biol. Chem.**, v. 54, p. 1735-1738, 1990.

TAKAHASHI, N.; KIBATAKG, N.; SASAKI, R.; CHIBA, H. Enzymatic improvement of food flavor. V. Oxidation of aldehydes in soybean extracts by on NAD⁺ - regenerating system made up of aldehyde dehydrogenase and diophorase. **Agric. Biol. Chem.**, v. 44, p. 1669-1670, 1980.

TAKAHASHI, N.; SASAKI, R.; CHIBA, H. Enzymatic improvement of food flavor. IV. Oxidation of aldehydes in soybean extracts by aldehyde oxidase. **Agric. Biol. Chem.**, v. 43, p. 2557-2561, 1979.

TAKAMURA, H.; KITAMURA, K.; KITO, M. Inhibition by lipoxygenase-3 of n-hexanal generation in soybeans. **FEBS Letters**, v. 292, p. 42-44, 1991.

TAKETA, S. T. **Comportamento da soja [*Glycine max* (L.) Merrill] com ausência de três isoenzimas lipoxigenases, em diferentes épocas de plantio, em duas localidades de Minas Gerais.** Viçosa, MG: UFV, 2000. 69 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

TARLADGIS, B. G.; WATTS, B. M.; YOUNATHAN, M. T. A distillation method for the quantitative determination of malonaldehyde in rancid foods. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 37, p. 44-48, 1960.

TEETER, H. M.; GAST, L. E.; BELL, E. W.; SCHNEIDER, W. J.; COWAN, J. C. Investigations on the bitter and beany components of soybean. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 32, p. 390-397, 1955.

TIBÚRCIO, D. T. S. **Enriquecimento protéico de farinha de mandioca com farinha de soja de sabor melhorado:** desenvolvimento e avaliação nutricional de um novo produto. Viçosa, MG: UFV, 2000. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

TORRES-PENARANDA, A. V.; REITMEIER, C. A. Sensory descriptive analysis of soymilk. **J. Food Sci.**, v. 66, p. 352-356, 2001.

TORRES-PENARANDA, A. V.; REITMEIER, C. A.; WILSON, L. A.; FEHR, W. R.; NARVEL, J. M. Sensory characteristics of soymilk and tofu made from lipoxygenase-free and normal soybeans. **J. Food Sci.**, v. 63, p. 1084-1087, 1998.

USDA – United States Department of Agriculture, 2004. Disponível em: <<http://www.soystats.com/2005/Default-frames.htm>>. Acesso em: 22 jul. 2005.

VARA-UBOL, S.; CHAMBERS IV, E.; CHAMBERS, D. H. Sensory characteristics of chemical compounds potentially associated with beany aroma in foods. **J. Sensory Studies**, v. 19, p. 15-26, 2004.

VIOLA, E. S. Uso de soja integral em dietas de suínos e aves: oportunidades e entraves. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 1999, Londrina, PR. **Anais...** Londrina, PR: EMBRAPA-SPI, 1999. p.176-182.

WANG, B.; XIONG, Y. L.; WANG, C. Physicochemical and sensory characteristics of flavored soymilk during refrigeration storage. **J. Food Quality**, v. 24, p. 513-526, 2001.

WANG, H. J.; MURPHY, P. A. Isoflavone composition of American and Japanese soybeans in Iowa: effects of variety, crop year, and location. **J. Agric. Food Chem.**, v. 42, p. 1674-1677, 1994.

WANG, Z. H.; DOU, J.; MACURA, D.; DURANCE, T. D.; NAKAI, S. Solid extraction for GC analysis of beany flavours in soymilk. **Food Research International**, v. 30, p. 503-511, 1998.

WILCOX, J. R.; CAVINS, J. F.; NIELSEN, N. C. Genetic alteration of soybean oil composition by a chemical mutagen. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 61, p. 97-100, 1984.

WILKENS, W. F.; LIN, F. M. Gas chromatographic and mass spectral analyses of soybean milk volatiles. **J. Agric. Food Chem.**, v. 18, p. 333-336, 1970.

WILKENS, W. F.; MATTICK, L. R.; HAND, D. B. Effect of processing method on oxidative off-flavors of soybean milk. **Food Technol.**, v. 21, p. 86-89, 1967.

WILSON, L. A. Comparison of lipoxygenase-null and lipoxygenase-containing soybeans for foods. In: PIAZZA, G. J. (Ed.). **Lipoxygenase and lipoxygenase pathway enzymes**. Champaign, IL: AOCS Press, 1996. p. 209-225.

WILSON, R. F.; BURTON, J. W.; BRIM, C. A. Progress in the selection for altered fatty acid composition in soybeans. **Crop Sci.**, v. 21, p. 788-791, 1981.

WOLF, W. J. Lipoxygenase and flavor of soybean protein products. **J. Agric. Food Chem.**, v. 23, p. 136-141, 1975.

XIAN-ZHI, H.; DIXON, R. A. Genetic manipulation of isoflavone 7-O-methyltransferase enhances biosynthesis of 4'-O-methylated isoflavonoids phytoalexins and disease resistance in alfalfa. **Plant Cell**, v. 12, p. 1689-1702, 2000.

YADAV, N. S. Genetic modification of soybean oil quality. In: VERNA, D. P. S.; SHOEMAKER, R. C. (Eds.). **Soybean genetics, molecular biology and biotechnology**. USA: CAB INTERNATIONAL, 1996. p. 165-188.

YU, O.; JUNG, W.; SHI, J.; CROES, R. A.; FADER, G. M.; MCGONIGLE, B.; ODELL, J. T. Production of the isoflavones genistein and daidzein in non-legume dicot and monocot tissues. **Plant Physiol.**, v. 124, p. 781-793, 2000.

YU, O.; SHI, J.; HESSION, A. O.; MAXWELL, C. A.; MCGONIGLE, B.; ODELL, J. T. Metabolic engineering to increase isoflavone biosynthesis in soybean seed. **Phytochemistry**, v. 63, p. 753-763, 2003.

ZHANG, H. Z.; LEE, T. C. A novel silica gel adsorption/near-infrared spectroscopic method for the determination of hexanal as an example of volatile compounds. **J. Agric. Food Chem.**, v. 45, p. 3083-3087, 1997.

CAPÍTULO 1

EFEITO DAS ISOENZIMAS LIPOXIGENASES E DO TEOR DE ÁCIDO LINOLÊNICO NA ESTABILIDADE OXIDATIVA DE GRÃOS DE SOJA ARMAZENADOS

1. INTRODUÇÃO

A grande limitação do uso de produtos derivados de soja na alimentação humana nos países ocidentais se deve, principalmente, ao fato de tais produtos apresentarem sabores indesejáveis com relação aos padrões de palatabilidade desses povos, comprometendo suas propriedades sensoriais e diminuindo a sua aceitabilidade (MORAIS et al., 1996). A oxidação enzimática e a não-enzimática de ácidos graxos durante o processamento e estocagem da soja representam problema para a indústria de alimentos (REZENDE et al., 1988).

A principal causa do desenvolvimento de sabor indesejável em produtos protéicos de soja é a ação de lipoxigenases sobre os ácidos linoléico e linolênico (LIU, 1997). Os produtos primários da ação catalítica dessa enzima são 9 e 13-hidroperóxidos, que, decompostos enzimaticamente ou não, formam uma gama de compostos, como aldeídos, cetonas e álcoois, muitos dos quais perceptíveis em concentrações extremamente baixas (ESKIN et al., 1977).

Várias tentativas para melhorar o sabor dos derivados protéicos de soja têm se concentrado em torno de métodos para a inibição ou inativação das lipoxigenases. Porém, esses métodos apresentam desvantagens e limitações. Além disso, na maioria dos casos os fatores externos que favorecem a hidroxidação enzimática de ácidos graxos insaturados não podem ser facilmente controlados (LIU, 1997). Assim, a obtenção de cultivares sem as isoenzimas lipoxigenases representa uma solução mais efetiva para reduzir o sabor indesejável associado a produtos protéicos de soja (KOBAYASHI et al.,

1995; NISHIBA et al., 1995; FURUTA et al., 1996; TORRES-PENARANDA et al., 1998).

Quanto à qualidade do óleo de soja, a principal meta dos programas de melhoramento genético tem sido o aumento de sua estabilidade oxidativa, pela redução do teor de ácido linolênico e pelo aumento do teor de ácido oléico. Segundo Araújo (2004), os ácidos graxos insaturados são oxidados a velocidades diferentes. O ácido linoléico é oxidado 64 vezes mais rápido do que o oléico e o linolênico, 100 vezes mais rápido do que este.

Recentemente, consumidores têm requerido alimentos saudáveis; assim, a peroxidação de lipídeos em alimentos que também leva a substâncias tóxicas e prejuízo nutricional deve ser evitada (NISHIBA et al., 1995). Alguns estudos apontam que os produtos da peroxidação de lipídeos podem estar envolvidos em várias doenças (HAUMANN, 1993).

A composição e a qualidade física, sanitária e nutricional do grão de soja dependem da genética da semente, das práticas culturais, das condições climáticas durante o desenvolvimento, colheita, recebimento e, também, do armazenamento (LAZZARI, 2000). Várias mudanças físicas, químicas e biológicas ocorrem em grãos durante o armazenamento, dependendo das condições e tempo de armazenamento e das condições dos grãos a serem armazenados (NARAYAN et al., 1988a). Quando essas mudanças físicas e químicas alcançam certo limite, elas causam a deterioração do grão, e a qualidade e a aceitação dos produtos obtidos a partir desses grãos são, conseqüentemente, afetadas (NARAYAN et al., 1988b). Fato importante a considerar é que, sendo a soja tradicionalmente cultivada em grandes extensões, ela requer colheita e debulha mecanizadas, ocasionando, freqüentemente, danos físicos ao grão (REZENDE et al., 1988).

As especificações para a padronização, classificação e comercialização da soja em grão são estabelecidas pela Portaria nº 262, de 23 de novembro de 1983, do Ministério da Agricultura, em vigor a partir de 1º de janeiro de 1984. A classificação que visa determinar a qualidade da soja em grão é feita conforme os seguintes limites máximos de tolerância: 14% de umidade, 30% de grãos quebrados, 1% de impurezas ou matérias estranhas, 8% de grãos avariados e 10% de grãos esverdeados. Para efeito dessa Portaria, consideram-se grãos quebrados os pedaços de grãos sadios,

inclusive cotilédones, que ficam retidos na peneira de crivos circulares de 3,0 mm de diâmetro (MAPA, 2005). É bom ressaltar que as empresas de recebimento e as indústrias de processamento de soja muitas vezes adotam padrões específicos de recebimento (LAZZARI, 1999).

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito das isoenzimas lipoxigenases e do teor de ácido linolênico na estabilidade oxidativa de grãos de soja, durante um período de oito meses de armazenamento sob duas temperaturas. Foram utilizados grãos de quatro genótipos de soja contrastantes quanto à presença ou ausência de lipoxigenases e ao teor de ácido linolênico normal ou reduzido. Uma vez que alta porcentagem de grãos quebrados é normalmente utilizada para fins industriais, os grãos foram armazenados nas formas de grãos inteiros e também de grãos quebrados. Como os efeitos de lipoxigenases e de teor de ácido linolênico estão sendo avaliados e as isoenzimas lipoxigenases atuam tanto sobre ácido linoléico quanto linolênico, na definição das metodologias a serem utilizadas optou-se por avaliar produtos de oxidação oriundos de rotas metabólicas distintas. Assim, as determinações dos teores de hexanal e do índice de TBA foram utilizadas para avaliar os efeitos de genótipo, forma dos grãos e temperatura de armazenamento.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado nos laboratórios do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG.

2.1. Material Genético

O material genético necessário à realização deste trabalho foi fornecido pelo Programa de Melhoramento da Qualidade da Soja do BIOAGRO/UFV. Os materiais em teste são linhagens derivadas do cruzamento entre a linhagem americana BARC-12 (que possui baixo teor de ácido linolênico, cerca de 3%) desenvolvida pelo USDA-ARS em Beltsville, Maryland, EUA, e a linhagem UFV TN (derivada de Doko RC, possuindo alelos nulos para as três isoenzimas lipoxigenases), obtida pelo citado programa de melhoramento. Foram utilizados quatro genótipos similares fenotipicamente, mas contrastantes quanto à presença ou ausência de LOX e ao teor normal ou reduzido de ácido linolênico, cultivados no Campo Experimental “Professor Diogo Alves de Mello”, em Viçosa, Minas Gerais, possuindo todos a mesma data de plantio (12/12/2001).

Inicialmente, a linhagem BARC-12 foi cruzada com a variedade comercial Doko RC, obtendo-se a geração F1. As plantas F1 foram autofecundadas, produzindo a geração F2. As sementes F2 foram submetidas

a microanálises não-destrutivas, que preservam seu poder de germinação, para determinação dos teores de ácido linolênico. As sementes que apresentaram baixo teor de ácido linolênico foram selecionadas e plantadas. As plantas F2 foram, então, retrocruzadas com a linhagem isogênica UFV TN. As sementes F1 desse primeiro retrocruzamento foram plantadas e autofecundadas, gerando as sementes F2, que foram submetidas a microanálises não-destrutivas para as determinações dos teores de ácido linolênico e presença ou ausência de LOX. As sementes F2 foram, então, reunidas em quatro grupos contrastantes, conforme mencionado anteriormente. Na geração seguinte de autofecundação foram feitas novas análises para confirmar o caráter homozigoto das plantas, tanto para teor normal e reduzido de ácido linolênico quanto para presença e ausência de LOX. As plantas que apresentaram segregação quanto a essas características foram descartadas. As sementes de cada grupo, a serem utilizadas neste trabalho, foram obtidas após seis gerações de autofecundações (RC1F7), quando se dispunha de quantidade suficiente de sementes.

2.2. Análises para Seleção dos Materiais Genéticos

Para cada grupo de linhagens pré-selecionadas foram plantadas, em campo, 75 fileiras de 5 m cada, sendo elas colhidas individualmente. Do material correspondente a cada fileira foram tomadas, aleatoriamente, 10 sementes para a realização de microanálises, visando à confirmação das características desejadas em cada grupo.

2.2.1. Testes Colorimétricos para a Detecção de Lipoxigenases

Para a detecção de lipoxigenases foram utilizados testes colorimétricos não-destrutivos, segundo metodologia proposta por Suda et al. (1995). Uma pequena porção dos cotilédones das sementes foi retirada, do lado oposto ao eixo embrionário, para a confirmação dos materiais com presença ou ausência de lipoxigenases. Esses testes se baseiam na capacidade de descoloração apresentada por essas enzimas, em presença de azul-de-metileno e β -caroteno.

2.2.2. Determinação de Ácidos Graxos

A separação e a identificação dos ácidos graxos (palmítico, esteárico, oléico, linoléico e linolênico) presentes na fração lipídica dos grãos de soja foram realizadas por cromatografia gasosa e a quantificação, realizada utilizando o método de normalização. Pequena porção da semente foi retirada do lado oposto ao eixo embrionário e triturada com o auxílio de uma lâmina. Em tubos de cultura, a 15 mg da amostra foi adicionado 1 mL de hexano, sendo a mistura mantida a 4 °C por cerca de 15 horas, sob atmosfera de N₂. Após esse tempo, a solução de lipídeos em hexano foi transferida para outros tubos e o solvente, evaporado por borbulhamento de N₂. Para a obtenção dos ésteres metílicos foi utilizada a metodologia descrita por Bubeck et al. (1989). À fração lipídica, adicionou-se 0,4 mL de metóxido de sódio 1 M, sendo os tubos mantidos em banho-maria a 30 °C, por uma hora. Foram, então, acrescentados 1 mL de água e 1 mL de hexano. Após uma hora, com o auxílio de uma pipeta, cerca de 0,75 mL da fase orgânica foi transferido para outros tubos, aos quais se adicionou sulfato de sódio anidro. Finalmente, 1 µL da fase orgânica foi injetado em coluna Carbowax (30 m x 0,32 mm x 0,25 µm), utilizando-se a técnica de injeção com divisão de fluxo, na proporção de 1:10. Foi utilizado um cromatógrafo a gás GC-17A, equipado com auto-injetor AOC-17, marca SHIMADZU. As condições de temperatura empregadas foram: da coluna, igual a 215 °C; do injetor, 240 °C; e do detector de ionização de chama, 280 °C. O gás de arraste foi o nitrogênio, com um fluxo de 1,2 mL/min, sendo todo o processo controlado por um microcomputador equipado com software Class GC10V2-01 para Windows 95, acoplado ao sistema.

2.3. Caracterização Bioquímica dos Grãos

2.3.1. Determinação de Umidade

O teor de umidade dos grãos moídos foi determinado em estufa a 105 °C, de acordo com Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

2.3.2. Determinação de Proteínas

A determinação de proteínas foi realizada segundo o método de Kjeldahl, para a quantificação de nitrogênio total descrito pela Association of Official Analytical Chemists - AOAC (1975), com modificações. Na fase de digestão, após obtenção do material aparentemente digerido, adicionou-se peróxido de hidrogênio a 30%, levando a mistura ao aquecimento por mais 30 minutos. Na fase de destilação, a amônia liberada foi recolhida em solução de ácido bórico 4%. O fator 6,25 foi utilizado para a conversão de nitrogênio em proteína.

2.3.3. Determinação de Lipídeos

Determinou-se o teor de lipídeos em aparelho extrator de Soxhlet, utilizando benzina de petróleo como solvente, segundo o procedimento descrito em Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985), com refluxo por 15 horas.

2.3.4. Determinação de Cinzas

A determinação do conteúdo de cinzas foi conduzida por meio da calcinação das amostras a 550 °C, conforme o método descrito em Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

2.3.5. Determinação de Carboidratos Totais

O teor de carboidratos foi obtido por diferença percentual.

2.3.6. Análise Eletroforética de Proteínas

As proteínas de cada genótipo de soja foram extraídas de 10 mg de grãos moídos, com 1,0 mL de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, contendo SDS 0,2%, β -mercaptoetanol 10 mM e uréia 6 M. A extração foi realizada à temperatura ambiente utilizando-se gral e pistilo e o extrato, centrifugado a 16.100 g por 15 min. Ao sobrenadante foi adicionada uma gota de azul-de-bromofenol, sendo este submetido a um tratamento térmico a 100 °C, por 3 min. Alíquotas de 20 μ L foram, então, aplicadas em gel de poliacrilamida, preparado conforme descreveram Fontes et al. (1984). O gel de separação foi formado por um gradiente linear de concentração de 10 a 18% de

poliacrilamida, contendo Tris-HCl 0,38 M, uréia 1,5 M e SDS 0,08%, pH 8,8. O gel empilhador foi obtido na concentração de 6% de poliacrilamida contendo Tris-HCl 0,44 M, uréia 2,75 M e SDS 0,09%, pH 8,8. A eletroforese foi conduzida à temperatura ambiente durante sete horas, à voltagem inicial de 70 V, passando para 100 V após uma hora. Os polipeptídeos separados foram revelados em solução de “Coomassie Brilliant Blue” R-250 a 0,15%, em metanol/ácido acético/água (45:9:46 v/v/v) e o gel, descolorido em metanol/ácido acético/água (25:7,5:67,5 v/v/v).

2.4. Armazenamento dos Grãos de Soja

Primeiramente, os grãos de soja, dos quatro materiais genéticos em estudo, foram submetidos a uma seleção manual para remoção de todo o material estranho, bem como grãos malformados ou apresentando dano físico. Acondicionados em sacos de ráfia, os grãos foram mantidos em câmara fria, com umidade relativa controlada até atingirem um teor de umidade entre 12 e 13%. Cada material genético foi armazenado na forma de grãos inteiros e também de grãos quebrados. Para a obtenção dos grãos quebrados, utilizou-se um moinho de discos, marca ARBEL, regulado para realizar apenas a quebra dos grãos. O material foi, então, submetido a uma peneiragem, utilizando-se uma peneira de crivos circulares de 3 mm de diâmetro, sendo armazenada a porção de grãos quebrados retida na peneira. As amostras, compostas por 600 g de grãos, foram acondicionadas em potes de polipropileno fechados por um filme de PVC (policloreto de vinila), por ser esse um filme com permeabilidade seletiva, possuindo boas propriedades de barreira ao vapor d'água e relativamente altas taxas de permeabilidade ao O₂ e ao CO₂. O efeito do armazenamento sobre a qualidade dos grãos inteiros e quebrados foi avaliado sob duas condições de temperatura, 25 e 35 °C, por um período de oito meses. As avaliações foram realizadas no início do armazenamento e após dois, quatro, seis e oito meses, num total de 216 unidades experimentais.

2.5. Avaliação da Qualidade dos Grãos Armazenados

2.5.1. Determinação de Ácidos Graxos

Para esta determinação, amostras de 10 g de grãos de soja foram moídas, por 2 min, em moinho tipo Willey, marca TECNAL. O preparo da amostra e, também, a separação, a identificação e a quantificação dos ácidos graxos (palmítico, esteárico, oléico, linoléico e linolênico) presentes na fração lipídica dos grãos foram realizados conforme descrito no item 2.2.2.

2.5.2. Determinação do Conteúdo de Hexanal

Os teores de hexanal foram determinados por cromatografia gasosa, pela técnica de "head space", conforme descrito por Utumi et al. (1998). Foi utilizado um cromatógrafo SHIMADZU, modelo GC-14B, equipado com "head space" e amostrador automático ("head space sampler"), modelo HSS-2B. As amostras foram moídas, e alíquotas de 0,5 g de grãos moídos foram pesadas em frascos tipo penicilina e congeladas. No momento da análise, foram adicionados 2 mL de tampão fosfato de sódio 0,5 M, pH 7,0, sendo o frasco hermeticamente fechado com septo de silicone coberto com teflon e lacre de alumínio e levado ao cromatógrafo, permanecendo acondicionado por 20 minutos a 40 °C.

Dos gases liberados, 0,8 mL foi injetado automaticamente em uma coluna Carbowax (25 m x 0,53 mm x 2 µm) utilizando a técnica de injeção com divisão de fluxo, na proporção de 1:2. O gás de arraste utilizado foi o nitrogênio, a um fluxo de 6,2 mL/min. As análises foram realizadas nas seguintes condições: temperatura inicial da coluna de 45 °C, programada para elevar-se a 7 °C por minuto até 70 °C, temperatura essa mantida por cinco minutos, e, em seguida, elevar-se a 15 °C por minuto até atingir 200 °C. As temperaturas do injetor e detector de ionização de chama foram de 200 e 250 °C, respectivamente. A quantificação foi realizada utilizando o método de padronização externa, segundo o procedimento adaptado a partir da metodologia descrita por Snyder et al. (1991). Diferentes volumes de uma solução de hexanal em tetradecano (1,6 mg/mL) foram adicionados aos frascos de análise contendo 0,5 g de ácido silícico, sendo o volume completado para 2 mL com tampão fosfato de sódio 0,5 M, pH 7,0. Após o preparo, cada frasco foi

imediatamente lacrado e levado ao cromatógrafo para análise. Foi, então, obtida a curva analítica, com um coeficiente de correlação igual a 0,9986. Todo o processo foi controlado por um microcomputador, equipado com software GC-10 para Windows 95, acoplado ao sistema.

2.5.3. Determinação do Índice de TBA (Ácido 2-Tiobarbitúrico)

Para a determinação do índice de TBA, adotou-se o método de destilação, conforme descrito por Tarladgis et al. (1960) e adaptado por Davies et al. (1987). Aos 5 g de amostra moída foram adicionados 50 mL de água Milli-Q e 150 μ L de uma solução de BHT (butil hidroxitolueno) a 15% em álcool etílico, procedendo-se à homogeneização por 4 min, com um homogeneizador BRINKMANN, a baixa velocidade. Em seguida, a mistura foi acidificada para pH 1,1 a 1,2 pela adição de HCl 4 M e transferida, quantitativamente, para um balão de 250 mL, de fundo redondo, contendo pedaços de porcelana. À mistura foram adicionados 0,5 mL de antiespumante A concentrado (Sigma) e água Milli-Q até um volume final de 100 mL. O balão foi conectado a um coletor de destilação de Barret, e, com o uso de uma manta de aquecimento, a mistura foi destilada até que fossem recolhidos os primeiros 50 mL do destilado, em um período de 11 minutos.

Desse destilado foram retiradas alíquotas de 5 mL, para reagirem com 5 mL da solução de TBA 0,02 M em água, deixando ocorrer o desenvolvimento de cor em banho-maria em ebulição por 35 minutos. Após o resfriamento, foram realizadas as leituras de absorbância, contra um branco, a 530 nm, em espectrofotômetro DU[®]-65, BECKMAN. Finalmente, o índice de TBA foi calculado por meio da conversão das leituras de absorbância a 530 nm em miligrama de malonaldeído por 1.000 g de amostra. Para isso, foi construída uma curva analítica, também pelo método de destilação, fazendo-se diluições de uma solução de 1,1,3,3-tetrametoxipropano 1×10^{-3} M, de modo a obter, por hidrólise ácida, quantidades variando de 0,036 a 5,76 μ g de malonaldeído em 5 mL de solução, que foram combinados com 5 mL da solução de TBA 0,02 M. Foi, então, obtida a curva analítica, com um coeficiente de correlação igual a 0,9998.

2.6. Análise Estatística

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em um modelo de parcela subdividida, com três repetições. Foram utilizados quatro genótipos de soja, sob as formas de grãos inteiros e grãos quebrados, mantidos sob duas temperaturas (25 e 35 °C) e avaliados no início do armazenamento e após dois, quatro, seis e oito meses. Os genótipos, as formas dos grãos e as temperaturas de armazenamento foram alocados em arranjo fatorial na parcela e os períodos de armazenamento, nas subparcelas. Avaliaram-se estatisticamente os dados experimentais, utilizando os procedimentos do Sistema SAS (Statistical Analysis System), licenciado para a UFV em 2005.

Nas avaliações para a caracterização bioquímica dos quatro genótipos em estudo, seguiu-se um delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. Procedeu-se à comparação das médias pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. Para a análise estatística dos dados experimentais, utilizou-se o programa SAEG – Sistema para análise estatística e genética (RIBEIRO JR., 2001).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização do Material Genético

Na Figura 1 é apresentado o eletroferograma dos polipeptídeos componentes da proteína total extraída de grãos dos quatro genótipos de soja em estudo, separados em gel de poliacrilamida contendo SDS. Na parte superior do gel, observou-se que os perfis eletroforéticos 1 e 3 apresentam ausência de lipoxigenases, e os genótipos a eles correspondentes serão referidos como LOX⁻. Em contraste, os genótipos correspondentes aos perfis 2 e 4, em que as isoenzimas lipoxigenases estão presentes, serão referidos como genótipos LOX⁺. A mesma intensidade da banda de lipoxigenases, observada visualmente para esses genótipos, indica a presença das três isoenzimas (LOX1, LOX2 e LOX3), o que foi confirmado ao se determinar a atividade de LOX1, LOX3 e LOX2+3.

O perfil eletroforético em relação às proteínas de reserva foi, entretanto, o mesmo para os quatro genótipos. Os polipeptídios foram identificados em comparação com os resultados obtidos por Fontes et al. (1984) e Moraes (2003). Citados em ordem crescente de mobilidade no gel, apresentam-se os polipeptídios α' , α e β , componentes da β -conglucina, principal globulina 7S. Composto a globulina 11S ou glicinina, têm-se os polipeptídios ácidos A₃, A₄ e uma banda eletroforética correspondente a A_{1a},

A_{1b} e A₂; e, finalmente, resolvidos em uma só banda, os polipeptídeos básicos B_{1a}, B_{1b}, B₂, B₃ e B₄.

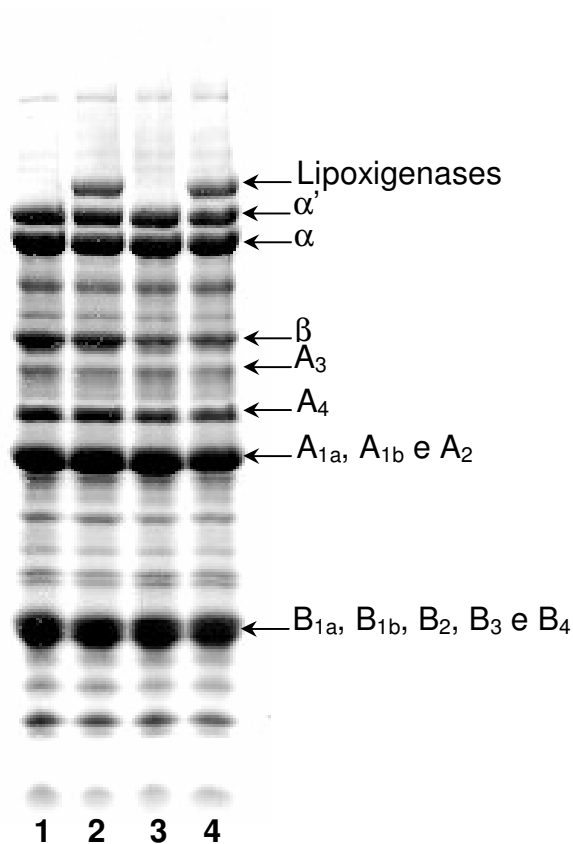


Figura 1 - Eletroferograma dos polipeptídios componentes da proteína total extraída de grãos de quatro genótipos de soja contrastantes quanto à presença ou ausência de lipoxigenases (LOX⁺ ou LOX⁻) e quanto ao teor de ácido linolênico normal (LNN^N) ou reduzido (LNN^R): **1** - LOX⁻ LNN^R, **2** - LOX⁺ LNN^N, **3** - LOX⁻ LNN^N e **4** - LOX⁺ LNN^R. Foram aplicados 20 μ L do extrato protéico em gel de poliacrilamida formado por um gradiente linear de concentração de 10 a 18%, contendo Tris-HCl 0,38 M, uréia 1,5 M e SDS 0,08%, pH 8,8. A eletroforese foi conduzida à temperatura ambiente durante sete horas, à voltagem inicial de 70 V, passando para 100 V após uma hora.

Na Tabela 1 são apresentados os teores médios (expressos em porcentagem relativa) dos principais ácidos graxos componentes da fração lipídica dos grãos de soja. Esses resultados confirmam o contraste entre os genótipos também em relação ao teor de ácido linolênico. Como esperado, dois genótipos apresentaram teores de ácido linolênico reduzidos (LNN^R), 3,47 e 3,49%, não diferindo estatisticamente entre si ($P>0,05$). Os outros dois genótipos apresentaram teor de ácido linolênico normal (LNN^N), ou seja, 7,64 e 8,53%, apesar de serem significativamente diferentes ($P<0,05$). Os teores dos demais ácidos graxos variaram da seguinte forma: ácido palmítico, de 10,79 a 12,03%; esteárico, de 3,50 a 3,93%; oléico, de 20,12 a 26,84%; e linoléico, de 51,19 a 57,30%. À exceção do teor reduzido de ácido linolênico de cerca de 3,5%, característica confirmada nas várias gerações de autofecundação, os teores observados dos demais ácidos graxos são considerados normais.

Tabela 1 - Teores de ácidos graxos (% relativa) na fração lipídica dos grãos de soja¹

Ácido Graxo (%)	Genótipo ²			
	LOX ⁻ LNN ^R	LOX ⁻ LNN ^N	LOX ⁺ LNN ^R	LOX ⁺ LNN ^N
Palmítico	12,03 ± 0,04 A	10,79 ± 0,33 C	11,25 ± 0,08 BC	11,75 ± 0,45 AB
Esteárico	3,50 ± 0,07 B	3,54 ± 0,10 B	3,93 ± 0,08 A	3,57 ± 0,09 B
Oléico	23,70 ± 0,68 B	26,84 ± 0,91 A	24,52 ± 0,50 B	20,12 ± 0,53 C
Linoléico	57,30 ± 0,64 A	51,19 ± 0,65 C	57,04 ± 0,17 A	56,03 ± 0,46 B
Linolênico	3,47 ± 0,05 C	7,64 ± 0,14 B	3,49 ± 0,19 C	8,53 ± 0,17 A

¹ Os resultados constituem médias de três repetições ± desvio-padrão. As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, na horizontal, não diferem entre si, pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade ($P>0,05$).

² Quatro genótipos de soja contrastantes quanto à presença ou ausência de lipoxigenases (LOX⁺ ou LOX⁻) e quanto ao teor de ácido linolênico normal (LNN^N) ou reduzido (LNN^R).

A resolução RDC Nº 482, de 23 de setembro de 1999, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, aprovou o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Óleos e Gorduras Vegetais. Conforme é descrito no anexo 7 dessa resolução, os teores dos ácidos graxos componentes do óleo de soja são: ácidos graxos com menos de 14 carbonos na cadeia, menos de 0,1%; ácido mirístico, menos de 0,5%; ácido palmítico, de 7,0 a 14%; ácido palmitoléico, menos de 0,5%; ácido esteárico, de 1,4 a 5,5%; ácido oléico, de 19,0 a 30,0%; ácido linoléico, de 44,0 a 62,0%; ácido linolênico, de 4,0 a 11,0%; ácido araquídico, menos de 1,0%; ácido eicosenóico, menos de 1,0%; e ácido behênico, menos de 0,5% (ANVISA, 2005).

Visentainer et al. (1991), ao analisarem 28 variedades de soja recomendadas para cultivo no Brasil (ano agrícola 1985/1986), encontraram grande variação nos teores de ácidos graxos. O teor de ácido palmítico variou de 9,63 a 13,09%; esteárico, de 2,69 a 4,40%; oléico, de 19,63 a 36,58%; linoléico, de 42,61 a 58,16%; e linolênico, de 5,66 a 8,58%.

É bom ressaltar que os materiais em estudo tiveram a mesma data de plantio e foram cultivados no mesmo local, pois segundo Hammond e Fehr (1984), além das diferenças genéticas, os teores de ácidos graxos sofrem efeito ambiental. É observada uma relação entre o aumento na quantidade de ácidos graxos poliinsaturados e o decréscimo da temperatura, isto é, o número de insaturações aumenta tanto nos ácidos graxos constituintes dos lipídeos de membrana quanto nos de reserva quando há diminuição da temperatura. Ácidos graxos insaturados possuem temperatura de fusão mais baixa do que os ácidos graxos saturados e, assim, podem conferir maior fluidez à membrana, proporcionando a manutenção de seu funcionamento, sob condições de baixa temperatura. O mesmo raciocínio é válido para os triacilgliceróis, ou seja, alto conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados, em baixa temperatura, proporciona uma consistência líquida ao óleo presente dentro dos corpos lipídicos (HEPPARD et al., 1996). Além da variação associada a diferentes locais de produção, há variação na composição de ácidos graxos entre sementes de uma mesma planta e entre plantas de um mesmo genótipo (HAMMOND e FEHR, 1984).

Os valores percentuais médios dos teores de proteínas, lipídeos, carboidratos e cinzas dos quatro genótipos de soja que contêm as

características em estudo são mostrados na Tabela 2. Comparando os genótipos, observou-se que, além da presença ou não de lipoxigenases e dos distintos teores de ácido linolênico, os teores, sejam de proteínas, lipídeos, carboidratos ou cinzas apresentam-se diferentes. As variações observadas, entre os genótipos, foram de 37,46 a 41,05%, 20,14 a 22,92%, 5,39 a 5,78% e 31,60 a 34,21%, nos teores de proteínas, lipídeos, cinzas e carboidratos, respectivamente. Isso demonstra que os materiais genéticos utilizados não podem ser considerados linhas isogênicas, mas sim aparentadas, pois foram obtidas de um retrocruzamento e selecionadas fenotipicamente para ciclo, altura e composição. Apesar dessas diferenças, os materiais em estudo possuem teores normais desses constituintes.

Tabela 2 - Composição química média (%) dos grãos de soja¹

Determinações (%)	Genótipo ²			
	LOX ⁻ LNN ^R	LOX ⁻ LNN ^N	LOX ⁺ LNN ^R	LOX ⁺ LNN ^N
Proteína	40,53 ± 0,38 A	37,94 ± 0,44 B	37,46 ± 0,43 B	41,05 ± 0,78 A
Lipídeo	22,09 ± 0,02 A	22,63 ± 0,36 A	22,92 ± 0,22 A	20,14 ± 0,97 B
Cinzas	5,78 ± 0,02 A	5,39 ± 0,00 C	5,41 ± 0,05 C	5,68 ± 0,02 B
Carboidrato	31,60 ± 0,40 C	34,04 ± 0,21 A	34,21 ± 0,31 A	33,14 ± 0,19 B

¹ Os resultados, em base seca, constituem médias de três repetições ± desvio-padrão. As médias seguidas pela mesma letra, na horizontal, não diferem entre si, pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade (P>0,05).

² Quatro genótipos de soja contrastantes quanto à presença ou ausência de lipoxigenases (LOX⁺ ou LOX⁻) e quanto ao teor de ácido linolênico normal (LNN^N) ou reduzido (LNN^R).

Em média, óleo e proteína constituem cerca de 60% da matéria seca de grãos de soja; proteína, em torno de 40%; e óleo, 20%. A matéria seca restante é composta principalmente de carboidratos (cerca de 35%) e cinzas (cerca de 5%). A composição do grão depende de muitos fatores, dentre eles a variedade, a época de desenvolvimento, a localização geográfica e o estresse

ambiental (LIU, 1997). Liu et al. (1995) relataram que entre os 10 genótipos de soja selecionados, cultivados em Arkansas (EUA), em base seca, proteína variou de 39,5 a 50,2%, óleo variou de 16,3 a 21,6% e proteína e óleo juntos variaram de 59,7 a 67,5%.

3.2. Avaliação da Qualidade dos Grãos Armazenados

3.2.1. Composição em Ácidos Graxos

Nas Figuras 2 a 6, são apresentados os teores dos ácidos graxos palmítico, esteárico, oléico, linoléico e linolênico, respectivamente. Os teores desses ácidos graxos foram determinados a cada dois meses, em grãos de soja dos genótipos LOX⁻LNN^R, LOX⁻LNN^N, LOX⁺LNN^R e LOX⁺LNN^N, armazenados durante oito meses, nas formas de grãos inteiros e quebrados, a 25 e 35 °C.

Os genótipos apresentaram diferenças significativas quanto aos teores de ácidos graxos, sendo o efeito do tempo de armazenamento sobre esses teores também significativo. O efeito de forma e temperatura foi não-significativo quanto aos teores de ácidos graxos, à exceção do ácido esteárico (Tabela 3). Os efeitos das interações do arranjo fatorial na parcela foram não-significativos e, portanto, agrupados com o resíduo da parcela.

A tendência apresentada para o teor de ácido palmítico dos diferentes genótipos, nas duas temperaturas, estando o grão na forma inteira ou quebrada, foi a de ligeiro aumento após o sexto mês de armazenamento (Figura 2). A variação nos teores de ácido esteárico, porém, não apresentou comportamento definido ao longo do tempo nos quatro genótipos, tanto na forma de grão inteiro quanto quebrado, nas duas condições de temperatura (Figura 3). Com relação aos ácidos graxos insaturados, apesar de apresentarem pequenas oscilações no decorrer do período de armazenamento, foi observada uma ligeira tendência de aumento para o ácido oléico (Figura 4) e de redução para os teores dos ácidos linoléico (Figura 5) e linolênico (Figura 6), considerando-se todos os genótipos em estudo, nas duas formas e nas duas temperaturas.

Tabela 3 - Resumo das análises de variância dos dados obtidos nas determinações dos teores de ácidos graxos, teor de hexanal e índice de TBA de quatro genótipos de soja contrastantes quanto à presença ou ausência de lipoxigenases e quanto ao teor de ácido linolênico normal ou reduzido, submetidos ao armazenamento nas formas de grãos inteiros e quebrados, sob duas temperaturas e avaliados em cinco tempos

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Quadrados Médios						
		Teor de Ácidos Graxos					Teor de Hexanal	Índice de TBA
		Palmítico	Estearico	Oléico	Linoléico	Linolênico		
Genótipo (GEN)	3	15,9049**	1,8400**	421,4310**	439,1868**	392,7653**	154,7111**	74,5344**
Forma (FOR)	1	0,0395 ^{ns}	0,4282**	0,2600 ^{ns}	0,3504 ^{ns}	0,0398 ^{ns}	7,7078**	0,0146 ^{ns}
Temperatura (TPR)	1	0,0046 ^{ns}	0,1741*	0,3405 ^{ns}	0,3032 ^{ns}	0,0130 ^{ns}	10,8588**	0,1029*
Erro (a)	42	0,1572	0,0288	0,7768	0,3382	0,0501	0,6476	0,0170
Tempo (TPO)	4	1,0261**	0,3286**	3,5838**	4,1199**	1,3028**	6,8448**	0,3203**
Interação GEN*TPO	12	0,0264*	0,0283**	0,3046 ^{ns}	0,1335 ^{ns}	0,0966**	2,9492**	0,0640**
Interação FOR*TPO	4	0,0438**	0,4630**	0,8351*	0,4932**	0,2695**	0,4529**	0,0312*
Interação TPR*TPO	4	0,0091 ^{ns}	0,1407**	0,4682 ^{ns}	0,3247*	0,0740*	0,7126**	0,0119 ^{ns}
Erro (b)	168	0,0124	0,0105	0,2573	0,1219	0,0222	0,0630	0,0124
Média		11,53	3,67	24,07	55,25	5,47	2,30	1,29
CV a (%)		3,44	4,62	3,66	1,05	4,09	34,97	10,08
CV b (%)		0,97	2,79	2,11	0,63	2,72	10,91	8,61

^{ns} Não-significativo e ** e * significativos a 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

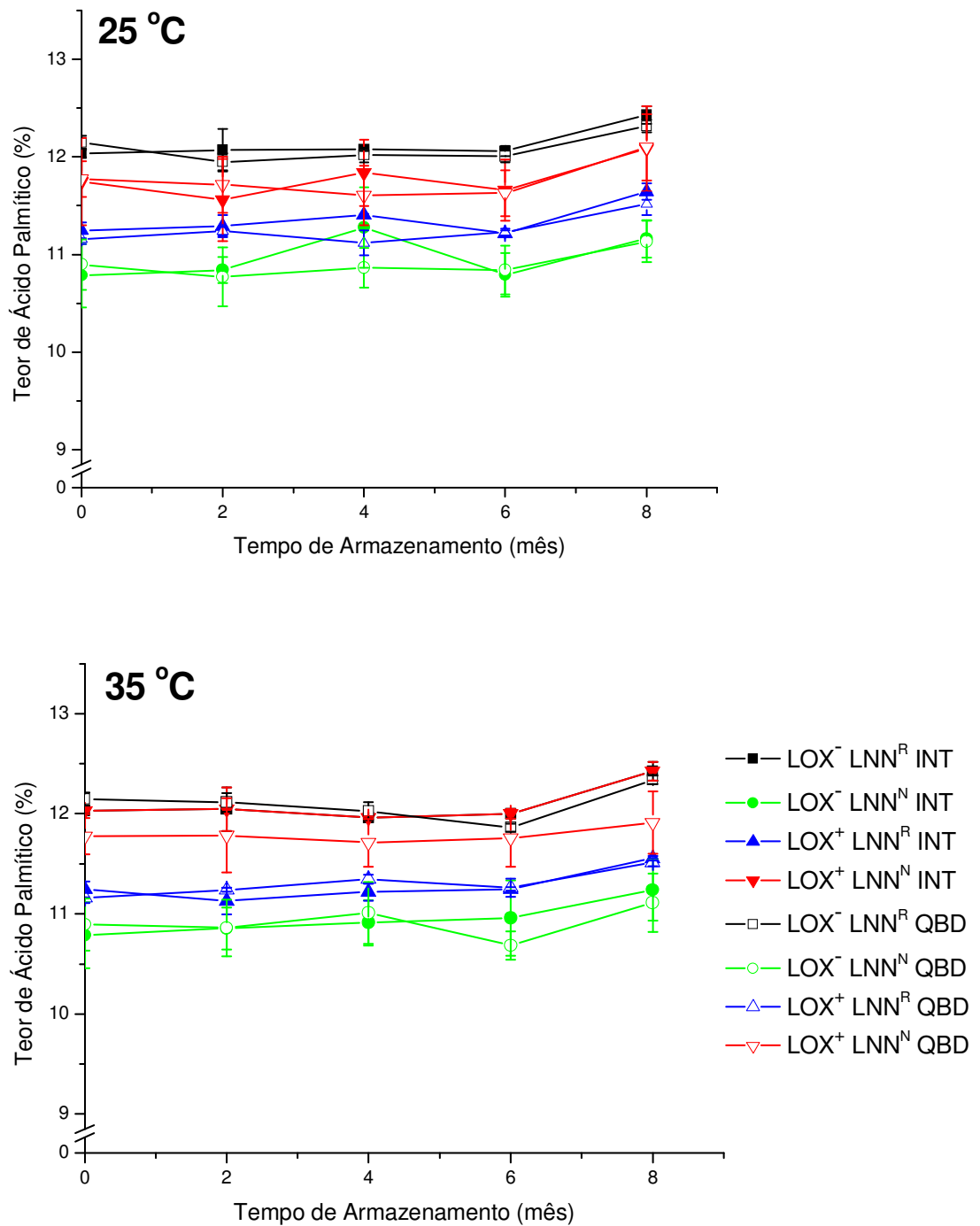


Figura 2 - Teores de ácido palmítico na fração lipídica de grãos de quatro genótipos de soja contrastantes quanto à presença ou ausência de lipoxigenases (LOX⁺ ou LOX⁻) e quanto ao teor de ácido linolênico normal (LNN^N) ou reduzido (LNN^R), armazenados a 25 e 35 °C, nas formas de grãos inteiros (INT) e de grãos quebrados (QBD). Os resultados constituem médias de três repetições \pm desvio-padrão.

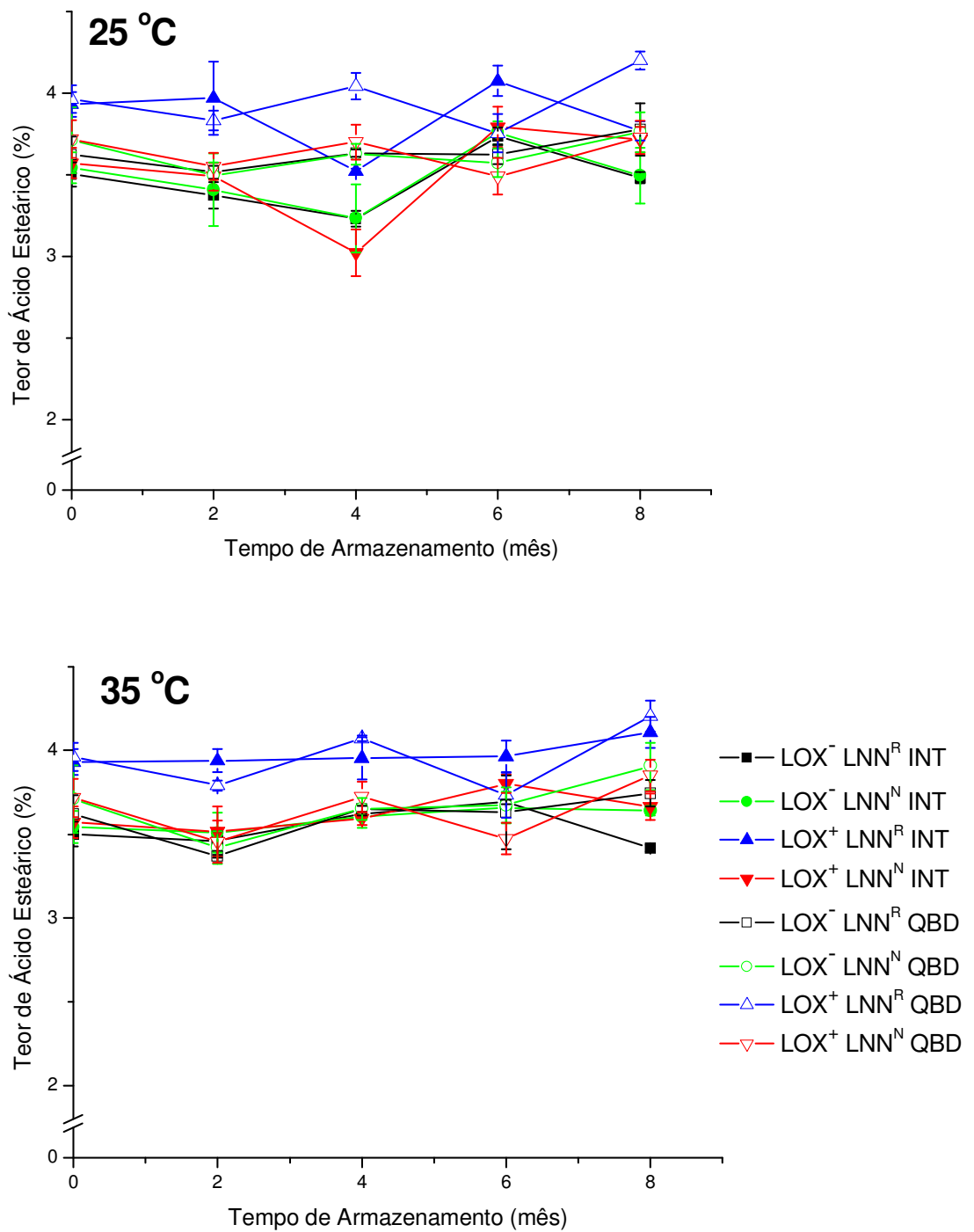


Figura 3 - Teores de ácido esteárico na fração lipídica de grãos de quatro genótipos de soja contrastantes quanto à presença ou ausência de lipoxigenases (LOX⁺ ou LOX⁻) e quanto ao teor de ácido linolênico normal (LNN^N) ou reduzido (LNN^R), armazenados a 25 e 35 °C, nas formas de grãos inteiros (INT) e de grãos quebrados (QBD). Os resultados constituem médias de três repetições ± desvio-padrão.

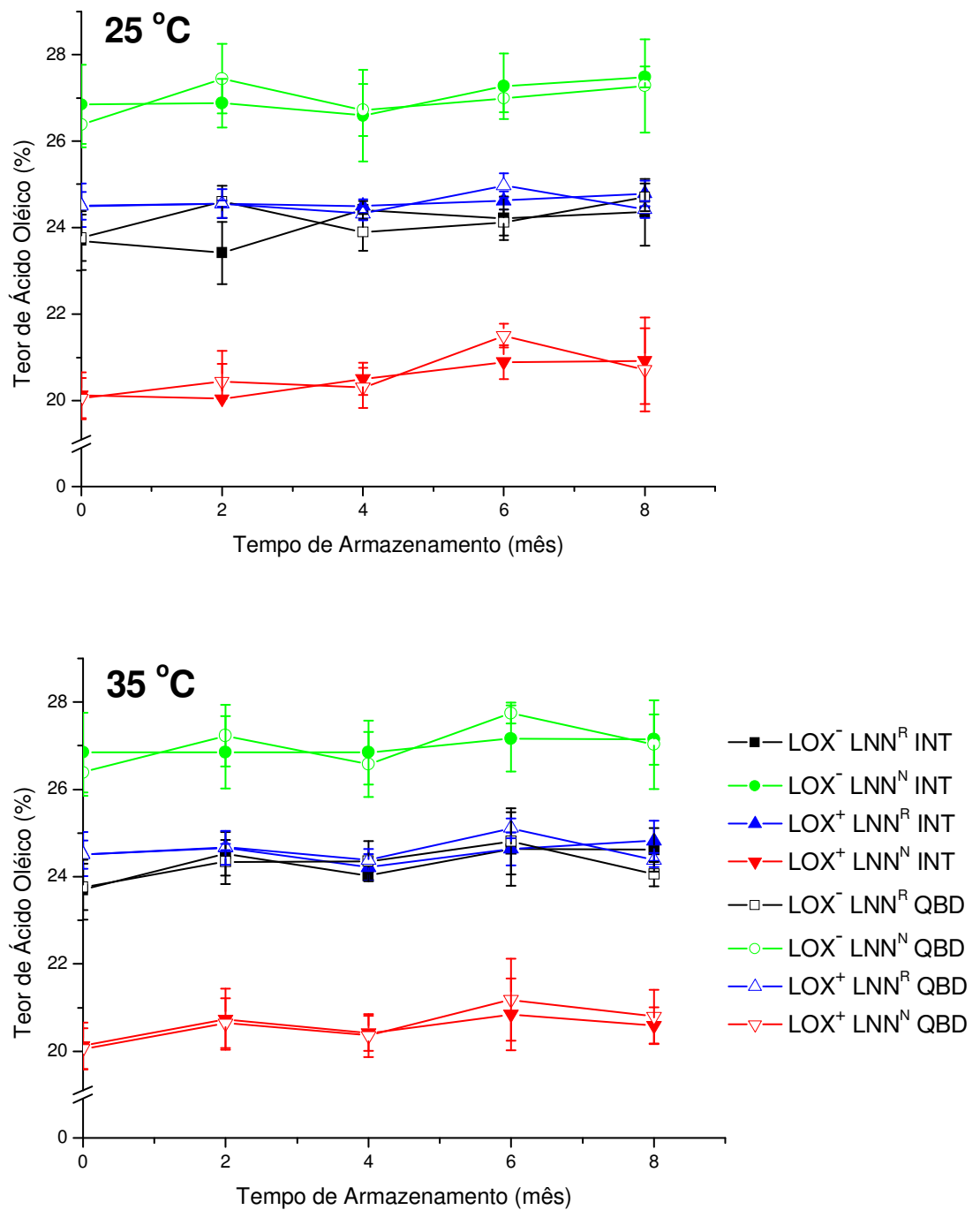


Figura 4 - Teores de ácido oléico na fração lipídica de grãos de quatro genótipos de soja contrastantes quanto à presença ou ausência de lipoxigenases (LOX⁺ ou LOX⁻) e quanto ao teor de ácido linolênico normal (LNN^N) ou reduzido (LNN^R), armazenados a 25 e 35 °C, nas formas de grãos inteiros (INT) e de grãos quebrados (QBD). Os resultados constituem médias de três repetições \pm desvio-padrão.

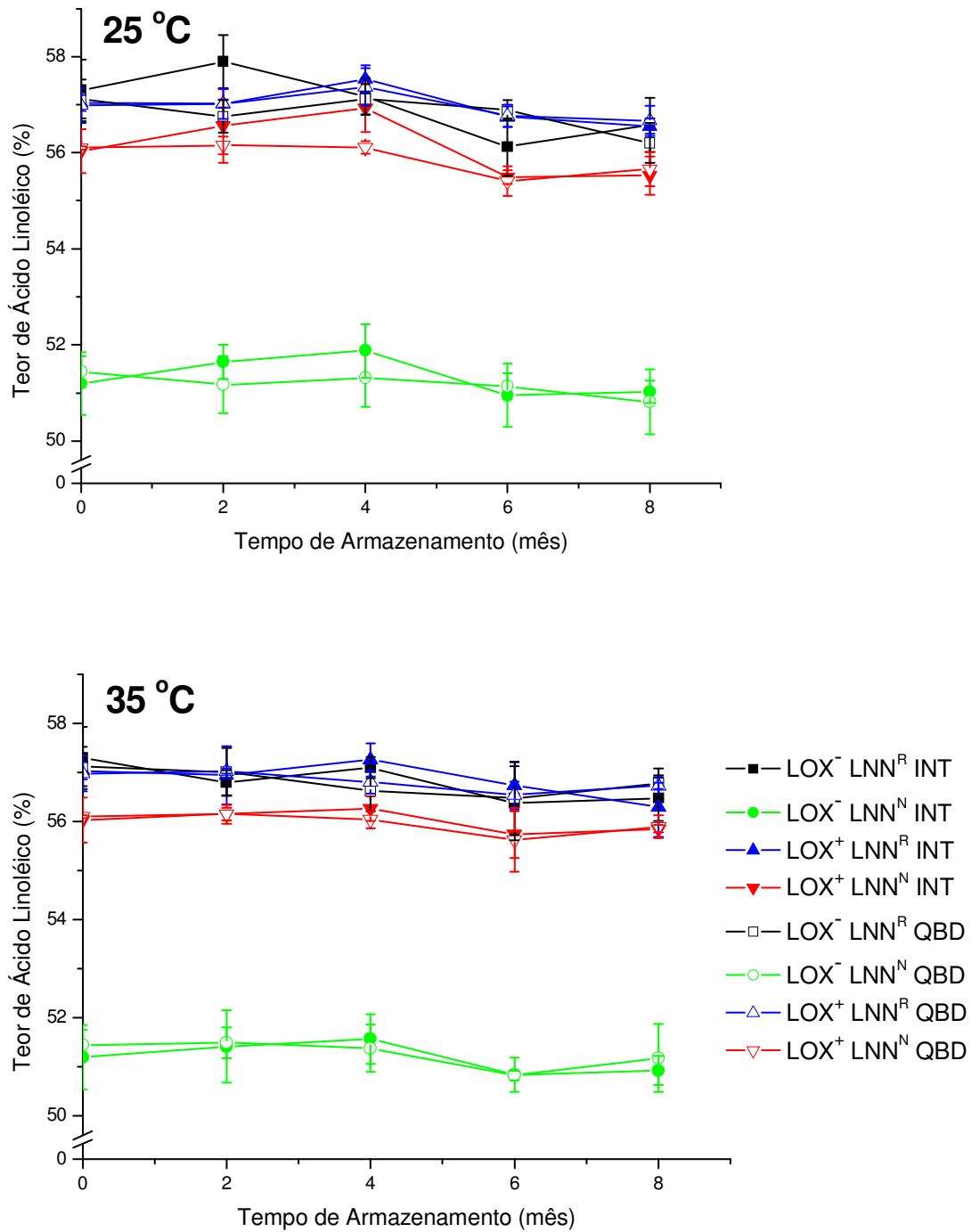


Figura 5 - Teores de ácido linoléico na fração lipídica de grãos de quatro genótipos de soja contrastantes quanto à presença ou ausência de lipoxigenases (LOX⁺ ou LOX⁻) e quanto ao teor de ácido linolênico normal (LNN^N) ou reduzido (LNN^R), armazenados a 25 e 35 °C, nas formas de grãos inteiros (INT) e de grãos quebrados (QBD). Os resultados constituem médias de três repetições \pm desvio-padrão.

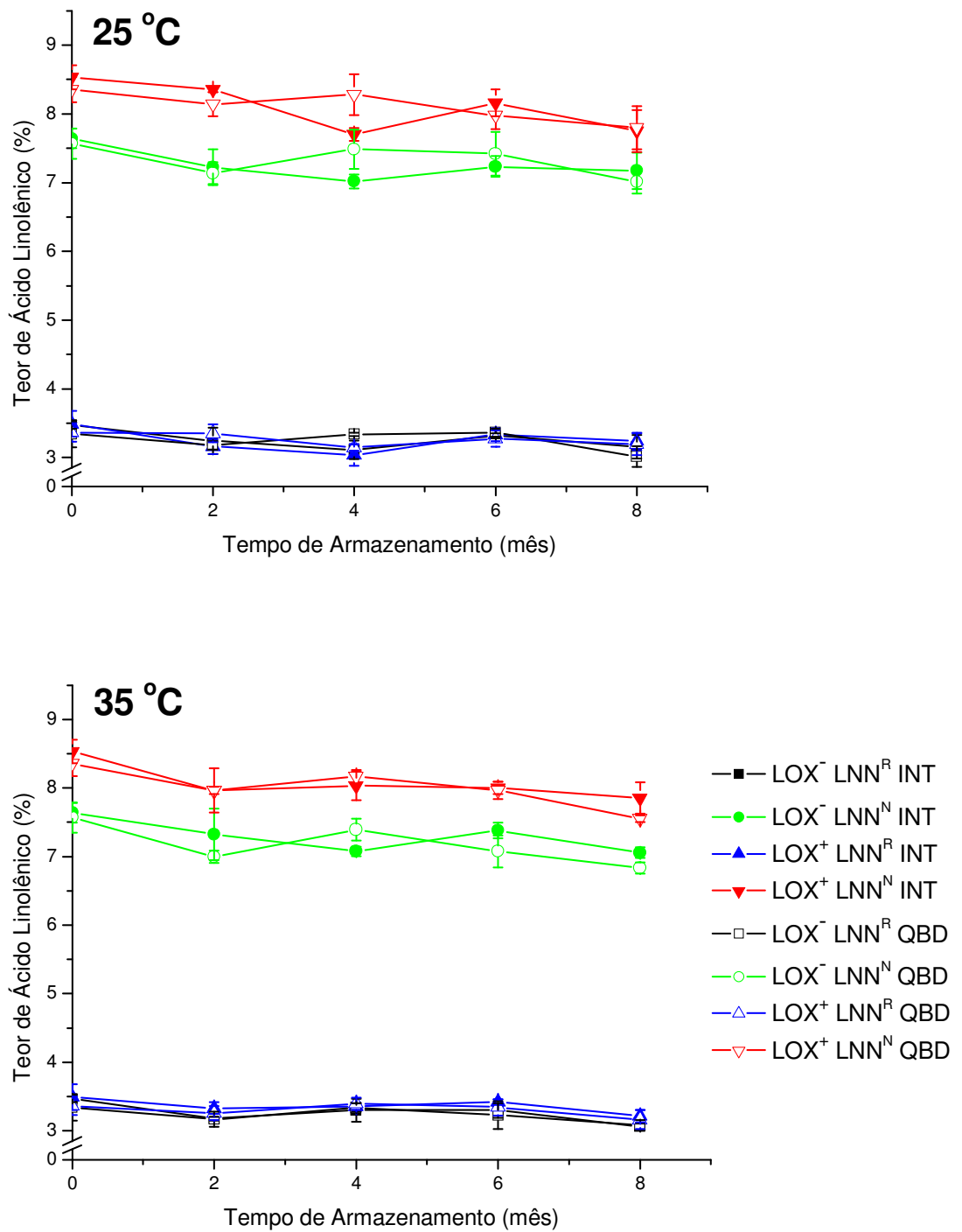


Figura 6 - Teores de ácido linolênico na fração lipídica de grãos de quatro genótipos de soja contrastantes quanto à presença ou ausência de lipoxigenases (LOX⁺ ou LOX⁻) e quanto ao teor de ácido linolênico normal (LNN^N) ou reduzido (LNN^R), armazenados a 25 e 35 °C, nas formas de grãos inteiros (INT) e de grãos quebrados (QBD). Os resultados constituem médias de três repetições \pm desvio-padrão.

O período de armazenamento considerado neste estudo e definido com base no tempo médio de armazenamento de grãos de soja, não foi suficiente para que as alterações nos teores de ácidos graxos apresentassem tendência definida, mesmo no caso de grãos quebrados. Durante o armazenamento, os lipídeos são hidrolisados pelas lípases em ácidos graxos livres e glicerol, principalmente quando a temperatura e o conteúdo de umidade são elevados. As alterações deteriorativas nos lipídeos dos grãos podem também ser oxidativas, resultando em odor e sabor de ranço, sendo que a rancidez assume maior importância em produtos moídos armazenados, uma vez que em grãos intactos os lipídeos estão “protegidos” da oxidação (ATHIÉ et al., 1998).

Priestley e Leopold (1983), ao avaliarem as alterações nos lipídeos de sementes de soja armazenadas com 8 - 10% de umidade (base úmida), a 4 °C, por 44 meses, observaram alteração gradual na proporção de ácidos graxos, com redução dos poliinsaturados e aumento dos ácidos saturados e do monoinsaturado. Essas alterações não eram ainda detectáveis após 18 meses de armazenamento. A diminuição no vigor e na viabilidade observada após 24 meses foi associada com o decréscimo na proporção de ácidos graxos poliinsaturados. O mesmo comportamento foi observado por Narayan et al. (1988a) ao analisarem grãos de soja armazenados em condições ambientais (temperatura variando de 16 a 40 °C e umidade relativa de 50 a 90%) por um, dois, três e nove anos. Os teores relativos dos ácidos palmítico, esteárico e oléico aumentaram, enquanto os teores dos ácidos linoléico e linolênico diminuíram, sendo essa diminuição atribuída à deterioração oxidativa durante o armazenamento. Porém, os resultados iniciais apresentados referiam-se a grãos submetidos a um ano de armazenamento, não sendo feitas referências a alterações que possam ter ocorrido nesse período.

As oscilações apresentadas nos teores médios dos ácidos graxos, no decorrer do armazenamento, podem ser consideradas previsíveis, uma vez que, segundo Hammond e Fehr (1984), a variação na composição de ácidos graxos ocorre entre sementes de uma mesma planta e entre plantas de um mesmo genótipo. A análise de cada uma das três repetições foi realizada em triplicata, mas uma alternativa para reduzir esse efeito poderia ser o aumento do tamanho da amostra de grãos utilizada em cada análise, que foi de 10 g.

3.2.2. Índices de Oxidação

Uma vez que, estando em foco os efeitos das isoenzimas LOX e do teor de ácido linolênico na qualidade de grãos armazenados, e como essas características estão diretamente relacionadas a processos oxidativos, neste estudo foram utilizados dois índices de oxidação para avaliar a qualidade tecnológica desses grãos. As determinações do teor de hexanal (MATOBA et al., 1985; REZENDE et al., 1986, 1988; GOMES et al., 1987, 1989, 1990, 1995; TAKAMURA et al., 1991; MOREIRA et al., 1993; NISHIBA et al., 1995; FURUTA et al., 1996; ZHANG e LEE, 1997) e do índice de TBA (DAVIES et al., 1987; GOMES et al., 1987, 1989, 1990, 1995; MOREIRA et al., 1993; NISHIBA et al., 1995; FURUTA et al., 1996), nos mais diversos procedimentos analíticos, têm sido utilizadas há anos para grãos de soja e produtos derivados.

Com relação ao teor de hexanal, as interações genótipo e tempo, forma e tempo e temperatura e tempo foram significativas ($P < 0,01$), indicando que os efeitos de genótipo, forma e temperatura apresentaram comportamentos diferentes ao longo do tempo (Tabela 3).

Os teores de hexanal produzido, determinados a cada dois meses, em grãos de soja dos genótipos LOX^-LNN^R , LOX^-LNN^N , LOX^+LNN^R e LOX^+LNN^N , armazenados por oito meses a 25 e 35 °C, nas formas de grãos inteiros e de grãos quebrados, são apresentados na Figura 7. Os grãos dos genótipos LOX^- , inteiros e quebrados, independentemente dos diferentes teores de ácido linolênico e da temperatura a que foram submetidos, apresentaram praticamente os mesmos teores médios de hexanal produzido, em média 0,96 $\mu\text{g/g}$ de amostra (base seca), ao longo de todo o período de armazenamento. Entretanto, os grãos dos genótipos LOX^+ , inteiros e quebrados, já apresentavam no início do armazenamento uma produção de hexanal no mínimo duas vezes superior à dos genótipos LOX^- . E, no decorrer do armazenamento, houve aumento significativo desses teores. Assim, mais uma vez, confirma-se a importante participação das LOX nos processos oxidativos que conduzem à formação de compostos que irão conferir sabores indesejáveis aos produtos protéicos derivados da soja.

É importante ressaltar que os maiores teores e os maiores aumentos nos teores de hexanal produzido foram observados para o genótipo LOX^+LNN^R , nas formas de grãos inteiros e quebrados. O genótipo LOX^+LNN^R

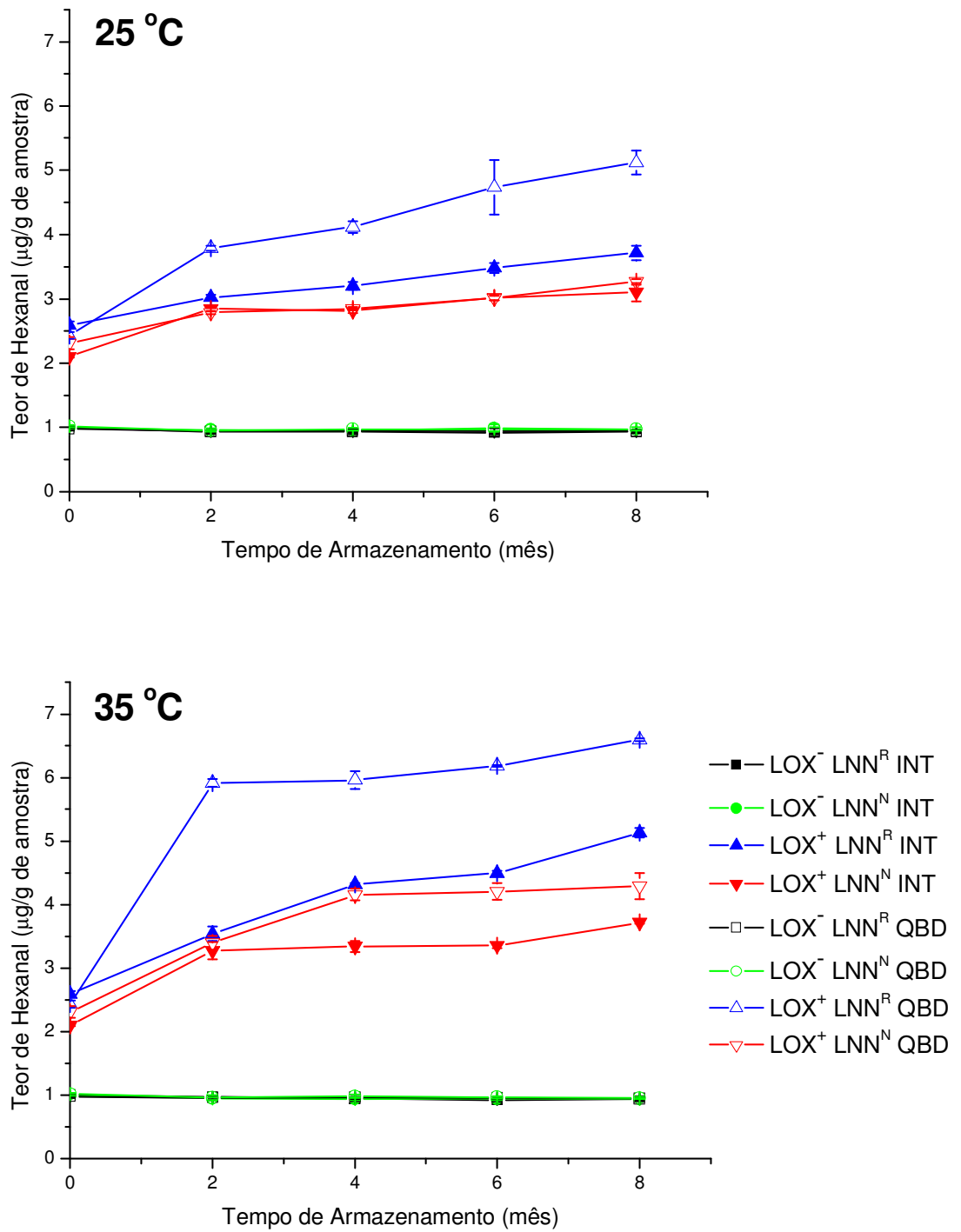


Figura 7 - Teores de hexanal em grãos de quatro genótipos de soja contrastantes quanto à presença ou ausência de lipoxigenases (LOX⁺ ou LOX⁻) e quanto ao teor de ácido linolênico normal (LNN^N) ou reduzido (LNN^R), armazenados a 25 e 35 °C, nas formas de grãos inteiros (INT) e de grãos quebrados (QBD). Os resultados, em base seca, constituem médias de três repetições \pm desvio-padrão.

apresentou um teor médio de 22,92% de lipídeos e 57,04% de ácido linoléico na fração lipídica, sendo que os valores apresentados pelo genótipo LOX⁺LNN^N para esses teores foram de 20,14 e 56,03%, respectivamente (Tabelas 1 e 2). Isso significa que o genótipo LOX⁺LNN^R possui maior teor de ácido linoléico no grão. Sendo o hexanal formado a partir do 13-hidroperóxido derivado do ácido linoléico (ARAÚJO, 2004), a maior produção desse aldeído em genótipos LOX⁺LNN^R pode ser justificada.

O efeito da temperatura sobre os grãos dos genótipos LOX⁺, inteiros e quebrados, é nitidamente observado ao analisar a Figura 7, tendo em vista a maior produção de hexanal a 35 °C. Após oito meses de armazenamento a 25 °C, os teores de hexanal obtidos para o genótipo LOX⁺LNN^R foram 1,43 vez superior para grãos inteiros e 2,11 vezes superior, para grãos quebrados e, para os grãos de LOX⁺LNN^N, o aumento foi de 1,48 e 1,41 vezes para grãos inteiros e quebrados, respectivamente. Os teores desse aldeído, observados após 8 meses de armazenamento a 35 °C, foram 1,98 e 2,71 vezes superior para grãos de LOX⁺LNN^R e 1,77 e 1,86 vezes superior para grãos de LOX⁺LNN^N, inteiros e quebrados, respectivamente.

Durante a colheita, o transporte, o armazenamento e o processamento da soja, qualquer dano físico permite o contato direto entre enzima e substrato; alto conteúdo de umidade e alta temperatura promovem essa interação. Ao estudar os efeitos de danos físicos e teor de umidade na produção de hexanal em grãos de soja, Rezende et al. (1988) demonstraram que o dano físico por si só não faz elevar os níveis de hexanal, porém contribui para aumentar a absorção de água quando em comparação com grão não-danificado, resultando em aumento de hexanal. Segundo Nelson et al. (1971), quando o tecido celular de cotilédones de soja é rompido ou danificado de qualquer forma, na presença de até mesmo um pequeno teor de umidade ocorre o desenvolvimento de um sabor “painty” (oxidado), ou “beany”, altamente indesejável.

Com relação ao índice de TBA, as interações genótipo e tempo e forma e tempo foram significativas a 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, indicando que os efeitos de genótipo e da forma do grão apresentaram comportamento diferente ao longo do tempo. Já a interação temperatura e tempo foi não-significativa (Tabela 3).

Na Figura 8 são mostrados os resultados de índice de TBA, expressos em mg de malonaldeído/1.000 g de amostra. Os índices de TBA foram determinados a cada dois meses, em grãos de soja dos genótipos LOX⁻LNN^R, LOX⁻LNN^N, LOX⁺LNN^R e LOX⁺LNN^N, armazenados por oito meses a 25 e 35 °C, nas formas de grãos inteiros e grãos quebrados.

Os valores de índices de TBA de grãos dos genótipos LOX⁻, inteiros ou quebrados, como verificado para os teores de hexanal, apresentaram-se bem mais baixos que aqueles obtidos de grãos dos genótipos LOX⁺, durante todo o período de armazenamento, em ambas as temperaturas consideradas neste estudo. Reafirma-se, então, o evidente e importante envolvimento das isoenzimas LOX na oxidação de ácidos graxos poliinsaturados.

Entre os genótipos com ausência de LOX, os grãos tanto inteiros quanto quebrados de LOX⁻LNN^R apresentaram menores índices de TBA que os de LOX⁻LNN^N. Porém, ambos os genótipos LOX⁻ apresentaram aumento no índice de TBA durante o armazenamento. Após oito meses a 25 °C, o genótipo LOX⁻LNN^R apresentou aumento do índice de TBA de 1,95 vez para grãos inteiros e 1,88 vez para grãos quebrados, e para o genótipo LOX⁻LNN^N o aumento foi de 2,0 vezes para grãos inteiros e 2,28 vezes para grãos quebrados. O aumento do índice de TBA após oito meses a 35 °C, para o genótipo LOX⁻LNN^R, foi de 1,81 vez para grãos inteiros e de 2,12 vezes para grãos quebrados, enquanto para o genótipo LOX⁻LNN^N o aumento foi de 1,77 e 2,21 vezes para grãos inteiros e quebrados, respectivamente. Mesmo ocorrendo esses aumentos no índice de TBA, os genótipos LOX⁻ apresentaram no final dos oito meses valores ainda muito inferiores aos dos genótipos LOX⁺.

Entre os genótipos com presença de LOX, grãos tanto inteiros quanto quebrados de LOX⁺LNN^R apresentaram menores índices de TBA que os de LOX⁺LNN^N. Ao analisar a interação significativa de genótipo e tempo, foi observado que os índices de TBA para os genótipos LOX⁺ mantiveram-se constantes ao longo do tempo de armazenamento, ao passo que para os genótipos LOX⁻ um aumento no índice de TBA foi verificado nas duas condições de temperatura.

De modo geral, substâncias reativas com TBA são produzidas em maiores quantidades somente a partir de ácidos graxos contendo três ou mais insaturações (DAHLE et al., 1962; NAWAR, 1996; ARAÚJO, 2004), justificando,

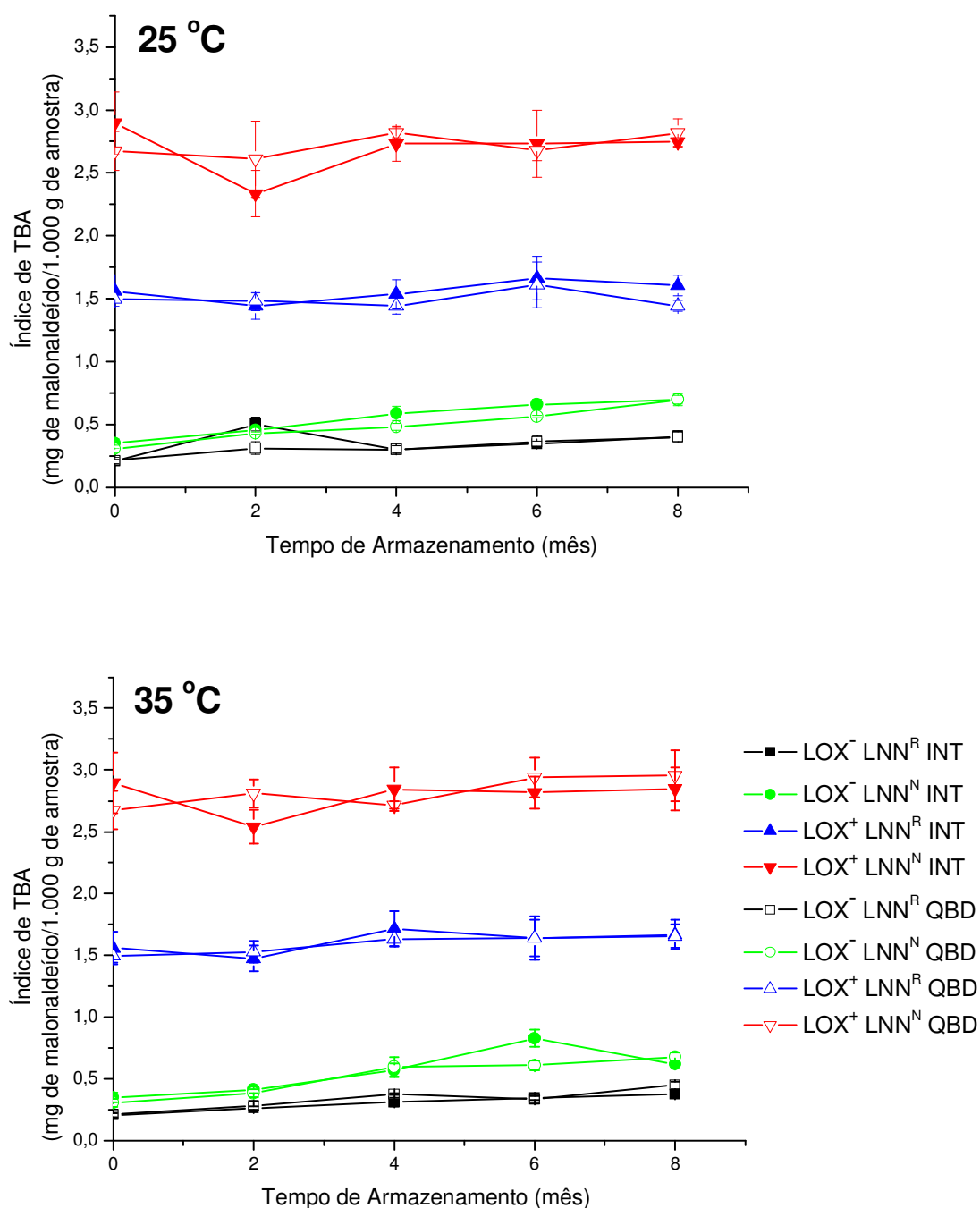


Figura 8 - Índices de TBA em grãos de quatro genótipos de soja contrastantes quanto à presença ou ausência de lipoxigenases (LOX⁺ ou LOX⁻) e quanto ao teor de ácido linolênico normal (LNN^N) ou reduzido (LNN^R), armazenados a 25 e 35 °C, nas formas de grãos inteiros (INT) e de grãos quebrados (QBD). Os resultados, em base seca, constituem médias de três repetições \pm desvio-padrão.

assim, o fato de genótipos com teores reduzidos de ácido linolênico terem apresentado índices de TBA mais baixos, tanto na presença quanto na ausência de LOX. O aumento do índice de TBA em genótipos LOX⁻ pode ser explicado pela produção de aldeídos por vias oxidativas não-enzimáticas.

Em estudo conduzido por Nishiba et al. (1995) foram determinados o acúmulo de hexanal e o índice do ácido 1,3-dietil-2-tiobarbitúrico (DETBA – índice para estimar produtos da peroxidação de lipídeos) em homogenatos obtidos de grãos de soja com ausência de LOX, de grãos de três materiais genéticos apresentando cada um apenas uma das isoenzimas, e também de grãos de um cultivar comercial. Os homogenatos foram preparados a partir de grãos moídos e de grãos embebidos em água, sendo mantidos a 4 °C para análise em diferentes tempos. O homogenato obtido de soja sem LOX apresentou o menor acúmulo de hexanal e também o menor índice de DETBA. Esses autores concluíram que a soja com ausência de LOX nas sementes parece superior como ingrediente para alimentos (extrato hidrossolúvel, tofu etc.), tanto do ponto de vista de melhoria do sabor quanto de segurança à saúde humana.

Outro estudo, conduzido por esse mesmo grupo de pesquisadores, foi realizado para verificar o efeito adicional de ácidos graxos insaturados exógenos, em extrato de soja obtidos dos mesmos materiais genéticos, na produção de hexanal e no índice de DETBA. A soja isenta de LOX apresentou a menor produção de hexanal e o menor índice de DETBA. O baixo valor de DETBA foi mantido em uma ampla faixa de pH (4 - 10) e temperatura (4 - 70 °C), não sendo influenciados pela adição de ácidos graxos insaturados. Os autores concluíram que a soja isenta de LOX pode ser excelente para preparo de produtos derivados onde ocorra a combinação de soja e outros ingredientes (FURUTA et al., 1996).

Wilson (1996) resumiu estudos comparando o desempenho de soja contendo LOX e soja isenta de LOX no preparo de alimentos como extrato hidrossolúvel e tofu. Ele concluiu que as linhagens sem LOX têm as propriedades funcionais da soja normal, porém com menos sabor “beany”. E, assim, segundo esse autor, os produtos tradicionais de soja, feitos de linhagens isentas de LOX, podem tornar-se mais aceitáveis nas dietas ocidentais. Além disso, pode ser possível substituir concentrados e isolados

protéicos de soja, mais caros, por farinha de soja isenta de LOX como ingrediente para alimentos.

4. CONCLUSÕES

- As determinações do teor de hexanal e do índice de TBA foram adequadas à avaliação da qualidade de grãos de soja, porém a de hexanal revelou-se como um método mais sensível para acompanhar as alterações ocorridas durante o armazenamento dos grãos.
- Os resultados obtidos neste estudo reforçaram a conclusão de que a eliminação genética das isoenzimas LOX de grãos de soja é uma ótima alternativa para a obtenção de produtos derivados com características sensoriais mais adequadas ao paladar ocidental.
- Grãos de soja com ausência de LOX, submetidos ao armazenamento, resultarão em produtos derivados de melhor qualidade, em comparação com os produtos obtidos de grãos armazenados, com a presença de LOX.
- A associação, em um mesmo cultivar, das características ausência de LOX e reduzido teor de ácido linolênico, o mais insaturado presente em grãos de soja, resultaria na redução da suscetibilidade à oxidação não-enzimática.

5. REFERÊNCIAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=135&word=>>>. Acesso em: 13 abr. 2005.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos**: Teoria e prática. 3. ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2004. 478 p.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official methods of analysis**. Washington, D.C., 1975. 1094 p.

ATHIÉ, I.; CASTRO, M. F. P. M.; GOMES, R. A. R.; VALENTINI, S. R. T. Alterações nos grãos durante a estocagem. In: —. **Conservação de grãos**, Campinas, SP: Fundação Cargill, 1998. p. 1-30.

BUBECK, D. M.; FEHR, W. R.; HAMMONG, E. G. Inheritance of palmitic and stearic acid mutants of soybean. **Crop Sci.**, v. 29, p. 652-656, 1989.

DAHLE, L. K.; HILL, E. G.; HOLMAN, R. T. The thiobarbituric acid reaction and the autoxidations of polyunsaturated fatty acid methyl esters. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 98, p. 253-261, 1962.

DAVIES, C. S.; NIELSEN, S. S.; NIELSEN, N. C. Flavor improvement of soybean preparations by genetic removal of lipoxygenase-2. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 64, p. 1428-1433, 1987.

ESKIN, N. A. M.; GROSSMAN, S.; PINSKY, A.; WHITAKER, J. R. Biochemistry of lipoxygenase in relation to food quality. **CRC - Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 9, p. 1-40, 1977.

FONTES, E. P. B.; MOREIRA, M. A.; DAVIES, C. S.; NIELSEN, N. C. Urea-elicited changes in relative electrophoretic mobility of certain glycinin and β -conglycinin subunits. **Plant Physiol.**, v. 76, p. 840-842, 1984.

FURUTA, S.; NISHIBA, Y.; HAJIKA, M.; IGITA, K.; SUDA, I. DETBA value and hexanal production with the combination of unsaturated fatty acids and extracts prepared from soybean seeds lacking two or three lipoxygenase isozymes. **J. Agric. Food Chem.**, v. 44, p. 236-239, 1996.

GOMES, J. C.; JOSÉ, I. C.; COELHO, D. T.; CHAVES, J. B. P.; REZENDE, S. T. Extratos hidrossolúveis produzidos de soja sem lipoxigenases. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 15, p. 95-103, 1995.

GOMES, J. C.; OLIVEIRA, S. A. M.; OLIVEIRA, L. M.; COELHO, D. T.; MOREIRA, M. A. Extrato solúvel de soja: sabor e teor de hexanal. **Arq. Biol. Tecnol.**, v. 32, p. 665-686, 1989.

GOMES, J. C.; SILVA, M. V.; COELHO, D. T.; CHAVES, J. B. P.; REZENDE, S. T. Extrato solúvel de soja: sabor e aroma, lipoxigenase e hexanal. **Arq. Biol. Tecnol.**, v. 33, p. 353-368, 1990.

GOMES, J. C.; VISENTAINER, J. V.; MOREIRA, M. A.; FONTES, E. P. B. F. Atividade de lipoxigenase e o teor de n-hexanal em farinhas de soja. **Arq. Biol. Tecnol.**, v. 30, p. 481-500, 1987.

HAMMOND, E. G.; FEHR, W. R. Improving the fatty acid composition of soybean oil. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 61, p. 1713-1716, 1984.

HAUMANN, B. F. Health implications of lipid oxidation. **INFORM**, v. 4, p. 800, 803, 804, 806-808, 810, 1993.

HEPPARD, E. P.; KINNEY, A. J.; STECCA, K. L.; MIAO, G. Developmental and growth temperature regulation of two different microsomal ω -6 desaturase genes in soybeans. **Plant Physiol.**, v. 110, p. 311-319, 1996.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz; Métodos químicos e físicos para análise de alimentos.** 3. ed. São Paulo, 1985. v. 1, 533 p.

KOBAYASHI, A.; TSUDA, Y.; HIRATA, N.; KUBOTA, K.; KITAMURA, K. Aroma constituents of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] milk lacking lipoxygenase isozymes. **J. Agric. Food Chem.**, v. 43, p. 2449-2452, 1995.

LAZZARI, F. A. Fatores de qualidade do grão da soja para diferentes consumidores. In: CONGRESSO DE TECNOLOGIA E COMPETITIVIDADE DA SOJA NO MERCADO GLOBAL, 2000, Cuiabá. **Anais...** Cuiabá: Fundação MT, 2000. p. 77-85.

LAZZARI, F. A. Fatores de qualidade do grão da soja. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 1999, Londrina. **Anais...** Londrina, PR: Embrapa-Soja, 1999. p. 205-210.

LIU, K. S.; ORTHOEFER, F.; BROWN, E. A. Association of seed size with genotypic variation in the chemical constituents of soybeans. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 72, p. 191-195, 1995.

LIU, K. **Soybeans**: Chemistry, technology and utilization. New York: Chapman & Hall, 1997. 532 p.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: 13 abr. 2005.

MATOBA, T.; HIDAKA, H.; NARITA, H.; KITAMURA, K.; KAIZUMA, N.; KITO, M. Lipoxygenase-2 isozyme is responsible for generation of n-hexanal in soybean homogenate. **J. Agric. Food Chem.**, v. 33, p. 852-855, 1985.

MORAES, R. M. A. **Introgessão de alelos para alto teor de proteína em soja assistida por marcadores moleculares**. Viçosa, MG: UFV, 2003. 133 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

MORAIS, A. A. C.; COELHO, D. T.; SILVA, A. L. Processamento. In: MORAIS, A. A. C.; SILVA, A. L. **Soja**: suas aplicações. Rio de Janeiro: Medsi, 1996. 259 p.

MOREIRA, M. A.; TAVARES, S. R.; RAMOS, V.; BARROS, E. G. Hexanal production and TBA number are reduced in soybean [*Glycine Max* (L.) Merr.] seeds lacking lipoxygenase isozymes 2 and 3. **J. Agric. Food Chem.**, v. 41, p. 103-106, 1993.

NARAYAN, R.; CHAUHAN, G. S.; VERNA, N. S. Changes in the quality of soybean during storage. Part 1 – Effect of storage on some physico-chemical properties of soybean. **Food Chem.**, v. 27, p. 13-23, 1988a.

NARAYAN, R.; CHAUHAN, G. S.; VERNA, N. S. Changes in the quality of soybean during storage. Part 2 – Effect of soybean storage on the sensory qualities of the products made therefrom. **Food Chem.**, v. 30, p. 181-190, 1988b.

NAWAR, W. W. Lipids. In: FENNEMA, O. R. (Ed.). **Food chemistry**. 3. ed. New York: Marcel Dekker, 1996. p. 225-319.

NELSON, A. I.; WEI, L. S.; STEINBERG, M. P. Food products from whole soybeans. **Soybean digest**, p. 31-34, 1971.

NISHIBA, Y.; FURUTA, S.; HAJIKA, M.; IGITA, K.; SUDA, I. Hexanal accumulation and DETBA value in homogenate of soybean seeds lacking two

or three lipoxygenase isozymes. **J. Agric. Food Chem.**, v. 43, p. 738-741, 1995.

PRIESTLEY, D. A.; LEOPOLD, A. C. Lipids changes during natural aging of soybean seeds. **Physiol. Plant.**, v. 59, p. 467-470, 1983.

REZENDE, S. T.; FONTES, E. P. B.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G.; SEDIYAMA, T. Efeito da eliminação genética das isozimas lipoxigenases L₁ e L₃ de grãos de soja na produção de n-hexanal em produtos derivados. **Arq. Biol. Tecnol.**, v. 29, p. 571-579, 1986.

REZENDE, S. T.; MOREIRA, M. A.; MOREIRA, S. M. C.; FONTES, E. P. B.; GOMES, J. C. Efeitos de danos físicos e teor de umidade na produção de n-hexanal em grãos de soja. **Arq. Biol. Tecnol.**, v. 31, p. 433-442, 1988.

RIBEIRO JR., J. I. **Análises estatísticas no SAEG**. 1. ed. Viçosa: Editora Folha de Viçosa, 2001. 301 p.

SNYDER, J. M.; MOUNTS, T. L.; HOLLOWAY, R. K. An analysis scheme for estimation of crude oil quality. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 68, p. 285-288, 1991.

SUDA, I.; HAJIKA, M.; NISHIBA, Y.; FURUTA, S.; IGITA, K. Simple and rapid method for the selective detection of individual lipoxygenase isozymes in soybean seeds. **J. Agric. Food Chem.**, v. 43, p. 742-747, 1995.

TAKAMURA, H.; KITAMURA, K.; KITO, M. Inhibition by lipoxygenase-3 of n-hexanal generation in soybeans. **FEBS LETTERS**, v. 292, p. 42-44, 1991.

TARLADGIS, B. G.; WATTS, B. M.; YOUNATHAN, M. T. A distillation method for the quantitative determination of malonaldehyde in rancid foods. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 37, p. 44-48, 1960.

TORRES-PENARANDA, A. V.; REITMEIER, C. A.; WILSON, L. A.; FEHR, W. R.; NARVEL, J. M. Sensory characteristics of soymilk and tofu made from lipoxygenase-free and normal soybeans. **J. Food Sci.**, v. 63, p. 1084-1087, 1998.

UTUMI, M. M.; BARROS, E. G.; OLIVEIRA, M. G. A.; SEDIYAMA, C. S.; MOREIRA, M. A. Efeito da eliminação genética de lipoxigenases e de polipeptídeos de reserva na qualidade da proteína de soja. **R. Bras. Fisiol. Veg.**, v. 10, p. 203-212, 1998.

VISENTAINER, J. V.; LAGUILA, J. E.; MATSUSHITA, M.; SOUZA, N. E. Fatty acid composition in several varieties of soybean recommended for cultivation in Brazil. **Arq. Biol. Tecnol.**, v. 34, p. 1-6, 1991.

WILSON, L. A. Comparison of lipoxygenase-null and lipoxygenase-containing soybeans for foods. In: PIAZZA, G. J. (Ed.). **Lipoxygenase and lipoxygenase pathway enzymes**. Champaign, IL: AOCS Press, 1996. p. 209-225.

ZHANG, H. Z.; LEE, T. C. A novel silica gel adsorption/near-infrared spectroscopic method for the determination of hexanal as an example of volatile compounds. **J. Agric. Food Chem.**, v. 45, p. 3083-3087, 1997.

CAPÍTULO 2

TEORES DE ISOFLAVONAS EM GRÃOS DE SOJA ARMAZENADOS

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, pesquisadores têm salientado os benefícios à saúde de produtos de soja. A soja é importante não somente pelo seu valor nutritivo, mas também por apresentar vários constituintes biologicamente ativos. Dados experimentais e clínicos têm mostrado que as isoflavonas representam alternativa promissora na prevenção e, ou, tratamento de diversas doenças crônicas, incluindo câncer, sintomas da menopausa, osteoporose e doenças cardiovasculares (SETCHELL, 1998; MESSINA, 2000).

Em produtos à base de soja, 12 formas de isoflavonas foram identificadas, sendo três agliconas (genisteína, daidzeína e gliciteína) e nove glicosídeos (genistina, daidzina, glicitina e suas formas acetiladas e maloniladas: 6"-O-acetilgenistina, 6"-O-acetildaidzina, 6"-O-acetilglicitina, 6"-O-malonilgenistina, 6"-O-malonildaidzina, 6"-O-malonilglicitina) (WANG e MURPHY, 1994; SONG et al., 1998).

Em 1999, o Food and Drug Administration (FDA) aprovou e autorizou a impressão de uma declaração de saúde ("health claim") nos rótulos de alimentos industrializados que contenham soja, sugerindo: "dieta com baixo conteúdo de colesterol e gorduras saturadas e que incluam 25 gramas de proteínas de soja, podem reduzir os riscos de doenças cardiovasculares". As proteínas e as isoflavonas da soja agem sinergicamente na redução do colesterol plasmático (particularmente o LDL e o VLDL), aumentam a relação HDL:LDL, reduzem o tamanho das placas ateroscleróticas, aumentam a elasticidade das artérias (coronárias) e diminuem a pressão arterial, evitando as doenças cardiovasculares como o infarto do miocárdio, a aterosclerose e as

trombozes (CARRÃO-PANIZZI, 2001). Em seus estudos, Kanazawa et al. (1995), Honoré et al. (1995) e Nilausen e Meinertz (1999) concluíram que as isoflavonas reduzem os níveis de colesterol total, diminuem a fração LDL e aumentam a fração HDL no sangue.

Apesar do efeito benéfico das isoflavonas para a saúde humana, daidzeína e genisteína são citadas, na literatura, como responsáveis pelo gosto amargo e pela adstringência em derivados de soja, tendo suas concentrações aumentadas durante a imersão dos grãos em água (MATSUURA et al., 1989; ARAÚJO et al., 1997). Segundo Carrão-Panizzi et al. (1999), a adstringência é causada pelas formas agliconas de isoflavonas, presentes em quantidades relativamente baixas na semente de soja. Pela ação da enzima β -glicosidase, os glicosídeos daidzina e genistina são hidrolisados, formando as agliconas daidzeína e genisteína, que têm sido relacionadas com o aumento do gosto amargo e da sensação de adstringência da soja, que limitam o seu consumo pelos países ocidentais.

O processamento térmico, a hidrólise enzimática e a fermentação podem alterar significativamente a distribuição das diferentes formas de isoflavonas nos alimentos. O efeito das condições de processamento, na conversão das diferentes formas de isoflavonas, tem sido, há algum tempo, tema de estudos (ANDERSON e WOLF, 1995; WANG e MURPHY, 1996; WANG et al., 1998; GRÜN et al., 2001; JACKSON et al., 2002). Porém, ainda são escassos, na literatura, resultados sobre as mudanças nos teores de isoflavonas em grãos de soja durante o período de armazenamento.

O objetivo deste estudo foi avaliar as possíveis mudanças nos teores das diferentes formas de isoflavonas presentes em grãos de soja, ao longo do armazenamento, sob duas temperaturas. Para isso, teores de isoflavonas em grãos intactos, de dois genótipos contrastantes quanto à presença ou ausência de lipoxigenases e quanto ao teor normal ou reduzido de ácido linolênico, foram determinados no início do armazenamento e após dois, quatro e oito meses.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado nos laboratórios do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG.

2.1. Material Genético

O material genético necessário à realização deste trabalho foi fornecido pelo Programa de Melhoramento da Qualidade da Soja do BIOAGRO/UFV. Os materiais em teste são linhagens derivadas do cruzamento entre a linhagem americana BARC-12 (que possui baixo teor de ácido linolênico, cerca de 3%) desenvolvida pelo USDA-ARS em Beltsville, Maryland, EUA, e a linhagem UFV TN (derivada de Doko RC, possuindo alelos nulos para as três isoenzimas lipoxigenases), obtida pelo citado programa de melhoramento. Foram utilizados dois genótipos similares fenotipicamente, sendo um com ausência de LOX e teor reduzido de ácido linolênico (LOX⁻LNN^R) e o outro, com presença de LOX e teor normal de ácido linolênico (LOX⁺LNN^N). Os genótipos foram cultivados no Campo Experimental “Professor Diogo Alves de Melo”, em Viçosa, MG, possuindo a mesma data de plantio (12/12/2001).

Inicialmente, a linhagem BARC-12 foi cruzada com a variedade comercial Doko RC, obtendo-se a geração F1. As plantas F1 foram

autofecundadas, produzindo a geração F2. As sementes F2 foram submetidas a microanálises não-destrutivas, que preservam seu poder de germinação, para determinação dos teores de ácido linolênico. As sementes que apresentaram baixo teor de ácido linolênico foram selecionadas e plantadas. As plantas F2 foram, então, retrocruzadas com a linhagem isogênica UFV TN. As sementes F1 desse primeiro retrocruzamento foram plantadas e autofecundadas, gerando as sementes F2 que foram submetidas a microanálises não-destrutivas para as determinações dos teores de ácido linolênico e presença ou ausência de LOX. As sementes F2 foram, então, reunidas em dois grupos contrastantes, conforme mencionado anteriormente. Na geração seguinte de autofecundação foram feitas novas análises para confirmar o caráter homocigoto das plantas, tanto para teor normal e reduzido de ácido linolênico quanto para presença ou ausência de LOX. As plantas que apresentaram segregação quanto a essas características foram descartadas. As sementes de cada grupo, a serem utilizadas neste trabalho, foram obtidas após seis gerações de autofecundações (RC1F7), quando se dispunha de quantidade suficiente de sementes.

2.2. Armazenamento dos Grãos de Soja

Os grãos de soja dos dois materiais genéticos utilizados foram submetidos a uma seleção manual para remoção de todo o material estranho, bem como grãos malformados ou apresentando dano físico. Acondicionados em sacos de ráfia, os grãos foram mantidos em câmara fria, com umidade relativa controlada até atingirem um teor de umidade entre 12 e 13%. As amostras, compostas por 600 g de grãos, foram, então, acondicionadas em potes de polipropileno fechados por um filme de PVC (policloreto de vinila), por ser esse um filme com permeabilidade seletiva, possuindo boas propriedades de barreira ao vapor d'água e relativamente altas taxas de permeabilidade ao O₂ e ao CO₂. O efeito do armazenamento sobre os teores de isoflavonas dos grãos foi avaliado sob duas condições de temperatura, 25 e 35 °C, por um período de oito meses. As avaliações foram realizadas no início do armazenamento e após dois, quatro e oito meses.

2.3. Determinação de Isoflavonas

As isoflavonas foram extraídas de amostras de cerca de 1 g de grãos de soja moídos em 20 mL de metanol 80%. A mistura foi mantida sob agitação por duas horas, em banho de gelo, utilizando-se agitador mecânico e barra magnética, segundo descreveram Genovese e Lajolo (2001). Após centrifugação a $16.100 \times g$ por 5 min, sob refrigeração, os extratos foram filtrados em membrana de politetrafluoroetileno (PTFE) de $0,45 \mu\text{m}$ e 20 μL do filtrado analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa. A análise cromatográfica foi realizada em cromatógrafo SHIMADZU, série 10A.

Para a separação dos compostos, utilizou-se uma coluna Shim-pack CLC-ODS(M) ($5 \mu\text{m}$, $250 \times 4,6 \text{ mm}$), SHIMADZU, mantida a $40 \text{ }^\circ\text{C}$. A eluição foi realizada a um fluxo de 1,0 mL/min, em sistema gradiente, utilizando-se duas soluções: A) 0,1% de ácido acético em água Milli-Q e B) 0,1% de ácido acético em acetonitrila. O gradiente de acetonitrila foi formado como se segue: uma concentração de 15% de B foi mantida por 1 min, seguindo acréscimos da concentração de B de 15 a 18% em 11 min, de 18 a 22% em 14 min, de 22 a 23% em 10 min e de 23 a 29% em 4 min, mantendo-se em 29% por 5 min e aumentando de 29 a 50% em 9 min. Concluída a separação das isoflavonas, a concentração de B foi elevada de 50 a 80% em 6 min, retornando a 15% em 5 min, sendo necessários mais 10 min para equilibrar o sistema para as injeções subsequentes.

A detecção dos compostos foi realizada em detector espectrofotométrico a 260 nm e a identificação, por comparação com os tempos de retenção dos padrões. Os padrões de daidzeína e genisteína foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, EUA) e de gliciteína, daidzina, genistina, glicitina, 6"-O-malonildaidzina, 6"-O-malonilgenistina, 6"-O-malonilglicitina, 6"-O-acetildaidzina, 6"-O-acetilgenistina e 6"-O-acetilglicitina da Fujicco Co., Ltd. (Tóquio, Japão).

A quantificação foi realizada pelo método de padronização externa. Todo o processo foi controlado por um microcomputador, equipado com software LC-10 para Windows 95, acoplado ao sistema. Os teores de daidzeína

total, genisteína total, gliciteína total e isoflavonas totais foram calculados usando-se as seguintes fórmulas:

Daidzeína total = 254,23 (daidzina/416,36 + 6"-O-malonildaizina/502,41 + 6"-O-acetildaizina/458,4 + daidzeína/254,23);

Genisteína total = 270,23 (genistina/432,37 + 6"-O-malonilgenistina/518,41 + 6"-O-acetilgenistina/474,4 + genisteína/270,23);

Gliciteína total = 284 (glicitina/446 + 6"-O-malonilglicitina/532 + 6"-O-acetilglicitina/488 + gliciteína/284); e

Isoflavonas totais = daidzeína total + genisteína total + gliciteína total.

2.4. Ensaio Enzimático de β -Glicosidases

2.4.1. Preparo do Extrato Enzimático

Para a obtenção do extrato enzimático foram moídos 30 grãos de soja. Uma porção de 100 mg de grãos moídos foi homogeneizada com 1,5 mL de ácido cítrico 0,1 M contendo fosfato de sódio 0,05 M, pH 5,5 (PORTER et al., 1990), utilizando gral e pistilo, previamente resfriados. A mistura foi transferida para tubos de polipropileno para microcentrífuga, sendo centrifugada a 16.100 x g por 5 min, a 4 °C. O sobrenadante foi utilizado nos ensaios de atividade de β -glicosidases e na determinação do teor de proteínas.

2.4.2. Determinação da Atividade de β -Glicosidase

Para a determinação da atividade de β -glicosidases (β -D-glicosídeo glico-hidrolase, EC 3.2.1.21), adotou-se o procedimento descrito por Matsuura et al. (1995), usando o *p*-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (*p*NPG) como substrato, com modificações. Para esse ensaio, realizado em triplicata, a mistura de reação, com um volume final de 1,0 mL, foi composta de 700 μ L de tampão fosfato-citrato 100 mM, pH 5,0; 200 μ L de solução de *p*NPG 10 mM; e 100 μ L do extrato enzimático. A mistura de reação foi mantida em banho-maria a 45 °C por 15 min, sendo a reação interrompida pela adição de 1 mL de solução de Na₂CO₃ 0,5 M. A quantidade de *p*NP (*p*-nitrofenol) liberado foi determinada, baseando-se na coloração amarela desenvolvida em meio

alcalino (ρ -nitrofenolato), pela leitura da absorbância a 410 nm, realizada em espectrofotômetro DU[®]-65, BECKMAN. As leituras de absorbância a 410 nm foram transformadas em μmol de ρNP formado, por meio de uma curva analítica construída utilizando quantidades de ρNP variando de 0,02 a 0,20 μmol . A atividade da enzima foi expressa como a concentração de ρNP produzida por minuto nas condições do ensaio. Para a determinação da atividade específica, a concentração de proteína (mg/mL) no extrato enzimático foi determinada pelo método de Bradford (1976).

2.4.3. Determinação do Tempo de Reação

Nesta determinação, a mistura de reação e as condições de ensaio foram as mesmas descritas no item 2.4.2, à exceção dos diferentes tempos de reação utilizados, variando de 5 a 35 min, em intervalos de 5 min.

2.4.4. Efeito do pH

Para a determinação do pH ótimo de atividade de β -glicosidases, a mistura de reação foi a descrita no item 2.4.2, porém substituindo o sistema tamponante. Na obtenção dos diferentes valores de pH, as soluções-tampão foram preparadas conforme McIlvaine (1921), variando os valores de pH de 3,0 a 7,6. A mistura de reação foi mantida em banho-maria a 40 °C, por 30 min.

2.4.5. Efeito da Temperatura

Na determinação da temperatura ótima de atividade de β -glicosidases, a mistura de reação e as condições de ensaio foram as mesmas descritas no item 2.4.2, utilizando-se, porém, diferentes temperaturas de reação, variando de 25 a 60 °C, em intervalos de 5 °C.

2.5. Análise Estatística

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em um modelo de parcela subdividida. Foram avaliados grãos de dois genótipos de soja, mantidos sob duas temperaturas (25 e 35 °C) e

avaliados no momento da montagem do experimento e com dois, quatro e oito meses de armazenamento. Os dois genótipos e as duas temperaturas de armazenamento foram alocados em arranjo fatorial na parcela e os períodos de armazenamento, nas subparcelas. Avaliaram-se estatisticamente os dados experimentais, utilizando os procedimentos do Sistema Estatístico SAS (Statistical Analysis System), licenciado para a UFV em 2005.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Teores de Isoflavonas Durante o Armazenamento

As condições cromatográficas utilizadas neste estudo permitiram uma boa resolução das isoflavonas glicosiladas (genistina, daidzina e glicitina), acetilglicosiladas (6“-*O*-acetilgenistina, 6“-*O*-acetildaizina e 6“-*O*-acetilglicitina), malonilglicosiladas (6“-*O*-malonilgenistina, 6“-*O*-malonildaizina e 6“-*O*-malonilglicitina) e na forma estrutural não conjugada, aglicona (genisteína, daidzeína e gliciteína). Na Figura 1 é apresentado um cromatograma obtido por cromatografia líquida de alta eficiência, mostrando a resolução das 12 formas de isoflavonas acima citadas, utilizando-se uma mistura dos respectivos padrões.

Na Tabela 1 é apresentado um resumo das análises de variância dos dados obtidos nas determinações dos teores das isoflavonas daidzina, glicitina, genistina, daidzeína, genisteína, malonildaizina, malonilglicitina, malonilgenistina e acetilgenistina, em grãos de dois genótipos de soja (LOX⁻LNN^R e LOX⁺LNN^N) armazenados por oito meses a 25 e 35 °C. Os teores de isoflavonas foram determinados no início do armazenamento e após dois, quatro e oito meses.

Em grãos de soja, as principais formas de isoflavonas encontradas são os glicosídeos genistina, malonilgenistina, daidzina, malonildaizina, glicitina e malonilglicitina (KUDOU et al., 1991; WANG e MURPHY, 1994), o que se

confirma pelos teores médios ($\mu\text{g/g}$ de amostra) das diferentes formas de isoflavonas apresentados na Tabela 1. As formas mais abundantes, em ordem decrescente de concentração, foram: malonilgenistina, malonildaizina, genistina, daidzina, malonilglicitina e glicitina.

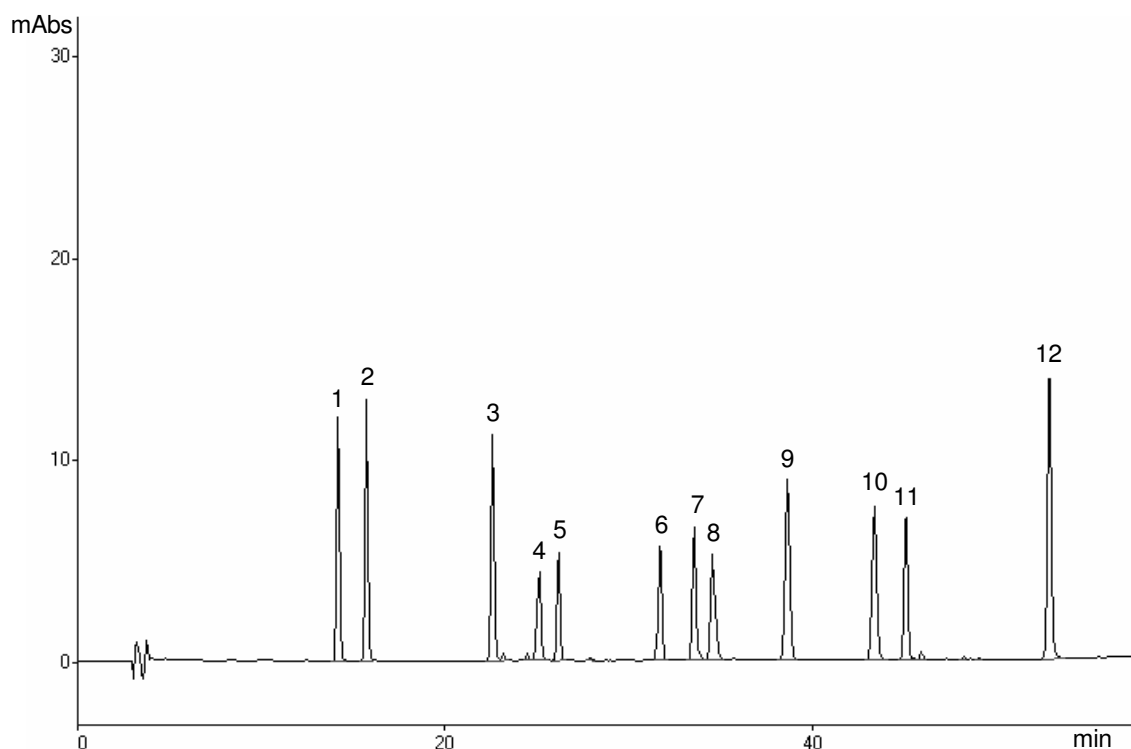


Figura 1 - Separação cromatográfica dos padrões: (1) daidzina, (2) glicitina, (3) genistina, (4) 6''-O-malonildaizina, (5) 6''-O-malonilglicitina, (6) 6''-O-acetildaizina, (7) 6''-O-acetilglicitina, (8) 6''-O-malonilgenistina, (9) daidzeína, (10) gliciteína, (11) 6''-O-acetilgenistina e (12) genisteína.

Os teores e a composição de isoflavonas variam, porém, em função do genótipo e das condições ambientais de cultivo (ELDRIDGE e KWOLEK, 1983; KITAMURA et al., 1991; WANG e MURPHY, 1994; CARRÃO-PANIZZI e KITAMURA, 1995; CARRÃO-PANIZZI, 1996; CHOI et al., 1996; CARRÃO-PANIZZI et al., 1999; HOECK et al., 2000; LEE et al., 2002). Além disso, Kudou et al. (1991) evidenciaram que o teor e a composição das isoflavonas variam com a parte morfológica da semente (hipocótilo, cotilédone e tegumento). No hipocótilo, a concentração de isoflavonas é 5,5 a 6,0 vezes maior que nos

Tabela 1 - Resumo das análises de variância dos dados obtidos nas determinações dos teores das isoflavonas daidzina, glicitina, genistina, daidzeína, genisteína, malonildaidzina (Mdaidzina), malonilglicitina (Mglicitina), malonilgenistina (Mgenistina) e acetilgenistina (Agenistina) em grãos de dois genótipos de soja (LOX⁻LNN^R e LOX⁺LNN^N) armazenados a 25 e 35 °C e avaliados em quatro tempos

Fontes de Variação	GL	Quadrados Médios								
		Teor de Isoflavonas								
		Daidzina	Glicitina	Genistina	Daidzeína	Genisteína	Mdaidzina	Mglicitina	Mgenistina	Agenistina
Genótipo (GEN)	1	34988,53**	133,33*	15891,38**	3893,50**	554,73**	157881,10**	283,13*	43,20 ^{ns}	2,0868 ^{ns}
Temperatura (TPR)	1	62878,90**	1560,73**	95202,18**	585,25**	433,98**	114173,40**	2604,04**	280049,07**	744,94**
Interação GEN*TPR	1	172,39 ^{ns}	0,1478 ^{ns}	59,894 ^{ns}	31,884**	2,0694 ^{ns}	959,12 ^{ns}	50,199 ^{ns}	38,869 ^{ns}	2,7289 ^{ns}
Erro (a)	8	532,00	26,5104	1044,72	6,3693	1,7799	3561,91	54,306	6472,04	9,3228
Tempo (TPO)	3	40796,61**	1868,46**	55849,34**	184,24**	87,983**	26672,93**	566,67**	97052,02**	433,84**
Interação TPO*TPR	3	7589,51**	201,92**	11315,68**	70,429**	49,489**	16487,08**	315,15**	36278,97**	93,487**
Interação TPO*GEN	3	662,97 ^{ns}	92,69**	191,97 ^{ns}	17,09**	1,3967 ^{ns}	993,48 ^{ns}	164,76*	3466,72 ^{ns}	0,4304 ^{ns}
Erro (b)	27	277,09	8,28	392,91	2,8538	1,3298	1174,4	48,74	2162,54	5,0775
Média		314,40	69,26	394,36	34,28	21,89	759,37	128,09	1241,30	20,74
CV a (%)		7,34	7,43	8,20	7,36	6,10	7,86	5,75	6,48	14,72
CV b (%)		5,29	4,16	5,03	4,93	5,27	4,51	5,45	3,75	10,86

^{ns} Não-significativo e ** e * significativos a 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

cotilédones. A gliciteína e suas formas glicosiladas foram detectadas somente no hipocótilo, enquanto o tegumento não apresentou nenhuma forma de isoflavona. Segundo Tsukamoto et al. (1995), do total de isoflavonas da semente, 80 a 90% está localizado no cotilédone, estando, portanto, o restante no hipocótilo.

A interação entre tempo de armazenamento e genótipo foi significativa para glicitina ($P < 0,01$), daidzeína ($P < 0,01$) e malonilglicitina ($P < 0,05$), ou seja, os genótipos para essas formas apresentaram comportamento diferenciado. Houve interação significativa ($P < 0,01$) entre temperatura e tempo de armazenamento para todas as formas de isoflavonas detectadas. A interação genótipo e temperatura foi significativa ($P < 0,05$) apenas para daidzeína, indicando comportamento diferente nas temperaturas de armazenamento utilizadas (Tabela 1).

Como as formas glicosídicas das isoflavonas apresentam quase o dobro da massa molecular das agliconas, Song et al. (1998) sugeriram que os resultados de isoflavonas sejam normalizados para massa de agliconas no lugar de uma simples soma de todos os isômeros. Esses resultados são apresentados na Tabela 2. A interação entre tempo de armazenamento e genótipo foi significativa somente quanto ao teor total de gliciteína ($P < 0,01$), e a interação tempo e temperatura de armazenamento foi não-significativa para os teores totais de isoflavonas. Já o efeito do tempo de armazenamento foi significativo ($P < 0,01$) para os totais das agliconas individualmente e para o total global.

Os cromatogramas representativos dos teores de isoflavonas, em grãos do genótipo LOX·LNN^R, no início do armazenamento e após oito meses de armazenamento a 25 e 35 °C, são apresentados na Figura 2. Acetilglicitina não foi detectada nas amostras, e apenas traços de gliciteína e acetildaidzina foram observados (menos de 1 µg/g de amostra).

Nas Figuras 3 a 6 são apresentados os comportamentos de cada forma de isoflavona, em grãos de soja dos genótipos LOX·LNN^R (genótipo 1) e LOX⁺LNN^N (genótipo 2), armazenados por oito meses a 25 e 35 °C e avaliados em quatro épocas de armazenamento.

Tabela 2 - Resumo das análises de variância dos dados obtidos nas determinações dos teores totais das isoflavonas daidzeína, gliciteína e genisteína em grãos de dois genótipos de soja (LOX^{LNN}^R e LOX^{LNN}^N) armazenados a 25 e 35 °C e avaliados em quatro tempos

Fontes de Variação	GL	Quadrados Médios				Atividade de β -Glicosidase
		Teor de Isoflavonas ¹				
		Daidzeína Total	Gliciteína Total	Genisteína Total	Total Global	
Genótipo (GEN)	1	142639,12**	266,84**	11013,17**	217421,13**	15,0498**
Temperatura (TPR)	1	39,97 ^{ns}	4,35 ^{ns}	2174,49 ^{ns}	1797,29 ^{ns}	0,0006 ^{ns}
Interação GEN*TPR	1	4,04 ^{ns}	16,22 ^{ns}	1,1869 ^{ns}	0,8648 ^{ns}	0,5354 ^{ns}
Erro (a)	8	2060,52	47,28	3727,29	4693,57	0,0778 ^{ns}
Tempo (TPO)	3	5425,46**	1457,73**	9623,08**	35631,25**	0,8716**
Interação TPO*TPR	3	1168,25 ^{ns}	18,52 ^{ns}	1594,28 ^{ns}	5597,88 ^{ns}	0,0198 ^{ns}
Interação TPO*GEN	3	1127,79 ^{ns}	165,28**	1410,71 ^{ns}	4313,82 ^{ns}	0,1964 ^{ns}
Erro (b)	27	698,29	22,99	1148,94	3621,65	0,1304
Média		610,51	112,48	927,20	1650,20	7,59
CV a (%)		7,44	6,11	6,58	4,15	3,67
CV b (%)		4,33	4,26	3,66	3,65	4,75

^{ns} Não-significativo e ** e * significativos a 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

¹ Os resultados foram normalizados para massa de agliconas, como sugerido por Song et al. (1998).

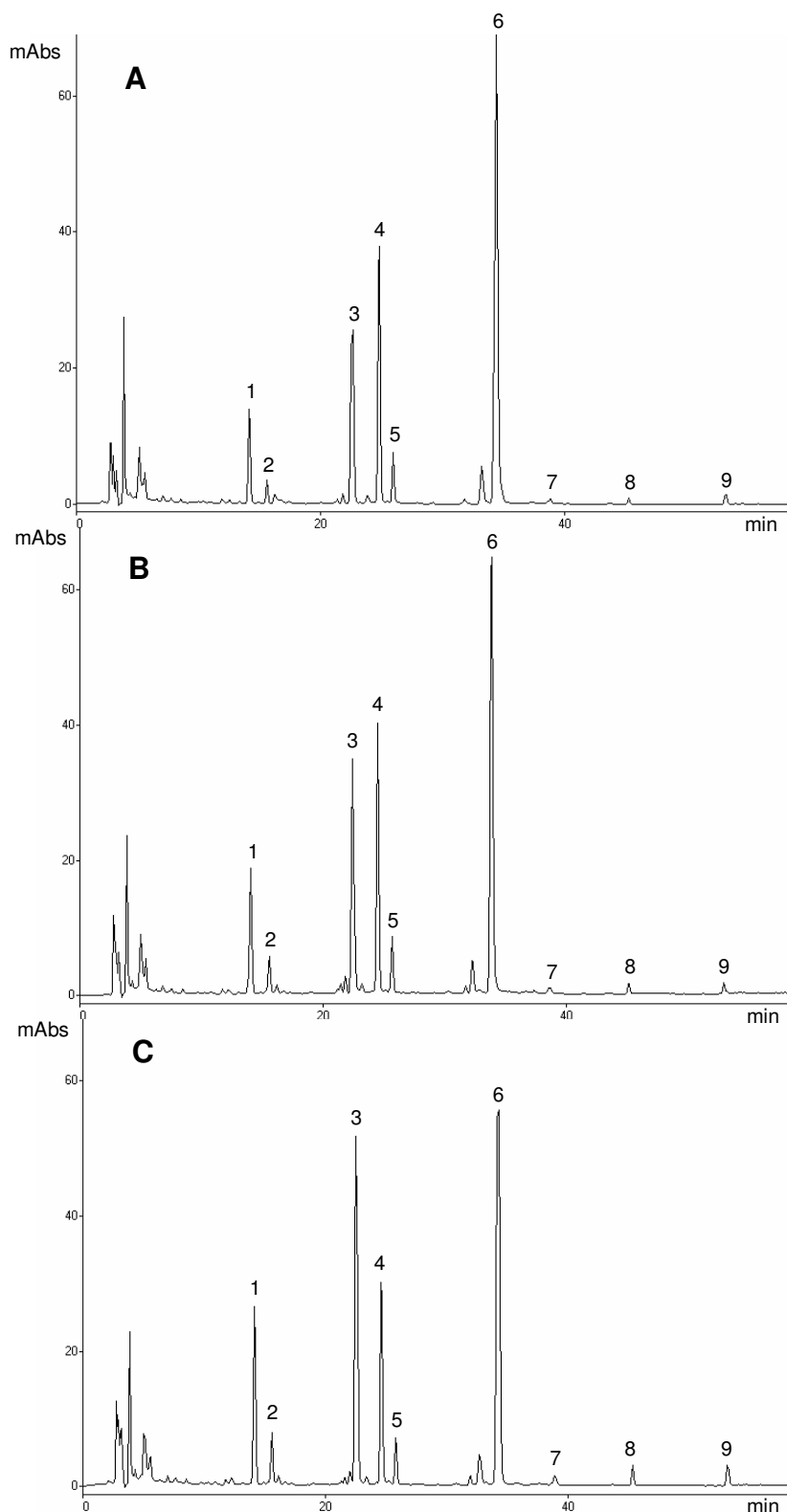


Figura 2 - Cromatogramas representativos dos teores de isoflavonas em grãos de soja do genótipo LOX LNN^R. **A** – Início do armazenamento; **B** – Após oito meses de armazenamento a 25 °C; e **C** - Após oito meses de armazenamento a 35 °C. (1) daidzina, (2) glicitina, (3) genistina, (4) 6"-O-malonildaizina, (5) 6"-O-malonilglicitina, (6) 6"-O-malonilgenistina, (7) daidzeína, (8) 6"-O-acetilgenistina e (9) genisteína.

Os efeitos do armazenamento sobre as formas maloniladas são mostrados na Figura 3. Os dois genótipos armazenados a 35 °C apresentaram redução nos teores de malonildaidzina no decorrer do tempo; entretanto, a 25 °C foi observado redução até o segundo mês de armazenamento, após o que apresentou oscilações no teor entre as épocas de avaliação para o genótipo 1 e tendência de aumento do teor no genótipo 2. Os teores de malonilglicitina aumentaram durante o armazenamento a 25 °C, e oscilações foram observadas nesses teores a 35 °C. Já para malonilgenistina a redução nos teores é clara em grãos de ambos os genótipos armazenados a 35 °C, não ocorrendo o mesmo a 25 °C, apresentando redução inicial e aumento posterior.

O aumento no teor de acetilgenistina, única forma acetilada detectada, foi evidente nos dois genótipos, nas duas temperaturas, sendo mais pronunciado a 35 °C (Figura 4). Esse aumento está provavelmente relacionado à diminuição no teor de malonilgenistina, que foi maior na temperatura de 35 °C.

Com relação à conversão observada entre algumas formas de isoflavonas, os dados encontrados na literatura referem-se, principalmente, a transformações ocorridas durante a extração de seus compostos sob diferentes condições ou durante o processamento da soja para obtenção de seus produtos derivados.

Kudou et al. (1991) demonstraram que em extrato etanólico de soja, obtido à temperatura ambiente, os principais constituintes foram as formas malonilglicosídicas, enquanto em extrato obtido a 80 °C as formas glicosídicas foram as principais, indicando que as malonil isoflavonas são termicamente instáveis e foram convertidas em suas correspondentes isoflavonas glicosídicas. Coward et al. (1998) mencionaram que a temperatura de extração de 4 °C proporcionou eficiente extração de isoflavonas, tanto quanto em temperaturas mais elevadas, contudo sem transformação do conteúdo de malonil isoflavonas original.

Wang e Murphy (1994) verificaram que na produção de extrato hidrossolúvel e tofu os teores de malonildaidzina e malonilgenistina decresceram, sendo acompanhado pelo aumento de acetildaidzina e acetilglicitina. As malonil isoflavonas podem ser transformadas em glicosil isoflavonas e acetil isoflavonas durante a extração industrial de óleo de soja, e

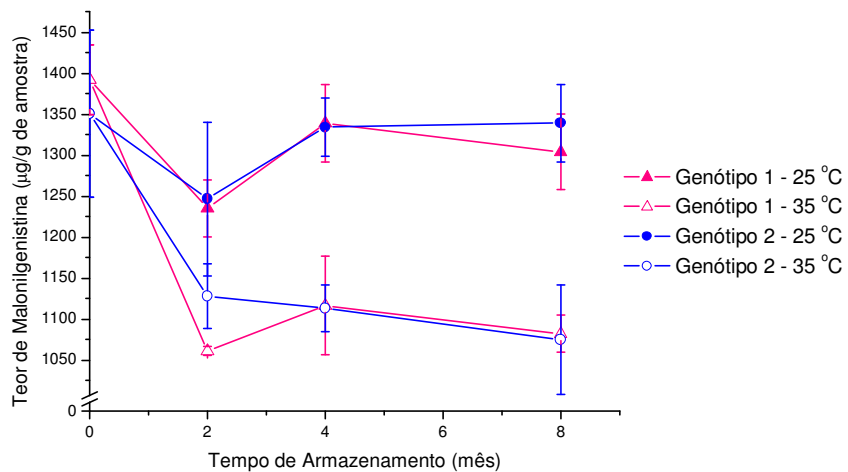
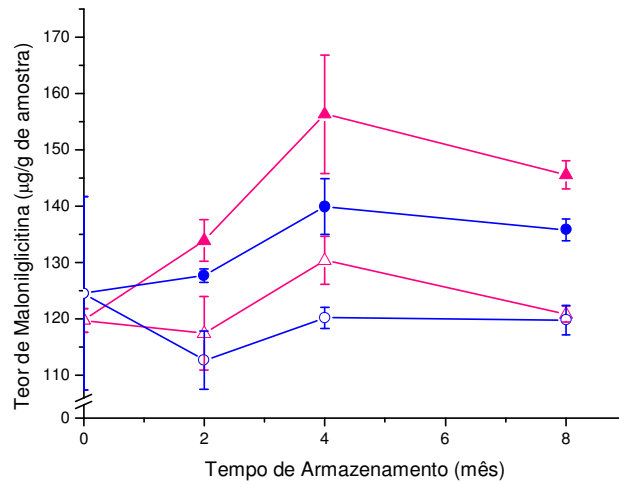
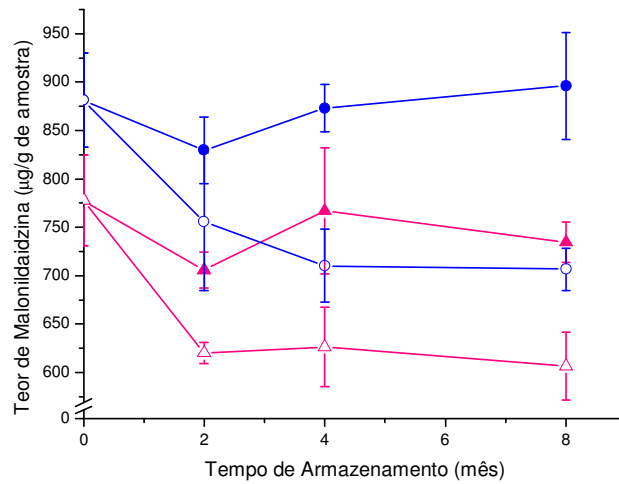


Figura 3 - Teores de malonildaidzina, malonilglicitina e malonilgenistina em grãos de soja dos genótipos LOX⁻LNN^R (genótipo 1) e LOX⁺LNN^N (genótipo 2) armazenados por oito meses a 25 e 35 °C. Os resultados, em base seca, constituem médias de três repetições \pm desvio-padrão.

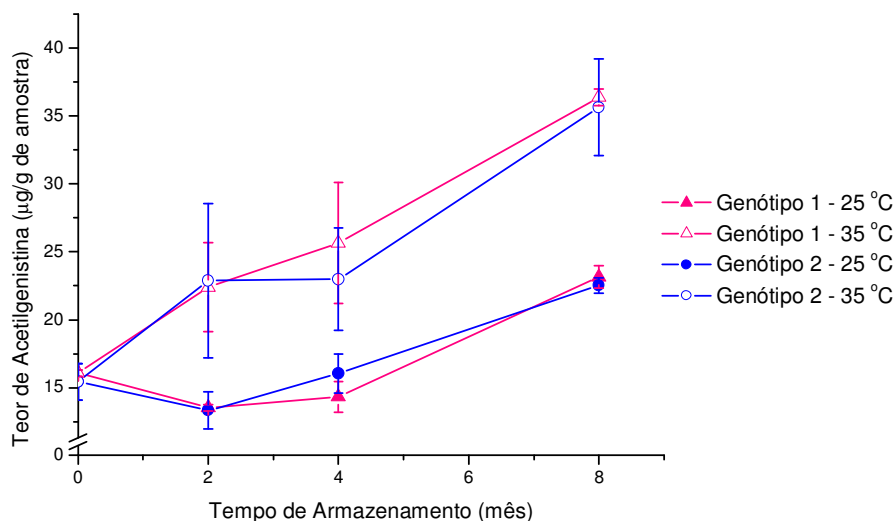


Figura 4 - Teores de acetilgenistina em grãos de soja dos genótipos LOX⁻LNN^R (genótipo 1) e LOX⁺LNN^N (genótipo 2) armazenados por oito meses a 25 e 35 °C. Os resultados, em base seca, constituem médias de três repetições \pm desvio-padrão.

acetil isoflavonas também podem ser, da mesma forma, convertidas em glicosil isoflavonas (PARK et al., 2002).

O aumento no teor de malonilglicetina talvez possa estar relacionado a um processo de síntese, pois os resultados apresentados na Figura 7 indicam aumento no teor de gliciteína total com o tempo de armazenamento. Hou e Chang (2002) observaram aumento no teor total de isoflavonas em grãos de soja até o terceiro mês de armazenamento, tanto a 84% de umidade relativa e 30 °C quanto a 57% de umidade relativa e 20 °C, não sendo ainda conhecido o mecanismo responsável por tal efeito.

Na Figura 5, pode-se observar o aumento nos teores de daidzina, glicetina e genistina no decorrer do armazenamento a 25 e 35 °C, sendo os maiores aumentos observados nos grãos armazenados a 35 °C. O aumento dessas formas glicosídicas, nas duas temperaturas de armazenamento, pode, assim, ser o resultado da desesterificação de malonil e acetil glicosídeos.

Hou e Chang (2002) observaram tendência oposta entre as mudanças apresentadas pelos glicosídeos e as formas malonilglicosídicas ao longo do armazenamento, tanto em condições de alta umidade relativa e alta

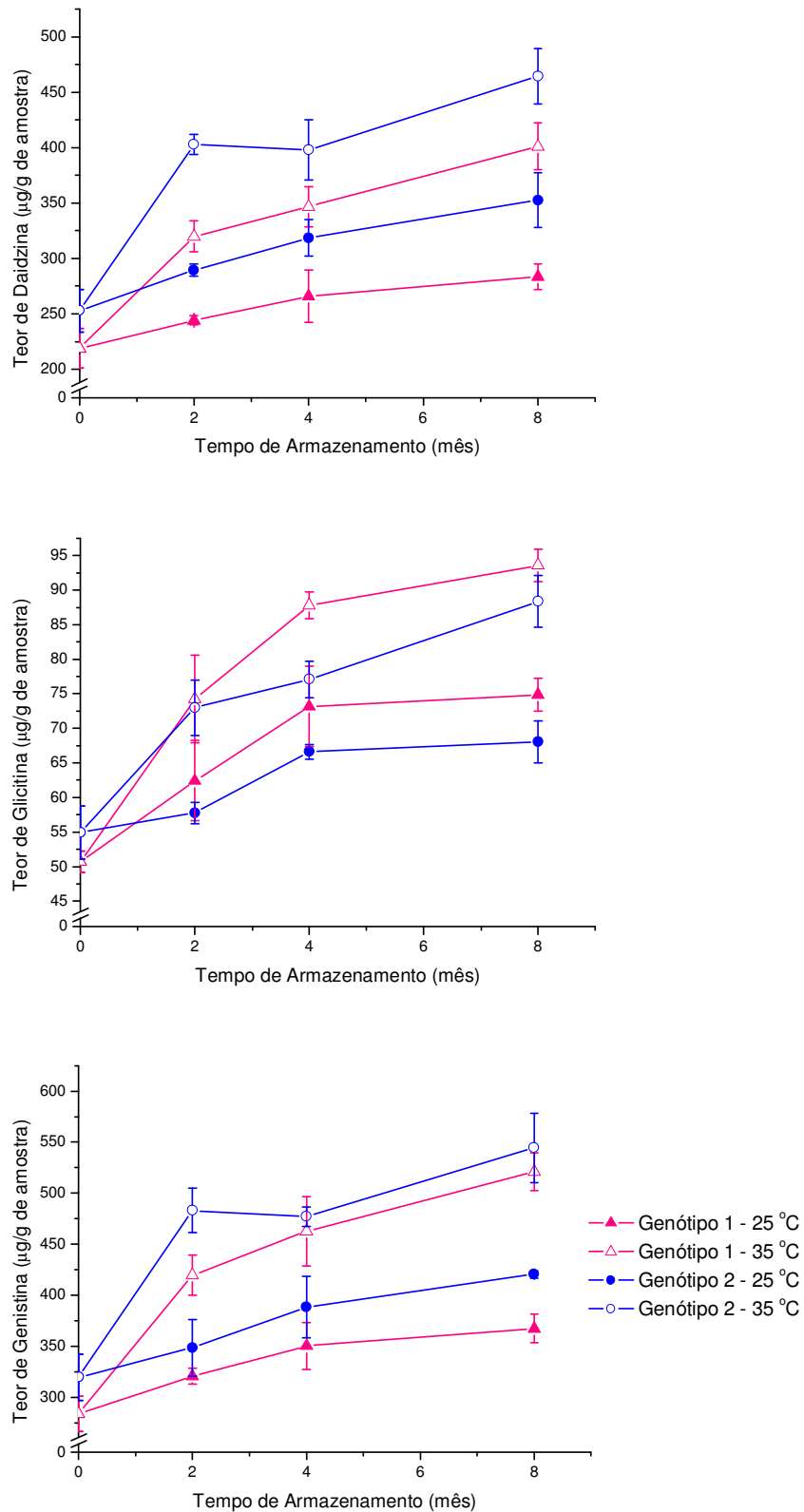


Figura 5 - Teores de daidzina, glicitina e genistina, formas glicosiladas de isoflavonas, em grãos de soja dos genótipos LOX⁻LNN^R (genótipo 1) e LOX⁺LNN^N (genótipo 2) armazenados por oito meses a 25 e 35 °C. Os resultados, em base seca, constituem médias de três repetições \pm desvio-padrão.

temperatura (84% de umidade relativa e 30 °C) como em condições mais amenas (57% de umidade relativa e 20 °C).

As alterações nos teores de daidzeína e genisteína, as formas agliconas de isoflavonas, detectadas nos genótipos avaliados, são apresentadas na Figura 6. A 25 °C, praticamente não houve variação nos teores ao longo do tempo, enquanto a 35 °C um aumento evidente foi observado até o segundo mês de armazenamento. Nesse período, coincidentemente, a enzima β -glicosidase manteve sua atividade, apresentando, no decorrer do tempo de armazenamento, tendência a declinar (Figura 12).

Segundo Hou e Chang (2002), a conversão de glicosídeos em agliconas nos grãos de soja durante o armazenamento pode ser causada por hidrólise por β -glicosidases. Esses autores observaram significativo aumento das formas agliconas ao longo do tempo ao armazenarem soja em condições de alta umidade e alta temperatura (84% de umidade relativa e 30 °C). No início do armazenamento, o teor de agliconas em relação ao teor total de isoflavonas foi de 1%, aumentando para 97% após nove meses. Concluíram, então, que essas condições de armazenamento podem fornecer ambiente favorável para as β -glicosidases em soja, hidrolisarem as formas glicosídicas de isoflavonas e seus ésteres malonil e acetil para formas agliconas. Entretanto, também em condições de armazenamento mais brandas (57% de umidade relativa e 20 °C), por 18 meses, foi observado aumento das agliconas com o tempo. Já em grãos armazenados a 4 °C não foi verificada alteração no perfil de isoflavonas. Ainda de acordo com esses autores, a conversão em formas agliconas pode conferir mais gosto amargo a produtos produzidos a partir de grãos submetidos à armazenagem em condições impróprias.

A enzima β -glicosidase tem como substrato as formas glicosídicas de isoflavonas liberando as agliconas. Sua atividade foi determinada por Carrão-Panizzi e Bordignon (2000) em cultivares de soja com diferentes teores das formas glicosídicas, e entre os cultivares não foi observado correlação significativa entre o teor de isoflavonas glicosídicas e a atividade da enzima.

Matsuura et al. (1989) demonstraram o aumento de daidzeína e genisteína pela ação de β -glicosidase em soja durante o processo de preparo

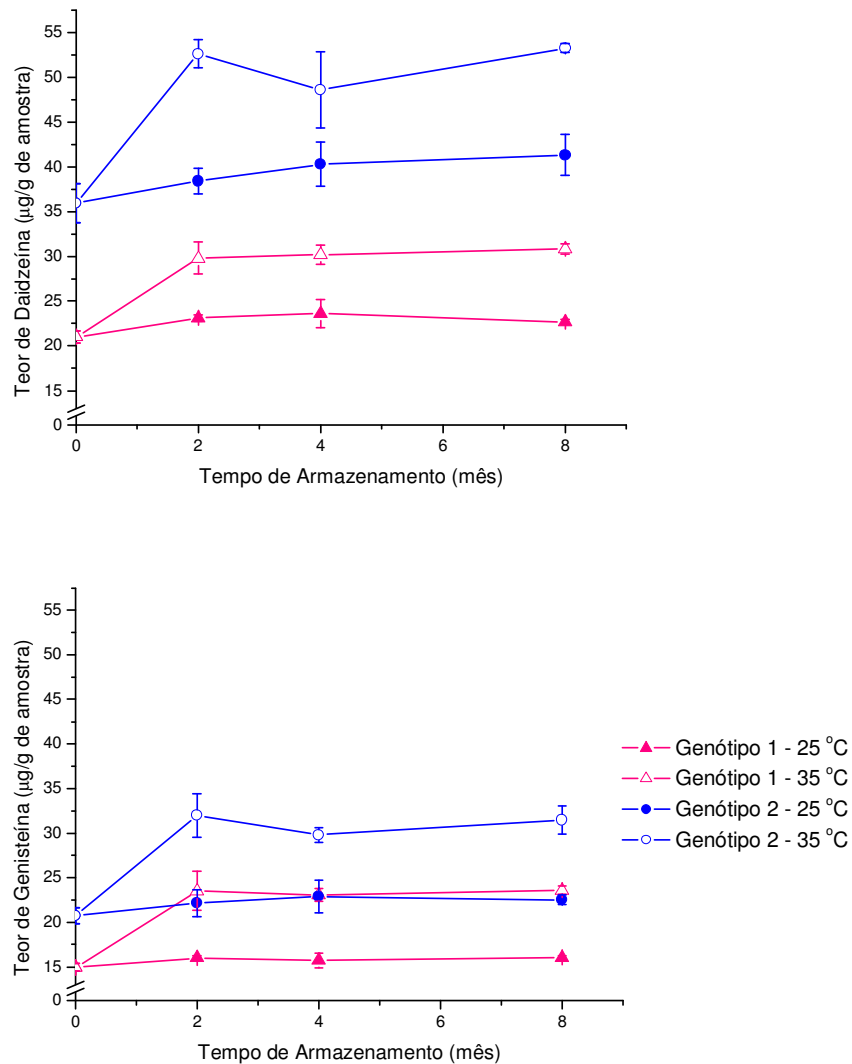


Figura 6 - Teores de daidzeína e genisteína, formas agliconas de isoflavonas, de grãos de soja dos genótipos LOX^{LNN}^R (genótipo 1) e LOX^{LNN}^N (genótipo 2) armazenados por oito meses a 25 e 35 °C. Os resultados, em base seca, constituem médias de três repetições ± desvio-padrão.

do extrato hidrossolúvel resultou em aumento no sabor residual indesejável. Araújo et al. (1997) também demonstraram que a β-glicosidase é responsável pela liberação de daidzeína e genisteína em grãos de soja imersos em água. Entretanto, segundo Kudou et al. (1991), todas as isoflavonas produzem efeito indesejável no sabor, como gosto amargo, adstringência e “sensação de boca seca”.

Nas Figuras 7 e 8 são apresentados os teores totais de cada forma aglicona e o teor global de isoflavonas, respectivamente. O genótipo 1, que apresenta ausência das isoenzimas lipoxigenases, não exibiu maior teor de isoflavonas. Oliveira (2003), ao estudar as variações ambientais e genotípicas nas correlações de isoflavonas e outros componentes bioquímicos da soja, concluiu que os teores médios de isoflavonas por forma (agliconas, β -glicosídeos, malonilglicosídeos e acetilglicosídeos), nos genótipos que sofreram eliminação genética de lipoxigenases, foram superiores aos dos genótipos normais nos contextos genéticos de CAC-1 e Garimpo-RCH.

3.2. Ensaio Enzimático de β -Glicosidases

3.2.1. Determinação do Tempo de Reação

Para determinar o tempo de reação a ser utilizado no ensaio enzimático, de forma a garantir condições de estado estacionário, um ensaio foi realizado como definido para a análise utilizando diferentes tempos de reação. No gráfico da Figura 9, relaciona-se a quantidade de produto formado em função do tempo. Os pontos descrevem uma reta, significando condições de estado estacionário, pois a variação da quantidade de produto formado em um período de tempo é constante. Com base nesses resultados foi definido o tempo de 15 min de reação.

3.2.2. Efeito do pH

A atividade de β -glicosidase foi determinada na faixa de pH compreendida entre 3 e 7,6, por 30 min, na temperatura de 40 °C, utilizando-se como fonte da enzima os extratos enzimáticos obtidos a partir dos dois genótipos em estudo e o pNPG como substrato. As maiores atividades de β -glicosidase foram verificadas na faixa de pH de 4,6 a 5,6, apresentando atividade máxima em pH 5,0 (Figura 10).

Três isoenzimas β -glicosidases (A, B e C), extraídas de cotilédone de soja, foram separadas em uma coluna de troca iônica CM-Sephadex C-50 por Matsuura e Obata (1993). As isoenzimas B e C foram submetidas a gel-filtração

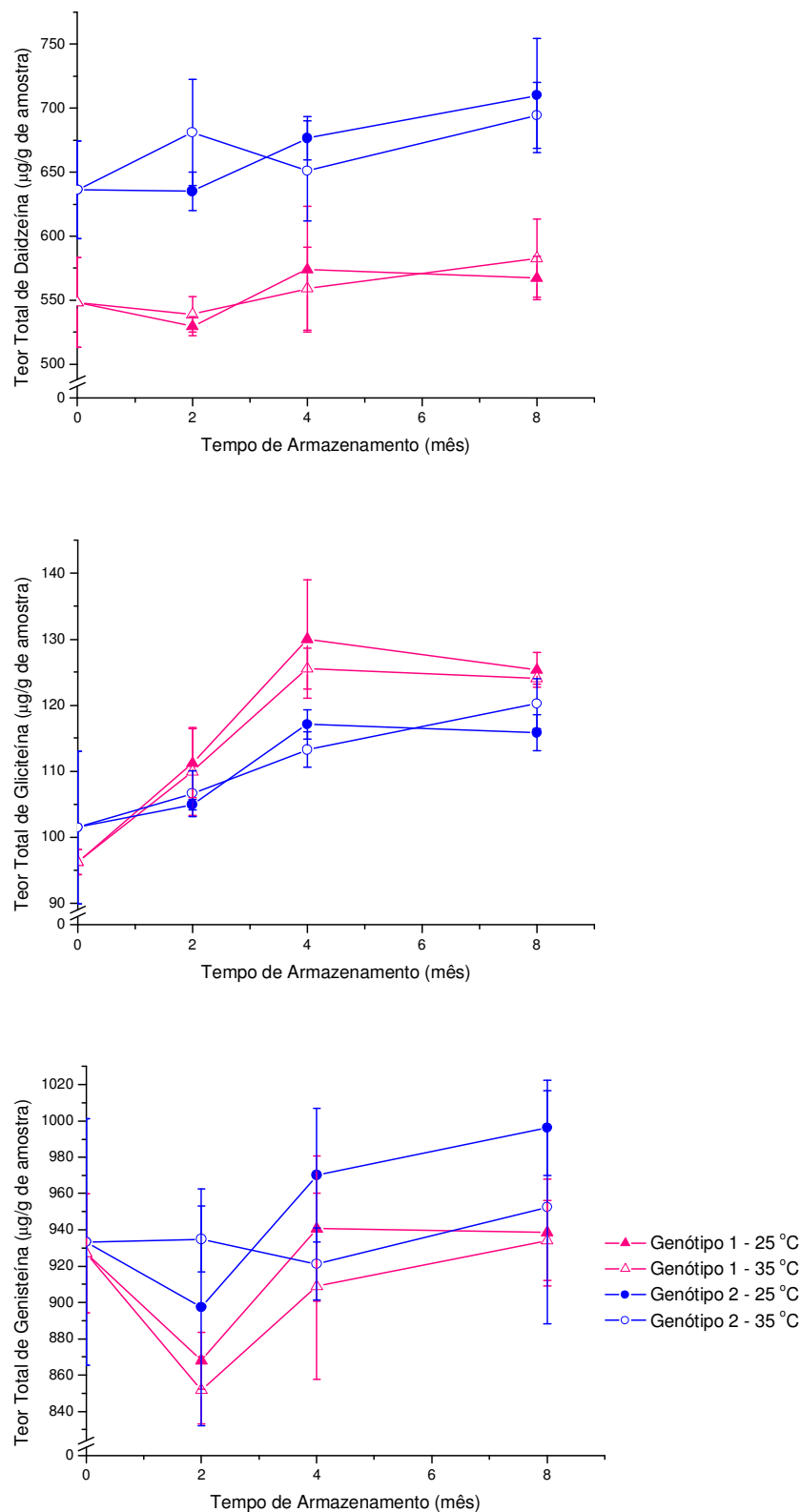


Figura 7 - Teores totais de daidzeína, genisteína e gliciteína (total = moles da isoflavona x massa molecular da forma aglicona) de grãos de soja dos genótipos LOX⁻LNN^R (genótipo 1) e LOX⁺LNN^N (genótipo 2) armazenados por oito meses a 25 e 35 °C. Os resultados, em base seca, constituem médias de três repetições ± desvio-padrão.

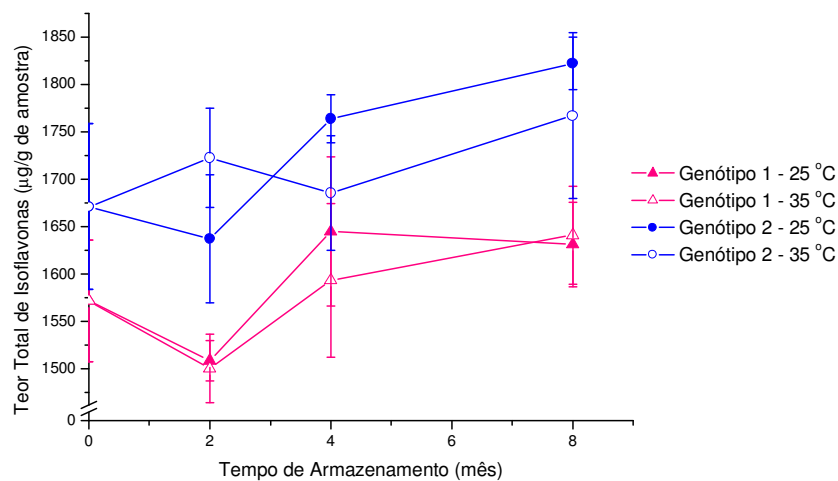


Figura 8 - Teores totais de isoflavonas (soma dos totais de agliconas) de grãos de soja dos genótipos LOX⁻LNN^R (genótipo 1) e LOX⁺LNN^N (genótipo 2) armazenados por oito meses a 25 e 35 °C. Os resultados, em base seca, constituem médias de três repetições \pm desvio-padrão.

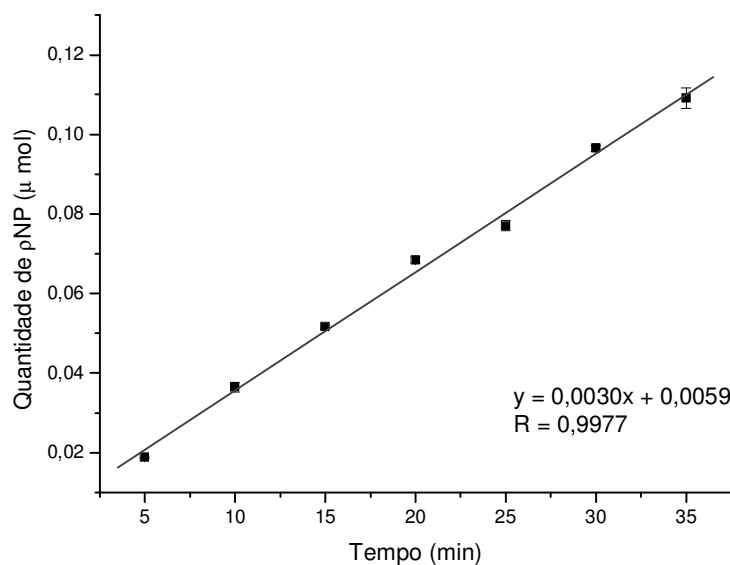


Figura 9 - Quantidade de produto formado em função do tempo de reação.

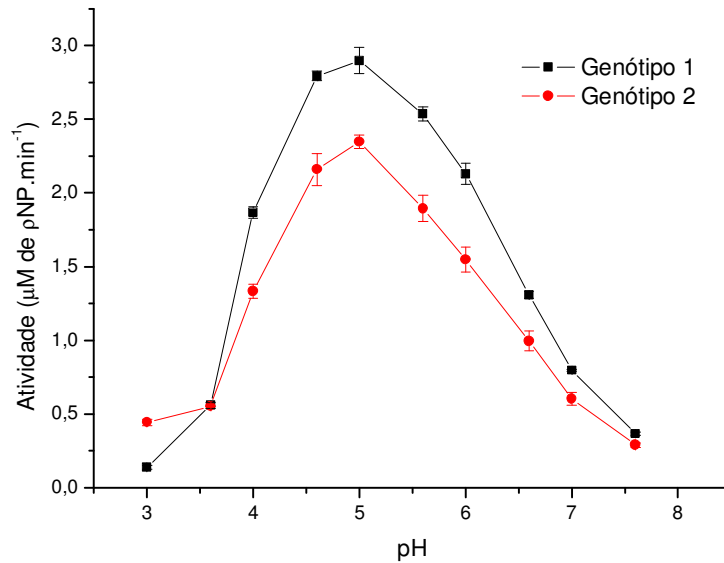


Figura 10 - Efeito da variação de pH na atividade da enzima β -glicosidase presente nos extratos enzimáticos obtidos a partir de sementes de grãos dos genótipos LOX⁻LNN^R (genótipo 1) e LOX⁺LNN^N (genótipo 2). Os resultados constituem médias de três repetições \pm desvio-padrão.

e as enzimas parcialmente purificadas, caracterizadas, apresentando um pH ótimo de 5,5. Matsuura et al. (1995) isolaram e caracterizaram a isoenzima β -glicosidase C de cotilédone de soja, apresentando máxima atividade em pH 4,5. As isoenzimas A, B e C foram capazes de hidrolisar as glicosil isoflavonas, daidzina e genistina, produzindo daidzeína e genisteína.

3.2.3. Efeito da Temperatura

O efeito da temperatura na atividade da enzima β -glicosidase presente nos extratos enzimáticos foi avaliado na faixa de temperatura entre 25 e 60 °C, em pH 5,0, utilizando pNPG como substrato (Figura 11). As maiores atividades de β -glicosidase foram observadas na faixa de temperatura de 45 a 55 °C. Na temperatura de 50 °C, observou-se a maior atividade enzimática.

As isoenzimas β -glicosidases B e C, de cotilédones de soja, parcialmente purificadas por Matsuura e Obata (1993), apresentaram máxima

atividade a 45 °C, e a β -glicosidase C isolada por Matsuura et al. (1995) apresentou a mesma temperatura ótima.

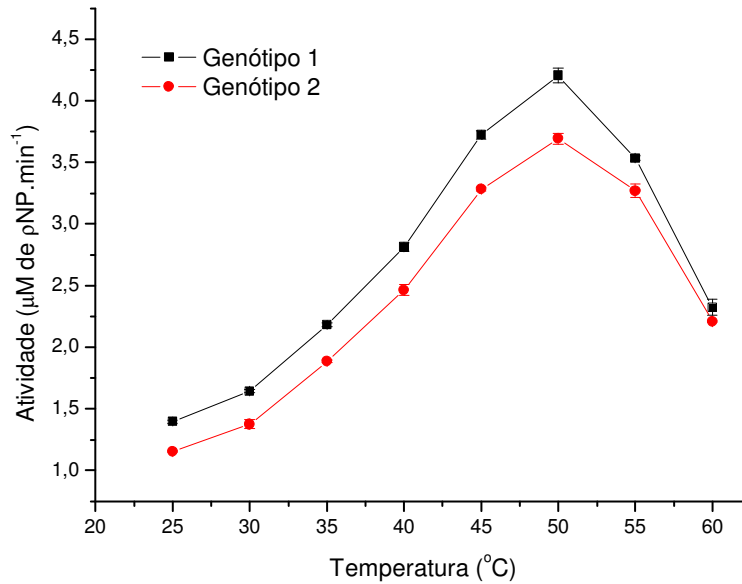


Figura 11 - Efeito da temperatura na atividade da enzima β -glicosidase presente nos extratos enzimáticos obtidos a partir de grãos dos genótipos LOX⁻LNN^R (genótipo 1) e LOX⁺LNN^N (genótipo 2). Os resultados constituem médias de três repetições \pm desvio-padrão.

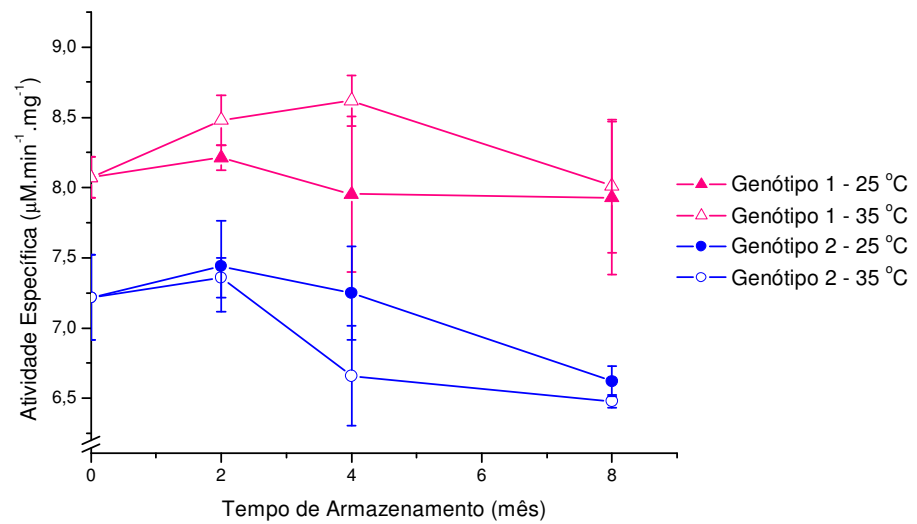


Figura 12 - Atividade de β -glicosidase em grãos de soja dos genótipos LOX^-LNN^R (genótipo 1) e LOX^+LNN^N (genótipo 2) armazenados por oito meses a 25 e 35 °C. Os resultados constituem médias de três repetições \pm desvio-padrão.

4. CONCLUSÕES

- O genótipo com ausência das isoenzimas lipoxigenases apresentou menor teor de isoflavonas que o genótipo com presença dessas isoenzimas.
- A composição em isoflavonas dos grãos de soja, de ambos os genótipos, não se manteve estável durante o período de armazenamento considerado (oito meses). Nesse período, pôde ser observado variação nos teores das diferentes formas de isoflavonas, tanto nos grãos armazenados a 25 °C quanto naqueles mantidos a 35 °C.
- No processo de interconversão de formas, parece ocorrerem eventos simultâneos envolvendo descarboxilação dos malonilglicosídeos para acetilglicosídeos, desesterificação de malonil e acetilglicosídeos para β -glicosídeos, e também uma possível transformação desses para as formas agliconas. Além desses eventos, processos de síntese podem estar envolvidos, pois, neste estudo, ligeiro aumento no teor de isoflavonas foi observado. O aumento de malonilglicitina ou das formas agliconas talvez possa ser resultado de síntese, porém o envolvimento das isoenzimas β -glicosidases no aumento das isoflavonas agliconas também deve ser considerado.

5. REFERÊNCIAS

ANDERSON, R. L.; WOLF, W. J. Compositional changes in trypsin inhibitors, phytic acid, saponins and isoflavones related to soybean processing. **J. Nutr.**, v. 125, p. 581S-588S, 1995.

ARAÚJO, J. M. A.; CARLOS, J. S. S.; SEDYAMA, C. S. Isoflavonas em grãos de soja: importância da atividade de β -glicosidase na formação do sabor amargo e adstringente. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 17, p. 137-141, 1997.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CARRÃO-PANIZZI, M. C. Avaliação de cultivares de soja quanto aos teores de isoflavonóides. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 31, p. 691-698, 1996.

CARRÃO-PANIZZI, M. C.; BORDINGNON, J. R. Activity of beta-glucosidase and levels of isoflavone glucosides in soybean cultivars affected by the environment. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 35, p. 873-878, 2000.

CARRAO-PANIZZI, M. Os benefícios da soja para a saúde humana. In: REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL, 23., 2001, Londrina. **Ata...** Londrina, PR: Embrapa-Soja, 2001. p. 189-193.

CARRÃO-PANIZZI, M.; BELÉIA, A. D. P.; PRUDÊNCIO-FERREIRA, S. H.; OLIVEIRA, M. C. N.; KITAMURA, K. Effects of isoflavones on beany flavor and astringency of soymilk and cooked whole soybean grains. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 34, p. 1045-1052, 1999.

CARRÃO-PANIZZI, M.; KITAMURA, K. Isoflavone content in Brazilian soybean cultivars. **Breeding Sci.**, v. 45, p. 295-300, 1995.

- CHOI, J. S. C.; KWON, T. W.; KIM, J. S. Isoflavone contents in some varieties of soybean. **Foods Biotech.**, v. 5, p. 167-169, 1996.
- COWARD, L.; SMITH, M.; KIRK, M.; BARNES, S. Chemical modification of isoflavones in soyfoods during cooking and processing. **Am. J. Clin. Nutr. (suppl)**, v. 68, p. 1486S-1491S, 1998.
- ELDRIDGE, A. C.; KWOLEK, W. F. Soybean isoflavones: effect of environment and variety on composition. **J. Agric. Food Chem.**, v. 31, p. 394-396, 1983.
- GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Determinação de isoflavonas em derivados de soja. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 21, p. 86-93, 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. **J. Agric. Food Chem.**, v. 49, p. 2839-2843, 2001.
- HOECK, J. A.; FEHR, W. R.; MURPHY, P. A.; WELKE, G. A. Influence of genotype and environment on isoflavone contents of soybean. **Crop Sci.**, v. 40, p. 48-51, 2000.
- HONORÉ, E. K.; WILLIAMS, J. K.; ANTHONY, M. S. Enhancement of coronary vasodilatation by soy phytoestrogens and genistein. **Circulation**, v. 92 (abstract), p. 349, 1995.
- HOU, H. J.; CHANG, K. C. Interconversions of isoflavonas in soybeans as affected by storage. **J. Food Sci.**, v. 67, p. 2083-2089, 2002.
- JACKSON, C. J. C.; DINI, J. P.; LAVANDIER, C.; RUPASINGHE, H. P. V.; FAULKNER, H.; POYSA, V.; BUZZELL, D.; DEGRANDIS, S. Effects of processing on the content and composition of isoflavones during manufacturing of soy beverage and tofu. **Process Biochem.**, v. 37, p. 1117-1123, 2002.
- KANAZAWA, T.; OSANAI, T.; ZHANG, X. S. Protective effects of soy protein on the peroxidisability of lipoproteins in cerebral vascular diseases. **J. Nutr.**, v. 125, p. 639S-646S, 1995.
- KITAMURA, K.; IGITA, K.; KIKUCHI, A.; KUDOU, S.; OKUBO, K. Low isoflavone content in some early maturing cultivars, so-called "summer-type soybeans" (*Glycine max* (L.) Merrill). **Japan. J. Breed.**, v. 41, p. 651-654, 1991.
- KUDOU, S.; FLEURY, Y.; WELTI, D.; MAGNOLATO, D.; UCHIDA, T.; KITAMURA, K.; OKUBO, K. Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds (*Glycine max* Merrill). **Agric. Biol. Chem.**, v. 55, p. 2227-2233, 1991.
- LEE, S. J.; YAN, W.; AHN, J. K.; CHUNG, M. Effects of year, site, genotype and their interactions on various soybean isoflavones. **Field Crops Res.**, v. 4150, p. 1-12, 2002.

MATSUURA, M.; OBATA, A. β -Glucosidases from soybeans hydrolyze daidzin and genistin. **J. Food. Sci.**, v. 58, p. 144-147, 1993.

MATSUURA, M.; OBATA, A.; FUKUSHIMA, D. Objectionable flavor of soy milk developed during the soaking of soybeans and its control. **J. Food. Sci.**, v. 54, p. 602-605, 1989.

MATSUURA, M.; SASAKI, J.; MURAO, S. Studies on β -glucosidases from soybeans that hydrolyze daidzin and genistin: isolation characterization of an isozyme. **Biosci. Biotech. Biochem.**, v. 59, p. 1623-1627, 1995.

McILVAINE, T. C. A buffer solution for colorimetric comparison. **J. Biol. Biochem.**, v. 49, p. 183-186, 1921.

MESSINA, M. Soyfoods and soybean phyto-oestrogens (isoflavones) as possible alternatives to hormone replacement therapy (HRT). **European J. Cancer**, v. 36, p. S71-S77, 2000.

NILAUSEN, K.; MEINERTZ, H. Lipoprotein(a) and dietary proteins: casein lowers lipoprotein(a) concentrations as compared with soy protein. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 69, p. 419-425, 1999.

OLIVEIRA, M. I. P. **Variações ambientais e genotípicas nas correlações de isoflavonas e outros componentes bioquímicos da soja**. Viçosa, MG: UFV, 2003. 115 f. Tese (Doutorado em Bioquímica Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

PARK, Y. K.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; MASCARENHAS, H. A. A.; SCAMPARINI, A. R. P. Conversão de malonil- β -glicosil isoflavonas glicosiladas presentes em alguns cultivares de soja brasileira. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 22, p. 130-135, 2002.

PORTER, J. E.; HERRMANN, K. M.; LADISCH, M. R. Integral kinetics of α -galactosidase purified from *Glycine max* for simultaneous hydrolysis of stachyose and raffinose. **Biotech. Bioengin.**, v. 35, p. 15-22, 1990.

SETCHELL, K. D. R. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 6 (Suppl.), p. 1333S-1346S, 1998.

SONG, T.; BARUA, K.; BUSEMAN, G.; MURPHY, P. A. Soy isoflavone analysis: quality control and a new internal standard. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 68 (Suppl.), p. 1474S-1479S, 1998.

TSUKAMOTO, C.; SHIMADA, S.; IGITA, K.; KUDOU, S.; KOKUBUN, M.; OKUBO, K.; KITAMURA, K. Factors affecting isoflavone content in soybean seeds: changes in isoflavones, saponins, and composition of fatty acids at different temperatures during seed development. **J. Agric. Food Chem.**, v. 43, p. 1184-1192, 1995.

WANG, C.; MA, Q.; PAGADALA, S.; SHERRARD, M. S.; KRISHNAN, P. G. Changes of isoflavones during processing of soy protein isolates. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v.75, p.337-341, 1998.

WANG, H. J.; MURPHY, P. A. Isoflavone composition of American and Japanese soybeans in Iowa: effects of variety, crop year, and location. **J. Agric. Food Chem.**, v. 42, p. 1674-1677, 1994.

WANG, H. J.; MURPHY, P. A. Mass balance study of isoflavones during soybean processing. **J. Agric. Food Chem.**, v. 44, p. 2377-2383, 1996.