



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MARIAH BENINE RAMOS SILVA

BROTOS DE SOJA:
AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO SOBRE AS
MEDIDAS FÍSICAS E TEOR DE ISOFLAVONAS E
CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

Londrina
2015

MARIAH BENINE RAMOS SILVA

BROTOS DE SOJA:
AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO SOBRE AS
MEDIDAS FÍSICAS E TEOR DE ISOFLAVONAS E
CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, nível Mestrado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientador: Profa. Dra. Elza Louko Ida
Co-Orientador: Dr. Marcelo Álvares de Oliveira

Londrina
2015

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S586b Silva, Mariah Benine Ramos.

Brotos de soja : avaliação do processo de produção sobre as medidas físicas e teor de isoflavonas e caracterização química / Mariah Benine Ramos Silva. – Londrina, 2015.
74 f. : il.

Orientador: Elza Iouko Ida.

Coorientador: Marcelo Álvares de Oliveira.

Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2015.

Inclui bibliografia.

1. Alimentos – Análise – Teses. 2. Alimentos – Teor vitamínico – Teses. 3. Soja – Sementes – Viabilidade – Teses. 4. Isoflavonas – Teses. 5. Soja – Cultivo – Teses. 6. Inibidores da tripsina – Teses. I. Ida, Elza Iouko. II. Oliveira, Marcelo Álvares de. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. IV. Título.

CDU 641.002.61

MARIAH BENINE RAMOS SILVA

**BROTOS DE SOJA: AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO
SOBRE AS MEDIDAS FÍSICAS E TEOR DE ISOFLAVONAS E
CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, nível Mestrado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Elza Louko Ida
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Thaís de Souza Rocha
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Dra. Vera de Toledo Benassi
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
– Embrapa

Londrina, 31 de março de 2015.

Dedico

*À Deus,
por me abençoar e caminhar sempre
comigo, nunca me deixando desistir. Aos
meus pais Ivo Ramos da Silva e
Mariângela Benine Ramos Silva e meu
irmão Otávio Benine Ramos Silva pelo
amor e por estarem sempre ao meu lado
me incentivando.*

AGRADECIMENTOS

Lembrar-se de todas as pessoas que contribuíram para a elaboração desta Dissertação é uma tarefa difícil. Algumas pessoas que, com pequenas ações, porém essenciais, me incentivaram a viver e a lutar por este trabalho. Para estas, o meu agradecimento está no coração. Outras pessoas estiveram sempre presentes ao meu lado, incentivando e colaborando para que eu conseguisse chegar até aqui, e para elas, o meu agradecimento está no coração e aqui. São elas:

À minha orientadora Prof^a. Dra. Elza Louko Ida, pela oportunidade de ter sido sua aluna, pela dedicação e incentivo, pela paciência e amizade e pelos conhecimentos transmitidos, decisivos e condutores neste trabalho e em minha vida profissional.

Ao Dr. Marcelo Álvares de Oliveira, Pesquisador da Embrapa Soja, pelo conhecimento e experiência, pela amizade e incentivo e pelas contribuições neste trabalho e em minha vida profissional.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina pela oportunidade em realizar o Mestrado e pela contribuição na minha formação acadêmica e profissional.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária/Embrapa Soja pela oportunidade em realizar o Estágio de Pós Graduação, em especial à Giovana Maria de Navarro Mendonça, Ivone Chousino Silva, Jéssica Franzão Ganzaroli, José Marcos Gontijo Mandarino, Maria do Carmo Clemente, Rodrigo Santos Leite e Vera de Toledo Benassi.

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/CAPES/MEC pela concessão da bolsa de estudos de Mestrado.

À todos os meus amigos, em especial aos que fiz durante o Mestrado e que me ajudaram durante esse período, Alessandra Bosso, Cíntia Ladeira Handa, Fernando Sanches de Lima, Janaína de Carvalho Andrade, Leonardo Fonseca Maciel, Lucas Caldeirão Rodrigues Miranda, Maria Rita Alaniz Porto, Tahis Regina Baú e Uenifer Rodrigues Couto.

SILVA, Mariah Benine Ramos. **Brotos de soja**: avaliação do processo de produção sobre as medidas físicas e teor de isoflavonas e caracterização química. 2015. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

RESUMO

O processo de germinação de sementes pode ser utilizado como um método eficiente e economicamente viável para melhorar o valor nutritivo e funcional da soja. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos das variáveis do processo de germinação de soja BRS216 sobre as medidas físicas e teor das diferentes formas de isoflavonas, seguido da caracterização dos brotos quanto à composição química, vitamina C, atividade de inibidores de tripsina e teor de isoflavonas. As sementes de soja cultivar BRS216 foram submetidas ao processo de germinação, utilizando o delineamento experimental 2^3 . Foram investigados os efeitos das variáveis como o tempo de maceração (horas), frequência de irrigação (horas) e germinação (dias) sobre as funções resposta: comprimento dos brotos (cm), rendimento dos brotos (%), teor de β -glicosídeos, malonilglicosídeos, agliconas e isoflavonas totais dos brotos ($\mu\text{mol/g}$). O comprimento dos brotos foi medido com régua e o rendimento foi calculado pela relação entre os brotos e as sementes de soja multiplicada por 100. A separação e quantificação das isoflavonas foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a determinação da vitamina C foi realizada por método titulométrico e a atividade de inibidores de tripsina por método espectrofotométrico. Para produção de brotos de soja o efeito do tempo de maceração e de germinação foi linear positivo e significativo sobre o comprimento dos brotos, enquanto que para o rendimento somente o efeito do tempo de germinação foi linear positivo e significativo. Com relação ao teor de isoflavonas malonilglicosídeos, agliconas e isoflavonas totais, somente o efeito do tempo de germinação foi linear negativo e significativo. Para obter brotos de soja com características próprias, comprimento e rendimento adequados, maior teor de isoflavonas malonilglicosídeos, agliconas e isoflavonas totais, o processo de germinação deve ser realizado utilizando 6 horas de maceração, 3 dias de germinação e independente da frequência de irrigação. Os brotos de soja com características próprias mantiveram sua composição química, aumento de 61% na vitamina C, redução de 19,10% na atividade de inibidores de tripsina e aumento de 20,8%, 82,98%, 131,57% e 73,38% no teor de isoflavonas β -glicosídeos, malonilglicosídeos, agliconas e isoflavonas totais respectivamente, em relação às sementes não germinadas.

Palavras-chave: Soja. Germinação. Brotos de soja. Isoflavonas. Vitamina C. Inibidores de tripsina.

SILVA, Mariah Benine Ramos. **Soybean sprouts:** evaluation of the production process on physical measures and isoflavones content and chemical characterization. 2015. 74 p. Dissertation (Master's Degree in Food Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

ABSTRACT

The process of germination can be used as an efficient and economically viable method to improve nutritional and functional properties of soybean. The objective of this work was to evaluate the effects of variables on the germination process of soybean BRS216 on the physical measurements and content of different forms of isoflavones, followed by the characterization of soybean sprouts in chemical composition, vitamin C, activity of trypsin inhibitors and isoflavones. The soybean seeds cultivar BRS216 were submitted to germination using the experimental design 2³. Were investigated the effects of variables as soaking time (hours), irrigation frequency (hours) and germination (days) on the response functions length of sprouts (cm), yield of sprouts (%), content of β -glucosides, malonylglucosides, aglycones and total isoflavones of sprouts ($\mu\text{mol/g}$). The length of sprouts was measured with a ruler and the yield was calculated by the ratio of the soybean sprouts and seeds multiplied by 100. The separation and quantification of isoflavones was performed by high performance liquid chromatography (HPLC), determination of vitamin C was performed by titrimetric method and the activity of trypsin inhibitors by the spectrophotometric method. For soybean sprouts, the effect of soaking and germination time was linear positive and significant over the length of sprouts, while on the yield of sprouts only the effect of germination time was linear positive and significant. In relation to content of isoflavones malonylglucosides, aglycones and total isoflavones of sprouts, only the effect of germination time was linear negative and significant. To get soybean sprouts with its own characteristics, appropriate length and yield, higher levels of malonylglucosides, aglycones, and total isoflavones, the germination should be performed using 6 hours of soaking and 3 days of germination, independent of the irrigation frequency. The soybean sprouts with its own characteristics maintained their chemical composition, increase 61% of vitamin C, 19.10% reduction in activity of trypsin inhibitors and increase 20.8%, 82.98%, 131.57% and 73.38% on the content of isoflavones β -glucosides, malonylglucosides, aglycones and total isoflavones respectively when compared to non-germinated seeds.

Key words: Soybeans. Germination. Soybean sprouts. Isoflavones. Vitamin C. Trypsin inhibitor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura da semente de soja.....	18
Figura 2 – Estrutura geral de flavonoides.....	20
Figura 3 – Estruturas químicas e radicais das isoflavonas agliconas, glicosídicas e glicosídicas conjugadas	21
Figura 4 – Estruturas do Ácido L-ascórbico e Ácido L-deidroascórbico e suas formas isoméricas	22
Figura 5 – Recipiente em que as sementes de soja BRS216 foram germinadas.....	33
 ARTIGO: VARIÁVEIS DO PROCESSO DE GERMINAÇÃO DE SOJA ALTERAM O TEOR DE ISOFLAVONAS E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS BROTOS	
 Figura 1 – Recipiente utilizado para o processo de germinação das sementes de soja BRS216 (a) e brotos de soja produzidos (b).....	71
Figura 2 – Superfície de resposta para brotos de soja BRS216 em função do tempo de maceração e germinação. (a) Cbro. (b) % Rend. (c) Brotos de soja obtidos em diferentes condições de processo.....	72
Figura 3 – Superfície de resposta para brotos de soja BRS216 em função do tempo de maceração e germinação. (a) Mgli. (b) Agli. (c) isto	73

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Delineamento experimental 2^3 para processo de germinação de soja com os níveis das variáveis independentes codificadas e não codificadas.....34
- ARTIGO:** VARIÁVEIS DO PROCESSO DE GERMINAÇÃO DE SOJA ALTERAM O TEOR DE ISOFLAVONAS E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS BROTOS
- Tabela 1** – Efeito das variáveis do processo de germinação de soja BRS216 sobre as funções respostas Cbro, %Rend, β gli, Mgli, Agli e isto68
- Tabela 2** – Composição química, vitamina C e atividade de inibidores de tripsina nas sementes e nos brotos de soja BRS21669
- Tabela 3** – Perfil de isoflavonas nas sementes e nos brotos de soja BRS21670

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	14
2.1	OBJETIVO GERAL	14
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1	ASPECTOS GERAIS DA SOJA	15
3.2	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA SOJA	17
3.2.1	Isoflavonas.....	19
3.2.2	Vitamina C	22
3.2.3	Inibidores de Tripsina.....	23
3.3	PROCESSO DE GERMINAÇÃO	25
3.4	BROTOS COMESTÍVEIS.....	30
4	MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1	MATÉRIA-PRIMA E REAGENTES	32
4.2	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	32
4.2.1	Processo de germinação de soja.....	32
4.2.2	Efeito das variáveis do processo de germinação de soja sobre as medidas físicas e teor das diferentes formas de isoflavonas.....	33
4.3	PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS	34
4.3.1	Medidas do comprimento e rendimento dos brotos de soja.....	34
4.3.2	Determinação do teor de isoflavonas.....	35
4.3.3	Determinação da composição química	36
4.3.4	Determinação da vitamina C.....	36
4.3.5	Determinação da atividade de inibidores de tripsina.....	36
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
5	REFERENCIAS	38

6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
6.1	ARTIGO CIENTÍFICO: VARIÁVEIS DO PROCESSO DE GERMINAÇÃO DE SOJA ALTERAM O TEOR DE ISOFLAVONAS E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS BROTOS	47
7	CONCLUSÕES	74

1 INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max (L.) Merril*) é uma planta pertencente à família das leguminosas e é um produto agrícola de grande interesse mundial, graças à versatilidade de aplicação dos grãos em produtos para a alimentação humana, alimentação animal e indústria química. A cada ano, a produção mundial de soja aumenta, e por isso sua cultura é considerada como *commodity* frente ao seu valor econômico nos mercados nacional e internacional. O Brasil é o segundo maior produtor de soja do mundo, sendo a leguminosa cultivada em várias regiões do país (EMBRAPA, 2015; SILVA et al., 2006).

As sementes de soja são compostas por 40% de proteínas, 20% de óleo, 35% de carboidratos e 5% de cinzas (LIU, 1997), sendo uma importante alternativa para a nutrição humana, excelente fonte de proteínas, carboidratos, vitaminas lipossolúveis, principalmente vitamina E, minerais como ferro, cálcio e zinco, antioxidantes e ácidos graxos (CARRÃO-PANIZZI; BORDIGNON, 2000).

Além da alta qualidade da proteína, a soja e seus derivados são também fontes de compostos fenólicos, como os flavonoides e isoflavonas, principalmente. As isoflavonas da soja podem ser encontradas em 12 diferentes formas, como as β -glicosídicas (daidzina, genistina e glicitina), que apresentam uma glicose ligada ao anel benzeno, e suas respectivas formas conjugadas: acetilglicosídica (acetil-daidzina, acetil-genistina e acetil-glicitina) e malonilglicosídica (malonil-daidzina, malonil-genistina e malonil-glicitina), além das agliconas (daidzeína, genisteína e gliciteína), não ligadas à molécula de glicose (KUDOU et al., 1991).

As isoflavonas agliconas são absorvidas mais rapidamente pelo organismo, quando comparadas às formas glicosídicas, e possuem atividade biológica mais acentuada (FUKUTAKE et al., 1996; IZUMI et al., 2000). A presença das isoflavonas agliconas no grão de soja é resultante da atividade da enzima β -glicosidase, que converte principalmente as formas glicosídicas em agliconas.

Atualmente o consumo de isoflavonas de soja tem sido associado à diminuição do risco de algumas doenças. Têm sido demonstrados que as isoflavonas são eficazes no tratamento do câncer, dos sintomas da menopausa, de doenças cardiovasculares e da osteoporose, além de apresentarem capacidade

antioxidante e inibir a ação de radicais livres que são a causa de muitos problemas relacionados à saúde (BANERJEE; WANG; SARKAR, 2008; BARBOSA et al., 2006; FARINA et al., 2006).

A germinação dos grãos de soja provoca alterações no teor de isoflavonas totais e de suas diferentes formas, podendo ocorrer o aumento dos teores em determinadas partes do grão de soja germinado, como os cotilédones, e redução em outras, como as radículas. Assim, mudanças no conteúdo de isoflavonas dependem da fase de germinação e do metabolismo fisiológico das sementes (RIBEIRO et al., 2006).

O processo de germinação tem sido proposto como um método eficiente e economicamente viável para a melhoria das qualidades nutricionais da soja, uma vez que proporciona aumento do valor nutritivo devido a maior digestibilidade e eficiência proteica (FERNANDEZ-OROZCO et al., 2008), além do aumento da biodisponibilidade de minerais e vitaminas, principalmente a vitamina C. Durante a germinação, ocorre também uma redução dos fatores considerados antinutricionais, tais como inibidores de proteases, fitatos e lectinas, assim como a hidrólise de oligossacarídeos, como rafinose e estaquiose (WANG; FIELDS, 1978; MOSTAFA; RAHMA, 1987; VANDERSTOEP, 1981; BORDINGNON et al., 1995; BAÚ et al. 1997).

Denomina-se alimento germinado ou broto qualquer semente que é estimulada pelo contato com a água, ar e calor, e tem como resultado o crescimento. As sementes germinadas irão formar o caule e as folhas, que se preenchem pouco a pouco com clorofila, originando os brotos (LOURES, 2007). A produção de brotos é rápida (3 a 7 dias), e pode ser realizada em qualquer época do ano, sem a necessidade de solo e luz solar direta. Por não requerer aplicação de qualquer tipo de adubo ou defensivo, os brotos são alimentos totalmente naturais, que utilizam apenas as reservas armazenadas nas sementes para que estas germinem e alcancem o tamanho ideal de consumo. Os brotos frescos são boas fontes de minerais, vitaminas e proteínas, e apresentam baixo valor calórico, sendo apreciados pelo seu paladar, valor nutritivo e medicinal (VIEIRA; LOPES, 2001).

A produção de brotos de soja no Brasil é muito restrita ou quase inexistente, e para que haja o estabelecimento de um mercado consumidor, são necessárias tecnologias que garantam a produção dos brotos em larga escala, além

de cultivares de soja adaptadas para o processo e técnicas de processamento que garantam a segurança alimentar do produto, viabilizando, assim, a sua comercialização (OLIVEIRA et al., 2013). Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar as variáveis do processo de germinação de soja e seus efeitos sobre as características físicas e teor das diferentes formas de isoflavonas, bem como a composição química, vitamina C e atividade de inibidores de tripsina dos brotos de soja.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as variáveis do processo de germinação soja e seus efeitos sobre as medidas físicas e teor das diferentes formas de isoflavonas, bem como a sua composição química, vitamina C e atividade de inibidores de tripsina dos brotos de soja.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Aplicar o delineamento experimental 2^3 para avaliar o efeito das variáveis do processo de germinação de soja sobre o seu comprimento, rendimento e teor das diferentes formas de isoflavonas dos brotos de soja.

Caracterizar os brotos de soja quanto à sua composição química, vitamina C, atividade de inibidores de tripsina e teor das diferentes formas de isoflavonas e comparar com as sementes não germinadas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ASPECTOS GERAIS DA SOJA

Evidências histórica e geográfica indicam que a soja teve origem no continente asiático, e seu cultivo na China foi registrado há cerca de 5.000 anos, quando os chineses a consideravam como um dos cinco grãos sagrados (LIU, 1997). Foi introduzida no Japão por volta de 200 a 300 anos antes da Era Cristã. Em 1740 chegou à Europa e, em 1804 foi pela primeira vez citada nos Estados Unidos, em cultivo na Pensilvânia (PROBST; JUDD, 1973).

No Brasil, os primeiros registros da soja ocorreram em 1882 no Estado da Bahia. Posteriormente, em 1891 o grão foi introduzido em São Paulo e Rio Grande do Sul (SANTOS 1988). Em 1908, com a chegada dos imigrantes japoneses em São Paulo, o plantio desta leguminosa foi aos poucos se difundindo no meio rural. Em Minas Gerais, a soja foi introduzida na década de 1920, em Santa Catarina na década de 1930, em Goiás em 1950 e, nos demais Estados da região Centro, Norte e Nordeste a introdução ocorreu principalmente a partir da década de 1970 (MIYASAKA; MEDINA, 1981).

O Brasil se destacou em relação aos outros países, devido ao escoamento da safra brasileira ocorrer na entressafra americana, quando os preços atingem as maiores cotações. Assim, o país passou a investir em tecnologia para a adaptação da cultura às condições brasileiras, processo liderado pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA - Soja). Estes investimentos possibilitaram a “tropicalização” da soja, permitindo que o grão fosse cultivado com sucesso em regiões de baixas latitudes, entre o trópico de Capricórnio e a linha do Equador. Essa conquista dos cientistas brasileiros revolucionou a história mundial da soja e seu impacto começou a ser notado a partir do final da década de 80 e, mais notoriamente, na década de 90, quando os preços do grão começaram a cair (EMBRAPA, 2015).

Segundo dados apresentados no levantamento mensal referente ao mês de fevereiro de 2015 pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) serão produzidos mundialmente 315.06 mil t de soja na safra 2014/15. Esse valor é 11% maior do que a produção obtida na safra anterior, 2013/14, quando

foram produzidas 283.74 mil t. A liderança no ranking de produção ainda permanece com os Estados Unidos com previsão de 108.01 mil t, vindo logo em seguida o Brasil com 94.5 mil, a Argentina com 56.0 mil, a China com 12.35 mil e o Paraguai com 8.5 mil t. Havia a expectativa de o Brasil assumir a primeira posição na safra 2014/2015 mas, de acordo com o mesmo levantamento, isto não acontecerá (USDA, 2015).

Com relação à produção brasileira, a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) indica, para a safra atual (2014/15), uma produção de 95.919,8 mil t. Esse valor é 11,4% maior do que o produzido na safra 2013/14 quando foram colhidas 86.120,8 mil t do grão. Houve crescimento de 4,8% em relação à área plantada devido aos bons preços recebidos pela oleaginosa (CONAB, 2015).

Dentre os Estados brasileiros, os que mais produziram na safra 2013/2014, foram: Mato Grosso com 26.441,6 mil t, Paraná com 14.780,7 mil, Rio Grande do Sul com 12.867,7 mil, Goiás com 8.994,9 mil e Mato Grosso do Sul com 6.148,0 mil de t (CONAB, 2015). No Paraná, os dados do último relatório de acompanhamento de safras divulgado pelo Departamento de Economia Rural (DERAL) apontaram a produção na safra (2014/15), de 16.763,5 mil t, 14% superior à safra 2013/14 (DERAL, 2015).

A cada ano, 85% da soja produzida mundialmente são processadas para obtenção do óleo vegetal e farelo de soja, sendo que o farelo é usado principalmente para alimentação animal. Apenas 10% da soja produzida mundialmente é usada diretamente para a alimentação humana e os restantes 5% são usados para outras finalidades como sementes, alimentação animal na propriedade ou, ainda é desperdiçado (RIAZ, 2006).

Segundo Vello (1992), a soja pode ser classificada em dois grupos principais: tipo grão e tipo alimento. A soja tipo grão tem sido cultivada, no Brasil, principalmente para atender às indústrias brasileira e estrangeira de farelo e óleo; apresenta sementes de tamanhos médios, representadas pelo peso de 100 sementes (PCS) de 12 a 19 g; e, quando consumida diretamente o seu sabor característico não é muito agradável ao paladar humano. A soja tipo alimento, com sabor mais suave e agradável ao paladar humano, apresenta duas categorias: sementes grandes, com PCS igual ou maior que 20 g, muito utilizada como soja

hortaliça, e sementes pequenas, com PCS menor que 10 g, destinado ao consumo na forma de brotos ou fermentado como o natto.

Atualmente, há mais de 300 cultivares de soja disponíveis no Brasil com diferentes características de produtividade, ciclo de produção, tamanho de grão, adaptação às mudanças climáticas regionais e presença de lipoxigenases, dentre outras. A Embrapa Soja possui um programa de Melhoramento Genético que desenvolve cultivares com características especiais para o consumo humano, e todas as cultivares e genótipos desenvolvidos a partir das convencionais fazem parte do Banco de Germoplasma da instituição (EMBRAPA, 2015).

Dentre as cultivares desenvolvidas pela Embrapa, a BRS216 possui sementes muito pequenas (10,4g em peso médio de 100 sementes), e com alto teor de proteína (43,6%), mas com uma produtividade menor que desejável. Um dos fatores que acarreta a menor produtividade é o seu tamanho, que contribui para maior perda na colheita. Por suas características, esta cultivar é indicada para a produção de brotos de soja (EMBRAPA, 2005).

3.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA SOJA

O teor de nutrientes na soja pode variar conforme a cultivar, condições de crescimento e outros fatores. Em geral, a soja contém 35 a 40% de proteína, 15 a 20% de lipídios, 30 a 35% de carboidratos, 10 a 13% de umidade e 5% de cinzas (LIU, 1997; RIAZ, 2006).

O grão de soja é constituído de 8% de casca, 90% de cotilédone e 2% de hipocótilo (Figura 1). Considerando as estruturas individuais do grão, o cotilédone é a parte que apresenta os maiores percentuais de proteínas e lipídios, enquanto que a casca apresenta os menores percentuais destes componentes, mas apresenta o maior conteúdo de carboidratos. Uma vez que o cotilédone representa a maior parte de todo o grão é de se esperar que sua composição se aproxime da composição do grão inteiro (LIU, 1997).

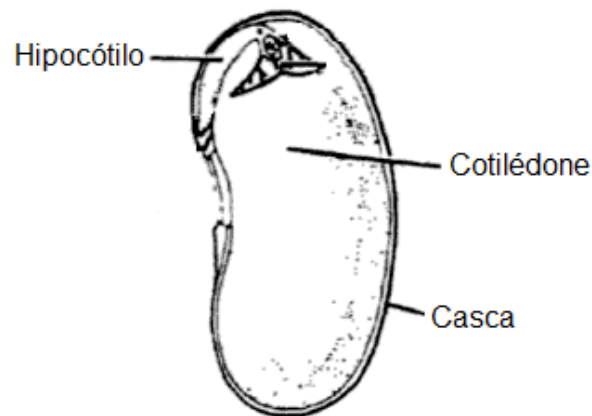


Figura 1: Estrutura da semente de soja.
 Fonte: adaptado de Liu (1997)

O principal constituinte nutricional da soja é a proteína. Baseada em sua função biológica nas plantas, as proteínas são classificadas em dois tipos: as proteínas metabólicas, representadas pelas proteínas enzimáticas e estruturais, e as proteínas de reserva, que juntamente com as reservas de óleos, são sintetizadas durante o desenvolvimento da semente de soja. A maioria das proteínas da soja é de reserva ou armazenamento e, assim como a maior parte das proteínas de outras leguminosas, a soja possui baixa quantidade de aminoácidos sulfurados tendo como limitante a metionina, seguida por cisteína e treonina. Entretanto, as proteínas da soja contém lisina, aminoácido limitante na maioria dos cereais, o que faz com que a combinação de leguminosas e cereais seja ótima do ponto de vista nutricional (LIU, 2004).

Durante o desenvolvimento do grão, os lipídios são armazenados em organelas denominadas de corpos de óleo ou esferossomos, os quais medem de 0,2 a 0,5 μm de diâmetro. Dentre os compostos lipídicos, estão presentes em maior quantidade os triacilgliceróis (95 a 97% no óleo bruto) e, em menores quantidades, os fosfolipídios, material insaponificável como esteróis, sitosteróis, tocoferóis, clorofila, caroteno e os ácidos graxos livres (LIU, 1997).

Em geral, a soja contém cerca de 30-35% de carboidratos, porém seu valor econômico é menos relevante do que o das proteínas e lipídios. Os carboidratos da soja podem ser divididos em duas classes: solúveis e insolúveis. Dentre os carboidratos solúveis, os oligossacarídeos rafinose e estaquiose ganham destaque. Sua presença tem sido associada à flatulência e desconforto abdominal após o consumo da soja e dos seus produtos. Porém, apresentam também efeito

benéfico, uma vez que promovem o aumento da atividade das bifidobactérias no cólon e atuam como prebiótico, diminuindo os níveis de colesterol e prevenindo alguns tipos de câncer (QIANG; LIE; BING, 2009). Os carboidratos insolúveis da soja são a celulose, hemicelulose e pectina, componentes estruturais encontrados principalmente nas paredes celulares (LIU, 2004).

A soja contém vitaminas hidrossolúveis e lipossolúveis. As vitaminas hidrossolúveis presentes na soja incluem principalmente a tiamina, riboflavina, niacina, ácido pantotênico e o ácido fólico. A quantidade de ácido ascórbico (vitamina C) é essencialmente insignificante na soja madura, embora esteja presente em quantidades mensuráveis tanto nas sementes in natura quanto em germinadas. As vitaminas lipossolúveis da soja são as vitaminas A e E. A vitamina A ocorre principalmente como a provitamina β -caroteno e o seu conteúdo é insignificante em sementes maduras, porém mensurável em sementes imaturas e germinadas. A vitamina E é conhecida como tocoferol e possui quatro formas, α -, β -, γ - e δ -tocoferóis (LIU, 2004).

Os minerais que estão presentes em maiores concentrações na soja são: potássio, fósforo, magnésio, enxofre, cálcio, cloro e sódio, os quais apresentam valores médios que podem variar de 0,2 a 2,1%. Além desses minerais, estão presentes em menores concentrações: silício, ferro, zinco, manganês, cobre, molibdênio e iodo, com concentrações que podem variar de 0,01 a 140 ppm (LIU, 2004).

Além do fornecimento de proteínas de alta qualidade, lipídios, carboidratos, vitaminas e minerais, a soja também é rica em uma série de outros compostos de interesse biológico, como os fitoesteróis, os inibidores de proteases e as saponinas, além das isoflavonas (RIAZ, 2006; MAZUR et al., 1998).

3.2.1 Isoflavonas

Os flavonoides são compostos fenólicos responsáveis pela coloração de inúmeros vegetais, variando desde o amarelo, laranja e vermelho até o violeta. Dentre os flavonoides, são encontradas as flavononas, flavonas, flavonóis, antocianinas, catequinas e as isoflavonas. As isoflavonas são compostos heterocíclicos que apresentam estrutura -C3-C6-C6- (Figura 2) e se diferenciam das

demais estruturas dos flavonoides por apresentarem o anel benzeno unido ao carbono 3 do heterociclo, em vez do carbono 2 (MORAES, 2009).

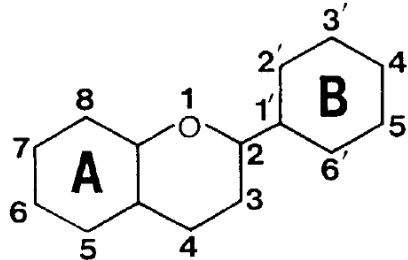


Figura 2: Estrutura geral de flavonoides
Fonte: adaptado de Liu (1997)

Embora os flavonoides sejam encontrados em várias famílias de plantas, as isoflavonas estão presentes em apenas algumas famílias botânicas e dentre elas, a soja é considerada única, por conter de 0,1 a 0,4% de isoflavonas em peso seco (LIU, 2004). O teor de isoflavonas, bem como a distribuição de classes, na soja é influenciado por muitos fatores, incluindo os fatores genéticos (variedade do grão), ambiental (local de cultivo, ano de plantio, data colheita) e o processamento utilizado (LIU, 2004; RIAZ, 2006).

No grão de soja, a composição de isoflavonas varia de acordo com seus componentes, ou seja, casca, cotilédone e hipocótilo. A concentração de isoflavonas no hipocótilo é 5,5 a 6 vezes maior do que no cotilédone correspondendo, de 10 a 20% do total de isoflavonas do grão, mesmo este representando somente 2% da massa total do grão. Porém, 80 a 90% das isoflavonas do grão de soja se encontram no cotilédone, pelo fato deste representar maior proporção na planta (TSUKAMOTO et al., 1995).

As isoflavonas da soja podem existir em quatro diferentes classes químicas: aglicona, sem o respectivo açúcar; β -glicosídica com uma glicose ligada ao anel benzeno e conjugada ou não com grupos malonil ou acetil, constituindo assim, 12 diferentes formas de isoflavonas (Figura 3). As isoflavonas agliconas da soja são denominadas de daidzeína, genisteína e gliciteína. As isoflavonas β -glicosídicas são chamadas de daidzina, genistina e glicitina. Na forma acetilglicosídica, as isoflavonas da soja são denominadas de 6"-O-acetildaidzina, 6"-O-acetilgenistina, 6"-O-acetilglicitina e na forma malonilglicosídica, são denominadas de 6"-O-malonildaidzina, 6"-O-malonilgenistina e 6"-O-malonildaidzina (LIU, 1997).

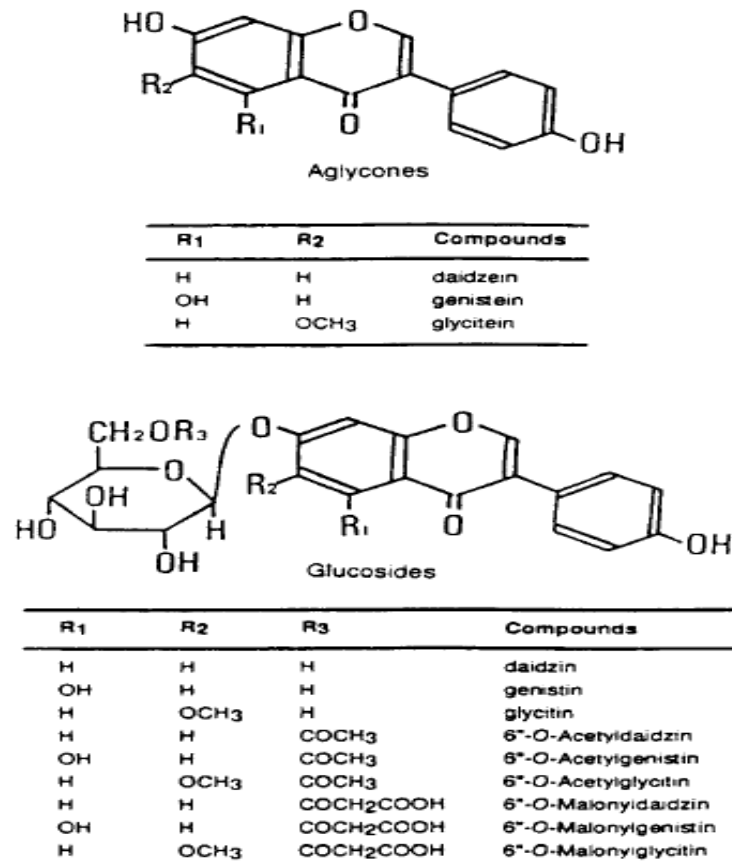


Figura 3: Estruturas químicas e radicais das isoflavonas agliconas, glicosídicas e glicosídicas conjugadas. Fonte: adaptado de Liu (1997).

Dentre todas as isoflavonas, os malonilglicosídeos estão presentes em maior quantidade nos grãos de soja, seguidos pelos β -glicosídeos, agliconas e acetilglicosídeos (HSIEH; KAO; CHEN, 2005). Entretanto, quando a soja é submetida a processamentos com alta temperatura e pressão, os malonilglicosídeos são convertidos em acetilglicosídeos e estes, por sua vez, em β -glicosídeos (PARK et al., 2001; ROSTAGNO; PALMA; BARROSO, 2005; XU; CHANG, 2008). Além disto, os β -glicosídeos podem ser convertidos em agliconas devido ao aumento da atividade da enzima β -glicosidase, quando a soja é submetida à fermentação (CARRÃO-PANIZZI; BORDIGNON, 2000) ou germinação (RIBEIRO et al., 2006).

Embora não sejam classificadas oficialmente como nutrientes, as isoflavonas apresentam papel importante (MESSINA; MESSINA; SETCHELL, 1994). Inicialmente, as investigações sobre as isoflavonas da soja estavam voltados para o conhecimento da atividade estrogênica (WONG; FLUX, 1962) e sobre a interferência

deste composto no metabolismo mineral (MAGEE, 1963). Entretanto, estudos mais recentes demonstraram que as isoflavonas podem apresentar outros efeitos positivos como atividade antioxidante e antifúngica (FLEURY et al., 1992), atividade hipocolesterolêmica (MESSINA, 2000; GARDENER et al., 2001; WANGEN et al., 2001), redução de ondas de calor e perda óssea decorrentes da pós-menopausa (LETHABY et al., 2007; MESSINA; WOOD, 2008) e efeito protetor contra o desenvolvimento de câncer de mama (WADA et al., 2013) e de próstata (DONG et al., 2013).

3.2.2 Vitamina C

O termo “vitamina C” é utilizado genericamente para denominar todos os componentes que exibem qualitativamente a atividade biológica do ácido ascórbico. O principal composto natural com atividade de vitamina C é o ácido L-ascórbico, que apresenta propriedades redutoras e de acidez devidas à porção 2,3 enediol (BALL, 1994; GREGORY, 2010).

O ácido ascórbico contém dois centros opticamente ativos, nas posições C4 e C5 (Figura 4). O ácido L-isoascórbico, um isômero óptico na posição C-5, e o ácido D-ascórbico, um isômero óptico na posição C-4, comportam-se quimicamente de maneira similar ao ácido ascórbico, sendo que o ácido D-ascórbico não possui atividade de vitamina C (GREGORY, 2010).

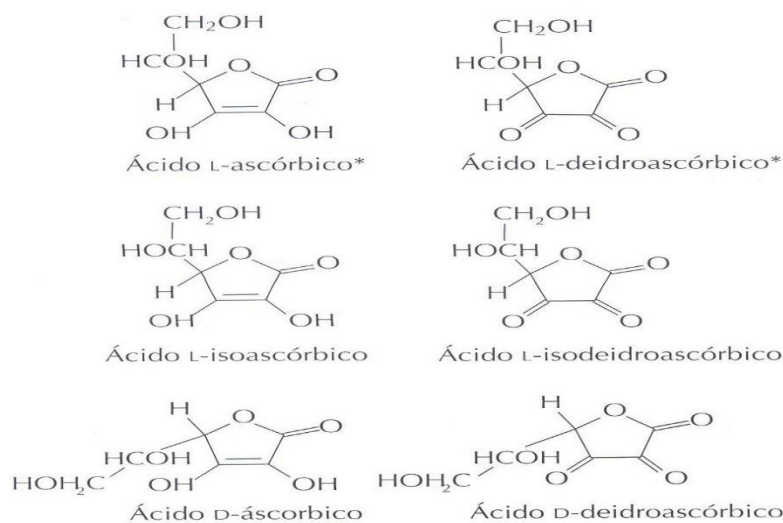


Figura 4: Estruturas do Ácido L-ascórbico e Ácido L-deidroascórbico e suas formas isoméricas. (*indica atividade de vitamina C). Fonte: adaptado de Gregory (2010).

A vitamina C ocorre naturalmente em frutas e vegetais, e em menor quantidade em tecidos animais e produtos derivados, sob a forma reduzida (ácido L-ascórbico). A oxidação de dois elétrons e a dissociação do hidrogênio converte o ácido L-ascórbico em ácido L-deidroascórbico. O ácido ascórbico é a principal forma biologicamente ativa, mas o ácido L-deidroascórbico também desempenha a mesma atividade e pode ser facilmente convertido a ácido ascórbico no corpo humano. A principal função da vitamina C é sua ação na conversão de colágeno prolina em colágeno hidroxiprolina, mas também atua como um antioxidante muito importante em vários sistemas biológicos, protegendo assim várias substâncias e células de processos oxidativos (MOREIRA; SANT'ANA, 2010).

Kumar et al. (2010) avaliaram o conteúdo de vitamina C em grãos maduros de dezoito cultivares de soja, sendo seis cultivares de soja amarela, seis de soja verde e seis de soja preta. Esses autores observaram que o conteúdo de vitamina C variou entre 3,52 e 5,61 mg.100g⁻¹ para as cultivares amarelas, 4,51 a 6,34 mg.100g⁻¹ para as cultivares verdes e 5,44 a 7,47 mg.100g⁻¹ para as cultivares pretas, sendo que as cultivares de soja preta foram significativamente maiores que as amarelas.

3.2.3 Inibidores de Tripsina

Os inibidores de protease têm sido extensivamente estudados em plantas que pertencem às famílias Leguminosae, Solanaceae e Gramineae, com destaque para o grão de bico, feijão mungo, feijão e soja, todos pertencentes à família das leguminosas (SAVAGE; MORRISON; BENJAMIN, 2003).

Os inibidores de protease são geralmente considerados os principais fatores antinutricionais da soja, capazes de impedir a ação de algumas enzimas digestivas de animais monogástricos e humanos, como a tripsina e a quimotripsina. Estes são classificados em duas categorias: Bowman-Birk e Kunitz, ambos são proteínas não glicosiladas e genericamente conhecidas como inibidores de tripsina. Entretanto, sua especificidade não se restringe à tripsina e são capazes de inibir outras serinoproteases, como a quimotripsina e a elastase (MANDARINO, 2010).

Os inibidores do tipo Kunitz têm massa molecular de 20 kDa, apresentam em sua estrutura duas ligações ou pontes dissulfeto e exibem especificidade para inibir a tripsina, enquanto os inibidores do tipo Bowman-Birk têm massa molecular variando de 6 a 10 kDa, apresentam em sua estrutura sete ligações ou pontes dissulfeto e têm a capacidade para inibir tanto a quimotripsina quanto a tripsina em locais de ligação independentes (SCHEIDER, 1983; LIENER, 1994).

O complexo formado entre o inibidor e a protease é análogo àquele formado entre enzima e substrato, mas ao contrário do complexo usual, que se dissocia prontamente em produto e enzima, o complexo formado entre inibidor e protease não se dissocia facilmente, devido à forte ligação entre eles (MANDARINO, 2010).

As enzimas digestivas secretadas em excesso acabam sendo eliminadas nas fezes, o que representa uma perda endógena importante de aminoácidos sulfurados, amplificada pela baixa concentração destes nas proteínas de leguminosas, causando assim um impacto nutricional negativo sobre os animais e humanos que, porventura, venham a consumir alimentos que contenham estes inibidores (LIENER, 1994; MANDARINO, 2010).

O interesse nos inibidores está mais focado no seu potencial terapêutico, como a inibição da ativação de determinados genes específicos, que são indutores de alguns tipos de câncer, e a proteção dos tecidos contra danos causados pela radiação solar e pelos radicais livres (FANG et al., 2012)

3.3 PROCESSO DE GERMINAÇÃO

A germinação é um processo biológico natural em que as sementes saem de seu estágio de latência, uma vez que as condições necessárias para o crescimento e desenvolvimento, tais como umidade, temperatura e nutrientes, dentre outros fatores são ofertados (SANGRONIS; MACHADO, 2007; VILAS BOAS; BARCELOS; LIMA, 2002). Durante a germinação, ocorrem mudanças variadas, dependendo do tipo de vegetal, da variedade da semente e das condições da germinação (SANGRONIS; MACHADO, 2007).

A absorção de água pela semente é o primeiro passo do processo de germinação, o qual promove a reidratação dos tecidos, o aumento da respiração e outras atividades metabólicas, que culminam no fornecimento de energia e nutrientes necessários para o crescimento do eixo embrionário (MEDERSKI; JEFFERS; PERERS, 1973; PEREIRA NETO, 2004).

No estágio de semente germinada, após dois a três dias, o gérmen começa a transformar a reserva nutritiva dormente em alimento vivo para ser assimilado pela nova planta. O próximo estágio, após cinco a sete dias, é um broto cuja planta apresenta raiz, haste e clorofila, com perda da casca e assimilação de quase toda reserva nutritiva da semente (MARCOS FILHO, 2005).

A germinação é a fase mais rica em nutrientes no desenvolvimento vegetal, os quais podem ser facilmente digeridos e assimilados. Em suas características fisiológicas, a germinação se assemelha a um processo pré-digestivo, no qual as proteínas são degradadas em aminoácidos, os carboidratos complexos em açúcares simples e as gorduras em ácidos graxos (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000; MAYER; POLJAKOFF-MAYBER, 1989).

Os efeitos da germinação sobre a composição química e os constituintes bioquímicos das sementes variam devido a fatores intrínsecos e extrínsecos. Dentre os fatores intrínsecos, estão: genótipo, vitalidade, longevidade, viabilidade, maturidade e potencial fisiológico das sementes. Já os fatores extrínsecos estão associados às alterações ambientais, como água, temperatura e oxigênio (NOGUEIRA; SEDIYAMA, 2013).

A água é um dos componentes que exerce maior influência na germinação das sementes (HICKS, 1978). Ela é essencial na germinação por pelo

menos três razões: para a atividade enzimática; para a solubilização e transporte de reservas; e como reagente em si, principalmente na digestão hidrolítica das substâncias de reserva armazenadas nas sementes (MARCOS FILHO, 2005).

A temperatura ótima do solo para a germinação está entre 25 °C e 35 °C. A temperatura afeta o processo germinativo, tanto por agir sobre a velocidade de absorção de água, como sobre as reações bioquímicas de todo processo, interferindo, portanto, não somente na germinação, como também na sua velocidade (BEWLEY; BLACK, 1994; CARVALHO; NAKAGAWA, 2000). Em ambientes cuja temperatura é muito baixa, o período entre a germinação e emergência é mais longo. Além disso, a taxa de germinação diminui, levando à ocorrência de falhas no estande final de plantas. Além disso, a temperatura tem forte influência sobre a alongação do hipocótilo (NOGUEIRA; SEDIYAMA, 2013).

Segundo Raven, Evert e Eichhorn (1992), os primeiros estádios do processo germinativo podem ser completamente anaeróbicos; no entanto, após o rompimento do tegumento pela radícula, a semente passa a realizar respiração aeróbica, a qual depende da presença de oxigênio. Em situação de excesso de água, ocorre a redução da disponibilidade de oxigênio, que pode não ser suficiente para suprir a demanda, ocasionando atraso ou paralisação do desenvolvimento da plântula.

Na germinação, as enzimas transformam o amido em açúcares simples e as proteínas são degradadas a aminoácidos. Ocorrem fenômenos como a absorção de grande quantidade de água, a síntese de vitaminas e enzimas e a mobilização de minerais. Tal como o cozimento, a germinação é como uma pré-digestão, mas sem que ocorra perda de nutrientes. O mais elevado ponto de vitalidade no ciclo de vida de uma planta ocorre quando esta é um broto, daí os seus benefícios nutricionais (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000; MAYER; POLJAKOFF-MAYBER, 1989). Porém, não se conhece as condições do processo de germinação dos brotos para se atingir este ponto de vitalidade e com características físicas e químicas definidas.

Além disso, a germinação promove redução dos fatores antinutricionais (tais como inibidores de tripsina e lectinas) e promove a hidrólise de oligossacarídeos (rafinose e estaquiose), os quais são causadores de flatulência. Cabe ressaltar que a germinação também reduz o teor de fitatos, pelo aumento da

atividade da enzima fitase, com conseqüente aumento da biodisponibilidade de minerais e vitaminas (BAÚ; VILLAUME; MEJEAN, 2000; CREDE et al., 2004; TRUGO et al., 2000; VILAS BOAS; BARCELOS; LIMA, 2002).

Ao comparar o grão de soja com o grão germinado, nota-se que, com a evolução da germinação ocorre aumento do conteúdo de umidade, proteínas, cinzas e fração glicídica ou extrato não nitrogenado em base seca. Além de elevar o valor nutritivo do grão, em virtude da melhoria da digestibilidade e eficiência proteica, a germinação também proporciona textura crocante e sabor diferenciado (VILAS BOAS; BARCELOS; LIMA, 2002; MARTINEZ et al., 2011).

Outras alterações bioquímicas importantes acontecem, como a ativação da enzima β -glicosidase (SANTOSH; BALASUBRAMANIAN; LALITA, 1999), cuja maior atividade foi encontrada no epicótilo de soja após 144 h de germinação (YOSHIARA et al., 2012). Portanto, o processo de germinação da soja, por promover a ativação da β -glicosidase, pode ser uma alternativa para aumentar o teor de isoflavonas agliconas para aplicação no desenvolvimento de alimentos (RIBEIRO et al., 2006).

Kim et al. (2005) avaliaram o efeito da germinação de sementes de soja por 96 h a 20 °C em ausência de luz e constataram um aumento de até 17,5 vezes no teor de genisteína, assim como aumento no teor total de agliconas. Já o teor total de isoflavonas apresentou inicialmente um acréscimo de 1,1 vezes na fase inicial da germinação (6 h a 24 h), diminuindo em seguida.

Zhu et al. (2005) avaliaram o efeito da germinação no conteúdo de isoflavonas em duas cultivares de soja e constataram que o conteúdo total de isoflavonas aumentou gradualmente durante a maceração dos grãos sendo que, ao final dessa etapa, atingiu-se o máximo teor das isoflavonas agliconas daidzeína e genisteína.

Lim e Lai (2006) avaliaram seis cultivares de soja convencional e sete cultivares de soja preta durante a germinação e observaram que o total de isoflavonas aumentou após um dia de germinação em todas as cultivares e que, após quatro dias de germinação, houve uma redução nos teores totais.

Chiarello et al. (2006) investigaram a influência do tratamento térmico e da germinação sobre o perfil de isoflavonas em extrato aquoso de soja. Estes autores observaram uma redução de 1,1 vezes no conteúdo total de

isoflavonas e aumento de 7,0 vezes no conteúdo total de agliconas após 168 h de germinação a 22 °C e na ausência de luz. Nestas mesmas condições, observaram também um aumento de 2,4 vezes na extração de proteína, indicando que a germinação é um processo interessante para a produção de extrato aquoso de soja enriquecido com agliconas.

Ribeiro et al. (2006) avaliaram a influência do tempo de germinação sobre o perfil de isoflavonas e a atividade da β -glicosidase em grãos de soja da cultivar BRS213 germinados por 72 h a 25 °C. Nas radículas, foi observado um aumento de 3,3 vezes na atividade de β -glicosidase; houve também uma redução de 6,3 vezes no conteúdo total de isoflavonas, enquanto que a concentração de malonilglicosídeos, daidzina e genistina diminuiu de 5 a 10 vezes. Entretanto, não houve variação significativa na concentração de daidzeína e tanto genisteína como gliciteína foram detectadas somente em algumas fases da germinação. Nos cotilédones, observou-se um aumento de 2,3 vezes na atividade de β -glicosidase e um aumento de 2,4, 2,6 e 3,3 vezes na concentração de isoflavonas totais, malonilgenistina e malonildaizina, respectivamente; não houve variação significativa na concentração de genistina e daidzina e a genisteína foi a única aglicona presente no cotilédone, sendo detectada apenas em 0 h e 6 h de germinação.

Phommalth et al. (2008), avaliando a germinação de duas cultivares de soja, observaram um aumento de até 3 vezes no teor de isoflavonas totais após 168 h de germinação tendo diminuído após esse período. Estes autores também relataram aumento no teor de isoflavonas totais nos cotilédones e diminuição no teor de isoflavonas totais nos hipocótilos, após 168 h de germinação.

Shi, Nam e Ma (2010) observaram redução de 1,2 vezes na concentração de isoflavonas totais em soja germinada por 168 h a 25 °C na presença de luz. Estes pesquisadores verificaram que o teor das isoflavonas daidzina e genistina aumentou 2,2 e 2,0 vezes, enquanto que a concentração das isoflavonas daidzeína e genisteína aumentou 6,5 e 3,9 vezes, respectivamente, entre 24 h e 168 h de germinação.

Yoshiara et al. (2012) observaram diferenças entre o perfil de isoflavonas nas diferentes partes da semente, em soja da cultivar BSR257 germinada por 168 h a 35 °C e presença de luz natural. Para os hipocótilos e

radículas, a máxima concentração de agliconas ocorreu após 72 h de germinação (0,55 mg/g e 1,53 mg/g, em base seca), enquanto para os cotilédones, a máxima concentração de agliconas (0,89 mg/g) foi obtida após 120 h, e, para os epicótilos (0,96 mg/g), após 168 h de germinação.

Kim et al. (2013) avaliaram as mudanças no perfil de isoflavonas durante a germinação e observaram que o teor total de isoflavonas na soja não germinada, de 1.380,2 µg/g, aumentou aproximadamente 7,5 vezes, alcançando 10.386,0 µg/g. Em relação às agliconas, as sementes continham 599,6 µg/g de daidzeína, 136,6 µg/g de gliciteína e 644,0 µg/g de genisteína e, após a germinação, os teores aumentaram para 4.511,2 µg/g de daidzeína, 4.560,1 µg/g de gliciteína e 1.314,7 µg/g de genisteína.

Huang, Cai e Xu (2014) observaram que, durante diferentes tempos de germinação, o teor de isoflavonas agliconas da soja aumentou de 3,10 mg/g para 3,99 mg/g. Após um dia de germinação, o conteúdo de agliconas aumentou 84% enquanto aumento de cerca de 147% foi encontrado na soja germinada por três dias.

Quinhone Junior e Ida (2015) investigaram o efeito do tempo de germinação sobre o perfil das diferentes formas de isoflavonas em brotos de soja. Eles observaram que a concentração de daidzina ($0,256 \mu\text{mol.g}^{-1}$) e genistina ($0,343 \mu\text{mol.g}^{-1}$) foi mínima em 72 h de germinação e aumentou 2,2 e 2,1 vezes entre 72 h e 168 h. Entretanto, brotos germinados por 168 h apresentaram redução de 1,8 vezes no teor total de β -glicosídeos quando comparados às sementes. Em relação aos malonilglicosídeos, a concentração de malonildaidzina e malonilgenistina aumentou 2,5 e 1,6 vezes após 168 h de germinação, com aumento de 1,7 vezes no teor total de malonilglicosídeos. Quanto às agliconas, a daidzeína foi detectada somente a partir de 72 h de germinação e apresentou a máxima concentração entre 120 h e 168 h, com média de $0,210 \mu\text{mol.g}^{-1}$; a genisteína apresentou a mínima concentração ($0,066 \mu\text{mol.g}^{-1}$) entre 48 h e 120 h, seguida de aumento de 1,5 vezes entre 120 h e 168 h de germinação; e a gliciteína não foi detectada durante todo o processo de germinação.

3.4 BROTOS COMESTÍVEIS

A semente germinada é o primeiro estágio pós-germinação e o broto corresponde a um estágio mais avançado de desenvolvimento, com 8 a 10 cm de altura (LOURES; NÓBREGA; COELHO, 2009).

Segundo o guia de orientação e regulação da produção e de produtos de plantas dos Estados Unidos, publicado pelo Food and Drug Administration (FDA), os brotos devem ser produzidos colocando inicialmente as sementes viáveis em imersão em água e, em seguida, mantendo-as em um ambiente quente e úmido, entre 3 a 7 dias, para promover a germinação e crescimento dos brotos (FDA, 2014).

O consumo humano de brotos é bem difundido e apreciado na China, Japão e Estados Unidos. No Brasil, observa-se uma demanda por esse tipo de alimento (DUQUE; SOUTO; ABOUD, 1987; VIEIRA; NISHIHARA, 1992). A sua utilização é prática milenar no Oriente e a expansão do consumo também ocorre no Ocidente (CHAVAN; KADAM, 1989; BAÚ et al., 1997; MONEAM, 1990; VIEIRA; NISHIHARA, 1992).

Há séculos esta prática é comum no Oriente, por ser um método de processamento simples e eficaz, no qual ocorrem mudanças desejáveis na qualidade nutricional dos grãos. O consumo mundial de leguminosas germinadas aumentou e segundo Doughty e Walker (1982) e Ghorpade e Kadam (1989), estes também podem ser utilizados para produzir farinhas de elevado valor nutritivo.

Os brotos têm sido utilizados em preparos culinários por gerações, e a seleção de mudas disponíveis para os consumidores tem aumentado. Além do agrião tradicional (*Lepidium sativum* L.), muitas outras espécies, incluindo leguminosas, agora são oferecidas nos mercados e em lojas de alimentos saudáveis. Estes incluem alfafa (*Medicago sativa* L.), lentilha (*Lens culinaris* L.), feijão mungo (*Vigna radiata* L.), soja (*Glycine max* (L.) Merril), ervilha (*Pisum sativum* L.), feijão azuki (*Vigna angularis Ohwi et Ohashi*), feijão pinto (*Phaseolus vulgaris cv pinto*) e grão de bico (*Cicer arietinum* L.) (KUO et al., 2004).

As alterações nos nutrientes e em fatores antinutricionais que ocorrem durante a germinação dependem do tipo de leguminosa e das condições de germinação como tempo, temperatura e ciclo de luz (FRÍAS et al., 1995;

PRODANOV; SIERRA; VIDAL-VALVERDE, 1997; SIERRA; VIDAL-VALVERDE 1999).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATÉRIA-PRIMA E REAGENTES

Foram utilizadas como matéria-prima sementes de soja [*Glycine max* (L.) Merril] da cultivar BRS216, safra 2012/2013, cultivadas na região de Ponta Grossa, PR. As sementes foram cedidas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA Soja, Londrina/PR. Segundo a EMBRAPA, esta cultivar de soja convencional possui características desejáveis para a produção de brotos, em função do seu tamanho (10,4 g em peso de 100 sementes) e elevado conteúdo proteico (43,6%).

Para determinação das isoflavonas, foram utilizados os padrões 6''-O-Acetilglicosídeos e 6''-O-Malonilglicosídeos (Wako Pure Chemical Industries, Ltda., Osaka, Japan) e β -Glicosídeos e Agliconas (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA). Para determinação da atividade de inibidores de tripsina, foi utilizado o padrão de tripsina e o substrato benzoyl-DL-arginine 4-nitroanilide hydrochloride - BAPNA (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA). Os outros reagentes utilizados foram de grau analítico ou grau cromatográfico.

4.2 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

4.2.1 Processo de germinação de soja

As sementes de soja foram previamente selecionadas para eliminação das danificadas ou manchadas, bem como de outros materiais estranhos. Foram sanitizadas com solução 1% de hipoclorito de sódio por 4 min, sendo depois transferidas para uma peneira e enxaguadas com água corrente. Em seguida, colocadas em um recipiente plástico com capacidade de 100 L, tampado para ausência de luz e contendo uma tela de aço inoxidável instalada a 2 cm do fundo do recipiente (Figura 5). A tela tem a função de drenagem da água após a irrigação das sementes para garantir as condições necessárias ao processo de germinação.



Figura 5: Recipiente utilizado para a germinação das sementes BRS216.

Foram utilizadas 250 g de sementes de soja, procedendo-se a germinação conforme descrito por Oliveira et al. (2013), com modificações. Todo o processo de germinação foi conduzido à temperatura ambiente e a água de irrigação foi mantida a 25 °C.

4.2.2 Efeito das variáveis do processo de germinação de soja sobre as medidas físicas e teor das diferentes formas de isoflavonas

Para avaliar os efeitos das variáveis do processo de germinação de soja cultivar BRS216 sobre as suas medidas físicas como comprimento e rendimento dos brotos e teor das diferentes formas de isoflavonas dos brotos foi utilizado o delineamento experimental 2^3 com 8 ensaios e adicionado de 3 replicatas no ponto central, totalizando 11 ensaios, totalmente aleatorizados. As variáveis independentes investigadas foram: X_1 (2, 4 e 6 horas de maceração), X_2 (4, 6 e 8 horas de frequência de irrigação) e X_3 (3, 5 e 7 dias de germinação) (Tabela 1). As funções respostas avaliadas nos brotos de soja foram: comprimento dos brotos de soja (Cbro) em centímetros; rendimento dos brotos de soja (% Rend) em porcentagem; teor de β -glicosídeos (β gli), malonilglicosídeos (Mgli), agliconas (Agli) e isoflavonas totais (IsoT), em μ mol de isoflavona/g de amostra dos brotos de soja.

Tabela 1: Delineamento experimental 2³ para processo de germinação de soja com os níveis das variáveis independentes codificadas e não codificadas.

Delineamento Experimental 2 ³			
Ensaio	Tempo de maceração x ₁ (X ₁)	Frequência de irrigação x ₂ (X ₂)	Tempo de germinação x ₃ (X ₃)
1	-1 (2)	-1 (4)	-1 (3)
2	1 (6)	-1 (4)	-1 (3)
3	-1 (2)	1 (8)	-1 (3)
4	1 (6)	1 (8)	-1 (3)
5	-1 (2)	-1 (4)	1 (7)
6	1 (6)	-1 (4)	1 (7)
7	-1 (2)	1 (8)	1 (7)
8	1 (6)	1 (8)	1 (7)
9 (C)	0 (4)	0 (6)	0 (5)
10 (C)	0 (4)	0 (6)	0 (5)
11 (C)	0 (4)	0 (6)	0 (5)

Após a realização de cada ensaio, as funções respostas comprimento (Cbro) e rendimento (% Rend) dos brotos de soja foram determinadas. Em seguida os brotos de soja de cada ensaio foram colocados em sacos do tipo ziplock, congelados em ultrafreezer a -86 °C (Indrel IUT 355D), liofilizados a -55 °C (Liotop Liofilizador L101) e moídos (Grind Central Coffee Grinder Cuisinart model DCG-12BC). Estes foram colocados em frascos plásticos com tampa e mantidos em câmara fria (10 °C) para a determinação da composição química, teor de vitamina C, atividade de inibidores de tripsina e das funções respostas teor de β-glicosídeos (βgli), malonilglicosídeos (Mgli), agliconas (Agli) e isoflavonas totais (IsoT).

4.3 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS

4.3.1 Medidas do comprimento e rendimento dos brotos de soja

Ao final de cada ensaio de germinação, foi medido o comprimento dos brotos de soja e calculado o rendimento. O comprimento dos brotos de soja (Cbro) foi medido com régua e expresso em centímetros (cm), assim para esta

medida o tanque contendo os brotos de soja foi dividido em oito partes e coletados dezessete brotos, sendo uma amostra do centro, oito amostras da região intermediária e oito amostras das extremidades de cada parte e obtida a média e o desvio-padrão. O rendimento dos brotos foi calculado em percentagem (%) pela relação entre a massa dos brotos de soja e das sementes, multiplicada por 100.

4.3.2 Determinação do teor de isoflavonas

A extração das diferentes formas de isoflavonas das sementes e dos brotos de soja liofilizados foi realizada conforme Carrão-Panizzi, Góes-Favoni e Kikuchi (2002). A análise quantitativa das diferentes formas de isoflavonas foi realizada segundo metodologia descrita por Berhow (2002), por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando o cromatógrafo líquido (Waters, modelo 2690), equipado com bombas (modelo W600) e injetor automático de amostras (modelo W717 plus). A coluna utilizada foi de fase reversa, do tipo ODS C18 (YMC Pack ODS-AM Column), com 250 mm de comprimento x 0,4 mm de diâmetro interno e partículas de 5 µm. Para a separação das isoflavonas, adotou-se o sistema de gradiente linear binário, tendo como fases móveis: 1) metanol contendo 0,025% ácido trifluoroacético (TFA) (solvente A) e 2) água destilada deionizada ultrapura contendo 0,025% de TFA (solvente B). A condição inicial do gradiente foi de 20% para o solvente A que, aos 40 min, atingiu a concentração de 100% para, em seguida, retornar a 20% aos 41 min e permanecer nestas condições até completar 60 min, tempo total de corrida para cada amostra. A vazão da fase móvel foi de 1,0 mL/min e a temperatura durante a corrida, 25 °C. A detecção das diferentes formas de isoflavonas foi realizada utilizando o detector de arranjo de foto diodo (Waters, modelo W996), ajustado para o comprimento de onda de 260 nm. Para a identificação dos picos correspondentes a cada uma das 12 diferentes formas de isoflavonas, foram utilizados padrões de daidzina, daidzeína, genistina, genisteína, glicitina, gliciteína e também padrões das formas acetil e malonil, solubilizados em metanol (grau HPLC), nas seguintes concentrações: 0,00625 mg/mL; 0,0125 mg/mL; 0,0250 mg/mL; 0,0500 mg/mL e 0,1000 mg/mL. A quantificação das 12 diferentes formas de isoflavonas foi realizada por padronização externa (área dos picos) e utilizados os padrões como referência. A identificação dos

picos correspondentes a cada uma das 12 diferentes formas de isoflavonas nas amostras foi feita por meio da comparação dos tempos de retenção de cada padrão, bem como os respectivos espectros de absorção.

Como as diferentes formas de isoflavonas possuem massa molar diferentes, os resultados foram expressos em base molar, como a soma de cada forma de isoflavonas para cada grupo (β -glicosídeos, malonilglicosídeos, acetilglicosídeos e agliconas). Assim, os teores das diferentes formas de isoflavonas foram calculados e expressos em μmol de isoflavona/g de amostra em base seca (média \pm desvio padrão).

4.3.3 Determinação da composição química

A composição química das sementes e dos brotos de soja foi determinada por meio de análises do teor de proteínas, lipídios, umidade, cinzas e carboidratos totais por diferença, utilizando os métodos descritos pela AOAC (1995).

4.3.4 Determinação da vitamina C

A vitamina C foi determinada pelo método (n. 967.21) descrito pela AOAC (1995) que se baseia na redução do corante (2,6-diclorofenol indofenol) por uma solução ácida de vitamina C. Os teores de vitamina C foram expressos como mg de ácido ascórbico/g de amostra em base seca.

4.3.5 Determinação da atividade de inibidores de tripsina

A atividade de inibidores de tripsina foi determinada pelo método oficial da AOCS (2009) utilizando 1 g de amostra desengordurada e extração com 50 mL de solução de hidróxido de sódio 0,01 M, seguido de agitação por 3 h à 25 °C.

Uma unidade de tripsina (1 UT) foi definida arbitrariamente como um aumento de 0,01 unidade de absorbância, a 410 nm, para 10 mL de mistura reativa (2 mL alíquota, 2 mL solução de tripsina, 5 mL solução de BAPNA e 1 mL de solução de ácido acético para interromper a reação), sob as condições utilizadas neste ensaio. A unidade de inibidores de tripsina (UIT) foi calculada pela diferença

na absorvância entre o tubo padrão e tubo de amostra. Os nveis de inibidores de tripsina foram expressos como UIT/g de amostra em base seca.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A metodologia de superfcie de resposta foi utilizada para avaliar os efeitos das variveis do processo de germinação de soja sobre as medidas físicas e teor das diferentes formas de isoflavonas. Os modelos foram obtidos por análise de variância (ANOVA, $p=0,05$) e análise de regressão, utilizando o software Statistic 8.0 (Statsoft, Tulsa, OK, USA), o qual construiu também os gráficos de superfcie de resposta. O modelo para cada função resposta foi expresso conforme a equação $Y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_{12}x_1x_2 + \beta_{13}x_1x_3 + \beta_{23}x_2x_3 + \beta_{123}x_1x_2x_3 + \epsilon$; onde: Y é a função resposta, x_1 , x_2 e x_3 são os nveis das variveis codificadas, β são os coeficientes estimados pela regressão e ϵ é o erro.

5 REFERENCIAS

AMERICAN OIL CHEMISTS SOCIETY. **Sampling and analysis of oilseed by-products**. Trypsin Inhibitor Activity. AOCS Official Method Ba 12-75. AOCS, 2009.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. AOAC, 1995.

BALL, G. F. M. **Water –soluble vitamin assays in human nutrition**. London: Chapman & Hall, 1994.

BANERJEE, S.; L, Y.; WANG, Z.; SARKAR, F. H. Multi-targeted therapy of cancer by genistein. **Cancer Letters**, v.269, p.226-242, 2008.

BARBOSA, A. C. L.; HASSIMOTTO, N. M. A.; LAJOLO, F. M., GENOVESE, M. I. Teores de isoflavonas e capacidade antioxidante da soja e produtos derivados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.4, p.921-926, 2006.

BAÚ, H. M.; VILLAUME, C. H.; MEJEAN, L. Effects of soybean (*Glycine max*) germination on biologically active components, nutritional values of seeds, and biological characteristics in rats. **Nahrung**, v.44, n.1, p.2-6, 2000.

BAÚ, H. M.; VILLAUME, C.; NICOLAS, J. P.; MÉJEAN, L. Effect of germination on chemical composition, biochemical constituents and antinutritional factors of soya bean (*Glycine max*) seeds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.73, n.1, p.1-9, 1997.

BERHOW, M. A. Modern analytical techniques for flavonoid determination. In: BUSLIG, B. S.; MANTHEY, J. A. (Ed.). **Flavonoids in the Living Cell**. New York: Kluser Academic, 2002. p. 61-76.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2 ed. New York: Editora Plenum Press, 1994.

BORDINGNON, J. R.; IDA, E. I.; OLIVEIRA, M. C. N.; MANDARINO, J. M. G. Effect of germination on the protein content and on the level of specific activity of lipoxygenase-1 in seeds of three soybean cultivars. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v.45, n. 3, p.222-226, 1995.

CARRÃO-PANIZZI, M. C.; BORDINGNON, J. R. Activity of beta-glucosidase and levels of isoflavone glucosides in soybean cultivars affected by the environment. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.5, p.873-878, 2000.

CARRÃO-PANIZZI, M. C.; GÓES-FAVONI, S. P.; KIKUCHI A. Extraction time for soybean isoflavone determination. **Brazilian Archives of Biology and Technology: An International Journal**, v. 45, p. 515-518, 2002.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4 ed. Jaboticabal: Editora FUNEP, 2000.

CHAVAN, J. K.; KADAM, S. S. Nutritional improvement of cereals by sprouting. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.28, n.5, p.401-437, 1989.

CHIARELLO, M. D.; LE GUERROUÉ, J.-L.; CHAGAS, C. M. S.; FRANCO, O. L.; BIANCHINI, E.; JOÃO, M. J. Influence of heat treatment and grain germination on the isoflavone profile of soy milk. **Journal of Food Biochemistry**, v.30, p.234-247, 2006.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Levantamento de Safras**. Disponível em: < <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&t=2>>. Acesso em: 10 jan 2015.

CREDE, R. G.; BALDASSO, J. G.; CLAUDIO, T. B.; FANARO, G. B.; GUEDES, R. L.; SABUNDJIAN, I. T.; VILAVICÊNCIO, A. L. C. H. Germinometria de grãos de milho (*Zea mays*) e soja (*Glycine max*) tratados por radiação ionizante. **Arquivos do Instituto de Biologia**, v.71 (supl.), p.189-191, 2004.

DERAL. Departamento de Economia Rural. Secretaria da Agricultura e do Abastecimento do Estado do Paraná. **Previsão e Estimativas de Safras**. Disponível em:<<http://www.agricultura.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=75>>. Acesso em: 10 jan 2015.

DOUGHTY, J.; WALKER, A. **Las leguminosas en nutricion humana**. Organizacion de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentacion, Rome, Italie: FAO. 1982.

DONG, X.; XU, W.; SIKES, R. A.; WU, C. Combination of low dose of genistein and daidzein has synergistic preventive effects on isogenic human prostate cancer cells when compared with individual soy isoflavone. **Food Chemistry**, v.141, p.1923-1933, 2013.

DUQUE, F. F.; SOUTO, S. M.; ABOUD, A. C. Mungo, proteína em forma de broto de feijão. **A Lavoura**, v. 0, p.21-23, 1987.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Cultivares de soja 2004/2005: Região Centro-Sul**. Londrina: Embrapa Soja: Fundação Meridional, n. 249, 2005.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Soja. **A Soja**. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1>>. Acesso em 10 jan 2015.

FANG, E. F.; LEUNG, H. H.; FANG, Y.; NG, T. B. The health benefits of soybeans and Bowman-Birk inhibitor concentrate. **Medicinal & Aromatic Plants**, v.1, n.138, 2012.

FARINA, H. G.; POMIES, M.; ALONSO, D. F.; GOMEZ, D. E. Antitumor and antiangiogenic activity of soy isoflavone genistein in mouse models of melanoma and breast cancer. **Oncology Reports**, v.16, p.885-891, 2006.

FDA. U. S. Food and Drug Administration. **Produce & Plant Products Guidance Documents & Regulatory Information**. Disponível em:

<<http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/ProducePlantProducts/ucm2007944.htm>>. Acesso em: 10 nov 2014.

FELIX, M. A.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G. Disponibilidade de ferro *in vitro* de grãos de soja tostados por diferentes tratamentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, 2008.

FERNANDEZ-OROZCO, R.; FRIAS, J.; ZIELINSKI, H.; PISKULA, M. K.; KOZLOWSKA, H.; VIDAL-VALVERDE, C. Kinetic study of the antioxidant compounds and antioxidant capacity during germination of *Vigna radiata* cv. emerald, *Glycine max* cv. jutro and *Glycine max* cv. merit. **Food Chemistry**, n.111, p.622-630, 2008.

FLEURY, Y.; WELTI, D. H.; PHILLIPPOSIAN, G.; MAGNOLATO, D. Soybean (malonyl) isoflavones: characterization and antioxidant properties. In: HO, C.-T.; LEE, C. Y.; HUANG, M.-T. **Phenolic compounds in food and their effects on health**. Washington: American Chemical Society, 1992. v.2, p. 98-113.

FRÍAS, J., DÍAZ-POLLÁN, C., HEDLEY, C. L.; VIDAL-VALVERDE, C. Evolution of trypsin inhibitor activity during germination of lentils. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.43, p.2231-2234, 1995.

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

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

GHORPADE, V. M.; KADAM, S. S. Germination. In: SALUNKHE, D. K.; KADAM, S. S. **Handbook of world food legumes: nutritional chemistry, processing technology and utilization**. Boca Raton: CRC Press, 1989. p.165-206.

GREGORY, F. J. Vitaminas. In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

HICKS, D. R. Growth and Development. In: NORMAN, A. G. **Soybean physiology, agronomy, and utilization**. Academic Press: New York, 1978. p.17-44.

HSIEH, H. C.; KAO, T. H.; CHEN, B. H. A fast HPLC method for analysis of isoflavones in soybean. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v.27,n.2,p.315-324, 2005.

HUANG, X.; CAI, W.; XU, B. Kinetic changes of nutrients and antioxidant capacities of germinated soybean (*Glycine max* L.) and mung bean (*Vigna radiata* L.) with germination time. **Food Chemistry**, v.143, p.268-276, 2014.

IZUMI, T.; PISKULA, M. K.; OSAWA, S.; OBATA, A.; TOBE, K.; SAITO, M.; KATAOKA, S.; KUBOTA, Y.; KIKUCHI, M. Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. **The Journal of Nutrition**, v.130, p.1695-1699, 2000.

KIM, W. J.; LEE, H. Y.; WON, M. H.; YOO, S. H. Germination effect of soybean on its contents of isoflavones and oligosaccharides. **Food Science and Biotechnology**, v.14, n. 4, p.498-502, 2005.

KIM, S. L.; LEE, J. E.; KWON, Y. U.; KIM, W. H.; JUNG, G. H.; KIM, D. W.; LEE, C. K.; LEE, Y. Y.; KIM, Y. H.; HWANG, T. Y.; CHUNG, I. M. Introduction and nutritional evaluation of germinated soy germ. **Food Chemistry**, v.136, n.2, p.491-500, 2013.

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

KUMAR, V.; RANI, A.; DIXIT, A. M.; PRATAP, D.; BHATNAGAR, D. A comparative assessment of total phenolic content, ferric reducing-anti-oxidative power, free radical-scavenging activity, vitamin C and isoflavones content in soybean with varying seed coat colour. **Food Research International**, v.43, p. 323-328, 2010.

KUO, Y.-H.; ROZAN, P.; LAMBEIN, F.; FRIAS, J.; VIDAL-VALVERDE, C. Effects of different germination conditions on the contents of free protein and non-protein amino acids of commercial legumes. **Food Chemistry**, v.86, p.537-545, 2004.

LETHABY, A.; BROWN, J.; MARJORIBANKS, J.; KORNENBERG, F.; ROBERTS, H.; EDEN, J. Phytoestrogens for vasomotor menopausal symptoms. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n.4, 2007.

LIENER, I. E. Implications of antinutritional components in soybean foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.34, n.1, p.31-67, 1994.

LIM, P.-Y.; LAI, H.-M. Bioactive Compounds in Legumes and Their Germinated Products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.3807-3814, 2006.

LIU, K. **Soybeans as Functional Foods and Ingredients**. Champaign: AOCS Press, 2004.

LIU, K. **Soybeans: Chemistry, Technology, and Utilization**. New York: Chapman & Hall, 1997.

LOURES, N. T. P. **Caracterização físico-química, microbiológica e sensorial de brotos de lentilha da variedade Precoz**. 2007. 67 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2007.

LOURES, N. T. P.; NÓBREGA, L. H. P.; COELHO, S. R. M. Análise físico-química, microbiológica e sensorial de brotos de lentilha da variedade Precoz. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v.31, n.4, p.599-606, 2009.

MAGEE, A. C. Biological responses of young rats fed diets containing genistin and genistein. **Journal of Nutrition**, v.80, p.151-156, 1963.

MANDARINO, J. M. G. Compostos antinutricionais da soja: caracterização e propriedades funcionais. In: COSTA, N. M. B.; ROSA, C. de O. B. (Ed.). **Alimentos funcionais: componentes bioativos e efeitos fisiológicos**. Rio de Janeiro: Rubio, 2010.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq, 2005.

MARTINEZ; A. P. C.; MARTINEZ, P. C. C.; SOUZA, M. C.; CANNIATTI BRAZACA, S. G. Alterações químicas em grãos de soja com a germinação. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.31, n.1, p.23-30, jan.-mar. 2011.

MAYER, A. M.; POLJAKOFF-MAYBER, A. **The germination of seeds**. 4th ed. Oxford: Pergamon Press, 1989.

MAZUR, W.; DUKE, J.; WAHALA, K.; RASKU, S.; ADLERCREUTZ, H. Isoflavonoids and lignans in legumes: nutritional and health aspects in humans. **Nutritional Biochemistry**, v.9, p.193-200, 1998.

MEDERSKI, H. J.; JEFFERS, D. L.; PERERS, D. R. Water and water relations. In: CALDWELL, B. E. **Soybeans: improvement, production and uses**. American Society of Agronomy, Madison, 1973. p.289-296.

MESSINA, M.; MESSINA, V.; SETCHELL, K. D. R. **The simple soybean and your health**. New York: Avery Publishing Group, 1994. p. 260.

MESSINA, M.; WOOD, C. Soy isoflavones, estrogen therapy, and breast cancer risk: analysis and commentary. **Nutrition Journal**, v.7, p.1-11, 2008.

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

MIYASAKA, S; MEDINA, J. C. **A Soja No Brasil**. 1. ed. Campinas/SP: ITAL, 1981. p.1062.

MONEAM, N. M. A. Effect of presoaking on faba bean enzyme inhibitors and polyphenols after cooking. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.38, n.7, p.1479-1482, 1990.

MONTEIRO, M. R. P.; COSTA, N. M. B.; OLIVEIRA, M. G. A.; PIRES, C. V.; MOREIRA, M. A. Qualidade proteica de linhagens de soja com ausência do inibidor

de tripsina Kunitz e das isoenzimas lipoxigenases. **Revista de Nutrição**, v.17, n.2, p.195-205, 2004.

MORAES, C. S. Introdução as isoflavonas de soja. In: MORAES, C. S.; PASTORE, G. M.; SATO, H. H.; PARK, Y. K. **Isoflavonas de soja e suas atividades biológicas**. São Paulo: Livraria Varela, 2009. p. 31-38.

MOREIRA, A. V. B.; SANT'ANA, H. M. P. Vitaminas. In: SILVA, S. M. C. S. da; MURA, J. D'arc P. **Tratado de Alimentação, Nutrição e Dietoterapia**. 2.ed. São Paulo: Roca, 2010.

MOSTAFA, M. M.; RAHMA, E. H. Chemical and nutritional changes in soybeans during germination. **Food Chemistry**, v.23, p.257-275, 1987.

NOGUEIRA, A. P. O; SEDIYAMA, T. Desenvolvimento, morfologia e germinação da semente. In: SEDIYAMA, T. **Tecnologia de produção de sementes de soja**. Londrina: Mecenias, 2013.

OLIVEIRA, de M. A.; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; MANDARINO, J. M. G.; LEITE, R. S. Produção de brotos de soja utilizando a cultivar BRS 216: caracterização físico-química e teste de aceitabilidade. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.16, n.1, p.34-41, 2013.

PARK, Y. K.; AGUIAR, L. C.; ALENCAR, S. M.; MASCARENHAS, H. A. A.; SCAMPARINI, A. R. P. Avaliação do teor de isoflavonas em soja brasileira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.3, n.3, p.156-160, 2001.

PEREIRA NETO, L. G. **Germinação de sementes de soja armazenados em bancos de germoplasma**. 2004. 76 fls. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

PHOMMALTH, S.; JEONG, Y. S.; KIM, Y.H.; HWANG, Y. H. Isoflavone composition within each structural part of soybean seeds and sprouts. **Journal of Crop Science and Biotechnology**, v.11, p.57-62, 2008.

PROBST, A. H.; JUDD, R. W. Origin, US history and development and world distribution. In: CALDWELL, B. E. **Soybeans: improvement, production and uses**. Madison: American Society of Agronomy, 1973.

PRODANOV, M.; SIERRA, I.; VIDAL-VALVERDE, C. Effect of germination on the thiamine, riboflavin and niacin contents in legumes. **European Food Research and Technology**, v. 205, n.1, p.48-52, 1997.

QIANG, X., LIE, C. Y.; BING, W. Q. Health benefit application of functional oligosaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v.77, p.435–441, 2009.

QUINHONE JÚNIOR, A.; IDA, E. I. Profile of the contents of different forms of soybean isoflavones and the effect of germination time on these compounds and the physical parameters in soybean sprouts. **Food Chemistry**, v. 166, p. 173-178, 2015.

- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biology of plants**. 5 ed. New York: Worth, 1992.
- RIAZ, M. N. Processing of soybeans into ingredients. In _____ **Soy applications in food**. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006. p. 39-62.
- RIBEIRO, M. L. L.; MANDARINO, J. M. G.; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; OLIVEIRA, M. C.; CAMPO, C. B. H.; NEPOMUCENO, A. L.; IDA, E. I. β -glucosidase activity and isoflavone content in germinated soybean radicles and cotyledons. **Journal of Food Biochemistry**, v.30, p.453-465, 2006.
- ROSTAGNO, M. A.; PALMA, M.; BARROSO, C. G. Short-term stability of soy isoflavones extracts: sample conservation aspects. **Food Chemistry**, v.93, n.3, p.557-564, 2005.
- SANGRONIS, E.; MACHADO, C. J. Influence of germination on the nutritional quality of *Phaseolus vulgaris* and *Cajanus cajan*. **LWT Food Science and Technology**, v.40, p.116-120, 2007.
- SANTOS, O. S. **A cultura da soja – 1**: Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná. Editora Globo, 1988.
- SANTOSH, T. R.; BALASUBRAMANIAN, K. K.; LALITA, K. Enhancement of beta-glucosidase and beta-galactosidase of *Trigonella foenum-graecum* by exposure to the allelochemical mimosine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, p.462-467, 1999.
- SAVAGE, G. P.; MORRISON, S. C. Trypsin Inhibitors. In: CABALLERO, B. **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**. 2 ed. Oxford: Academic Press, 2003. p.5878-5884.
- SCHEIDER, W. L. **Nutrition: Basic concepts and applications**. New York: McGraw-Hill Book Company, 1983.
- SHI, H.; NAM, P.; MA, A. Comprehensive profiling of isoflavones, phytosterols, tocopherols, minerals, crude protein, lipid, and sugar during Soybean (*Glycine max*) germination. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, p.4970-4976, 2010.
- SIERRA, I.; VIDAL-VALVERDE, C. Kinetics of free and glycosylated B-6 vitamins, thiamin and riboflavin during germination of pea seeds. **Journal of Science and Food Agriculture**, v.79, p.307-310, 1999.
- SILVA, M. S.; NAVES, M. M. V.; OLIVEIRA, R. B.; LEITE, O. S. M. Composição química e valor protéico do resíduo de soja em relação ao grão de soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.3, p.571-576, 2006.
- STATSOFT, Inc. 2007. **STATISTICA** (data analysis software system), version 8.0. www.statsoft.com.

TRUGO, L. C.; DONANGELO, C. M.; TRUGO, N. M. F.; BACH KNUDSEN, K. E. Effect of heat treatment on nutritional quality of germinated legume seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.2082-2086, 2000.

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. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.43, n.5, p.1184-1192, 1995.

USDA, United States Department of Agriculture. **World Agricultural Supply and Demand Estimates**. Disponível em <<http://www.usda.gov/oce/commodity/wasde/latest.pdf>> Acesso em 12 fev. 2015.

VANDERSTOEP, J. Effect of germination on the nutritive value of legumes. **Food Technology**, v.35, n.3, p.83-85, 1981.

VELLO, N. A. Ampliação da base genética do germoplasma e melhoramento da soja na ESALQ-USP. In: SIMPÓSIO SOBRE CULTURA E PRODUTIVIDADE DA SOJA, 1., 1991, Piracicaba. **Anais**. Piracicaba : FEALQ, 1992. p.60-81.

VIEIRA, R. F.; LOPES, J. D. S. **Produção de Brotos Comestíveis: Feijão Moyashi, Alfafa, Trevo, Rabanete e Brócolis**. Viçosa: CPT, 2001. p. 108.

VIEIRA, R. F.; NISHIHARA, M. K. Comportamento de cultivares de mungo-verde (*Vigna radiata*) em Viçosa, MG. **Revista Ceres**, v.39, n.221, p 60-83, 1992.

VILAS BOAS, E. V. B.; BARCELOS, M. F. P.; LIMA, M. A. C. Tempo de germinação e característica físicas, químicas e sensoriais dos brotos de soja e de milho combinado nas formas isoladas e combinadas. **Ciência e Agrotecnologia**, v.26, n.1, p.148-156, 2002.

WADA, K.; NAKAMURA, K.; TAMAI, Y.; TSUJI, M.; KAWACHI, T.; HORI, A.; TAKEYAMA, N.; TANABASHI, S.; MATSUSHITA, S.; TOKIMITSU, N.; NAGATA, C. Soy isoflavone intake and breast cancer risk in Japan: from the Takayama study. **International Journal of Cancer**, v.133, p.952-960, 2013.

WANG, Y. D.; FIELDS, M. L. Germination of corn and sorghum in the home to improve nutritive value. **Journal of Food Science**, v.43, n.4, p.1113-1115, 1978.

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

WONG, E.; FLUX, D. S. Estrogenic activity of red clover isoflavones and some of their degradation products. **Journal of Endocrinology**, v. 24, p.341-348, 1962.

XU, B. J.; CHANG, S. K. C. Total phenolics, phenolic acids, isoflavones, anthocyanins, and antioxidant properties of yellow and black soy beans as affected by thermal processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p.7165-7175, 2008.

YOSHIARA, L. Y.; MADEIRA, T. B.; RIBEIRO, M. L. L.; MANDARINO, J. M. G.; CARRÃO-PANIZZI, M.C.; IDA, E.I. β -glucosidase activity of soybean (*Glycine max*) embryonic axis germinated in the presence or absence of light. **Journal of Food Biochemistry**, v.36, p.699-705, 2012.

ZHU, D.; HETTIARACHCHY, N. S.; HORAX, R.; CHEN, P. Isoflavone contents in germinated soybean seeds. **Plant Food for Human Nutrition**, v.60, p.147-151, 2005.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão foram descritos na forma de artigo científico, o qual será submetido a um periódico científico para publicação.

6.1 ARTIGO CIENTÍFICO: VARIÁVEIS DO PROCESSO DE GERMINAÇÃO DE SOJA ALTERAM O TEOR DE ISOFLAVONAS E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS BROTOS

VARIÁVEIS DO PROCESSO DE GERMINAÇÃO DE SOJA ALTERAM O TEOR DE ISOFLAVONAS E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS BROTOS

Silva, M. B. R.^a, Leite, R. S.^b, Oliveira, M. A.^b, Ida, E. I.^{a*}

^a Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 86057-970, Londrina, PR, Brasil. *Autor correspondente. Tel.: +55 43 3371 5971; fax: +55 43 3371 4080. E-mail: mariah_benine@hotmail.com (M. B. R. Silva), elida@uel.br (E. I. Ida).

^b Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Soja, 86001-970, Distrito de Warta, Londrina, PR, Brasil. E-mail: rodrigo.leite@embrapa.br (R. S. Leite), malvares@cnpso.embrapa.br (M. A. de Oliveira).

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos das variáveis do processo de germinação de soja BRS216 sobre as medidas físicas e teor de isoflavonas e caracterizar os brotos quanto à composição química, vitamina C, atividade de inibidores de tripsina e teor de isoflavonas. As sementes de soja foram selecionadas, sanitizadas e submetidas ao processo de germinação utilizando o delineamento experimental 2³ e as variáveis investigadas foram tempo de maceração (horas), frequência de irrigação (horas) e germinação (dias) e as funções respostas avaliadas foram comprimento e rendimento dos brotos, teor de β -glicosídeos, malonilglicosídeos, agliconas e isoflavonas totais dos brotos. Para produção de brotos, o efeito do tempo de maceração e germinação foi linear positivo e significativo sobre o comprimento dos brotos, enquanto que para o rendimento, somente o efeito do tempo de germinação foi linear positivo e significativo. Com relação ao teor de isoflavonas malonilglicosídeos, agliconas e isoflavonas totais, somente o efeito da variável tempo de germinação foi linear negativo e significativo. Para obter brotos com características próprias, comprimento e rendimento adequados, maior teor de isoflavonas malonilglicosídeos, agliconas e isoflavonas totais, o processo de germinação deve ser realizado com 6 horas de maceração, 3 dias de germinação e independente da frequência de irrigação. Os brotos assim obtidos mantiveram a composição química, aumento de vitamina C, redução na atividade de inibidores de tripsina e aumento no teor de isoflavonas β -glicosídeos, malonilglicosídeos, agliconas e isoflavonas totais em relação às sementes não germinadas.

Palavras-chave: Germinação. Broto de soja. Isoflavonas. Vitamina C. Atividade de Inibidores de tripsina.

1. Introdução

A germinação de sementes para consumo humano é uma prática tradicional em países orientais como Coreia, Japão e China e, devido ao interesse por alimentos saudáveis e funcionais, sua demanda vem aumentando em países ocidentais (CHAVAN; KADAM, 1989; MONEAM, 1990; VIEIRA; NISHIHARA, 1992; BAÚ et al., 1997; LEE et al., 2002). Os brotos de soja, os quais são produzidos entre 3 a 7 dias de germinação, são uma importante fonte vegetal rica em nutrientes. O processo de obtenção é considerado simples, devido ao curto período de tempo, baixo custo de produção e independente de época e local de cultivo (LEE et al., 2007).

A germinação é um processo biológico natural em que as sementes saem de seu estágio de latência, após o fornecimento de umidade, temperatura e nutrientes necessários para o seu crescimento e desenvolvimento (SANGRONIS; MACHADO, 2007; VILAS BOAS; BARCELOS; LIMA, 2002).

O processo de germinação pode ser utilizado para melhorar a qualidade sensorial (LIU, 2008) e o valor nutritivo (PAUCAR-MENACHO et al., 2010; KIM et al., 2013) das sementes de soja, pois reduz o teor de substâncias indesejáveis como o ácido fítico (RIBEIRO; IDA; OLIVEIRA, 1999; RAMADAN, 2012), oligossacarídeos (KIM et al., 2005; MARTÍN-CABREJAS et al., 2008) e inibidores de tripsina, além de reduzir a atividade das lipoxigenases (PAUCAR-MENACHO et al., 2010). A germinação ainda pode promover um aumento significativo no teor de vitaminas como o ácido ascórbico, riboflavina e tiamina (AHMAD; PATHAK, 2000), fitosteróis e tocoferóis (SHI; NAM; MA, 2010), isoflavonas em geral (KIM et al., 2006; LEE et al., 2007; PHOMMALTH et al., 2008) ou particularmente as isoflavonas agliconas (KIM et al., 2005; YUAN et al., 2009; PAUCAR-MENACHO et al., 2010; SHI; NAM; MA, 2010).

As investigações sobre as isoflavonas da soja inicialmente estavam voltadas para o conhecimento da atividade estrogênica (WONG; FLUX, 1962) e sobre a interferência deste composto no metabolismo mineral (MAGEE, 1963). Entretanto, foi demonstrado que as isoflavonas apresentam outros efeitos positivos, como atividade antioxidante e antifúngica (FLEURY et al., 1992), atividade hipocolesterolêmica (MESSINA, 2000; GARDENER et al., 2001; WANGEN et al.,

2001), redução de ondas de calor e perda óssea decorrentes da pós-menopausa (LETHABY et al., 2007; MESSINA; WOOD, 2008) e efeito protetor contra o desenvolvimento de câncer de mama (WADA et al., 2013) e de próstata (DONG et al., 2013).

As isoflavonas da soja estão divididas em quatro formas químicas distintas, denominadas de agliconas (daidzeína, gliciteína e genisteína), β -glicosídeos (daidzina, glicitina e genistina), malonilglicosídeos (6"-O-malonildaizina, 6"-O-malonilglicitina e 6"-O-malonildaizina) e acetilglicosídeos (6"-O-acetildaizina, 6"-O-acetilglicitina e 6"-O-acetil genistina), totalizando 12 formas diferentes de isoflavonas (WANG; MURPHY, 1994).

Durante diferentes tempos de germinação de soja, o teor de isoflavonas agliconas variou entre 3,10 mg/g e 3,99 mg/g, confirmando que o processo de germinação pode aumentar o teor total de agliconas no broto germinado (HUANG; CAI; XU, 2014). Os mesmos autores observaram que o conteúdo de agliconas aumentou 84% e 147% após um e três dias de germinação, respectivamente, quando comparado com a soja não germinada.

A influência da germinação sobre o conteúdo e a composição de nutrientes depende de algumas variáveis do processo como tempo de maceração, umidade, temperatura e tempo de germinação, bem como das cultivares (PAUCAR-MENACHO et al., 2010).

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos das variáveis do processo de germinação de soja sobre as medidas físicas e teor das diferentes formas de isoflavonas e caracterizar os brotos quanto à composição química, vitamina C e atividade de inibidores de tripsina.

2. Materiais e Métodos

2.1. Matéria-prima e reagentes

Foram utilizadas como matéria-prima as sementes de soja [*Glycine max (L.) Merril*] da cultivar BRS216, safra 2012/2013, cultivados na região de Ponta Grossa, PR. As sementes foram cedidas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA Soja, Londrina/PR. Segundo a EMBRAPA, esta cultivar

de soja convencional possui características para produção de brotos em função do seu tamanho (10,4g em peso médio de 100 sementes) e elevado conteúdo proteico. (43,6%).

Para determinação das isoflavonas foram utilizados os padrões 6''-O-Acetilglicosídeos e 6''-O-Malonilglicosídeos (Wako Pure Chemical Industries, Ltda., Osaka, Japan) e β -Glicosídeos e Agliconas (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA). Para determinação de inibidores de tripsina, foi utilizado o padrão de tripsina e o substrato benzoyl-DL-arginine 4-nitroanilide hydrochloride - BAPNA (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA). Os outros reagentes utilizados foram de grau analítico ou grau cromatográfico.

2. 2. Processo de germinação de soja

As sementes de soja foram previamente selecionadas para eliminação das danificadas ou manchadas, bem como de outros materiais estranhos. Foram sanitizadas com solução 1% de hipoclorito de sódio por 4 min, sendo depois transferidas para uma peneira e enxaguadas com água corrente. Em seguida, colocadas em um recipiente plástico com capacidade de 100 L, tampado para ausência de luz, contendo uma tela de aço inoxidável instalada a 2 cm do fundo do recipiente (Figura 1). A tela tem a função de drenagem da água após a irrigação das sementes para garantir as condições necessárias ao processo de germinação.

Foram utilizadas 250 g de sementes de soja, procedendo-se a germinação conforme descrito por Oliveira et al. (2013), com modificações. Todo o processo de germinação foi conduzido à temperatura ambiente, e a água de irrigação foi mantida a 25 °C.

2. 3. Efeito das variáveis do processo de germinação de soja sobre as medidas físicas e teor das diferentes formas de isoflavonas

Para avaliar os efeitos das variáveis do processo de germinação de soja cultivar BRS216 sobre as suas medidas físicas como comprimento e rendimento dos brotos e teor das diferentes formas de isoflavonas foi utilizado o delineamento experimental 2^3 com 8 ensaios e adicionado de 3 replicatas no ponto

central, totalizando 11 ensaios que foram realizados aleatoriamente. As variáveis independentes (Tabela 1) investigadas foram X_1 (2, 4 e 6 horas de maceração), X_2 (4, 6 e 8 horas de frequência de irrigação) e X_3 (3, 5 e 7 dias de germinação). As funções respostas avaliadas nos brotos de soja foram: comprimento dos brotos de soja (Cbro) em centímetros, rendimento dos brotos de soja (% Rend) em porcentagem, teor de β glicosídeos (β gli), malonilglicosídeos (Mgli), agliconas (Agli) e isoflavonas totais (IsoT) em μ mol de isoflavona/g de amostra dos brotos de soja.

Após a realização de cada ensaio, as funções respostas comprimento (Cbro) e rendimento (% Rend) dos brotos de soja foram determinados. Em seguida os brotos de soja de cada ensaio foram colocados em sacos do tipo ziplock, congelados em ultrafreezer a -86 °C (Indrel IUT 355D), liofilizados a -55 °C (Liotop Liofilizador L101) e moídos (Grind Central Coffee Grinder Cuisinart model DCG-12BC). Estes foram colocados em frascos plásticos com tampa e mantidos em câmara fria (10 °C) para a determinação da composição química, teor de vitamina C, atividade de inibidores de tripsina e das funções respostas teor de β -glicosídeos (β gli), malonilglicosídeos (Mgli), agliconas (Agli) e isoflavonas totais (IsoT).

2. 4. Medidas do comprimento e rendimento dos brotos de soja

Ao final de cada ensaio de germinação, foi medido o comprimento dos brotos de soja e calculado o rendimento. O comprimento dos brotos de soja (Cbro) foi medido com régua e expresso em centímetros (cm), assim para esta medida o tanque contendo os brotos de soja foi dividido em oito partes e coletados dezessete brotos, sendo uma amostra do centro, oito amostras da região intermediária e oito amostras das extremidades de cada parte, e obtida média e o desvio-padrão. O rendimento dos brotos foi calculado em porcentagem (%) pela relação entre a massa dos brotos de soja e das sementes, multiplicada por 100.

2. 5. Determinação do teor de isoflavonas

A extração das diferentes formas de isoflavonas das sementes e dos brotos de soja liofilizados foi realizada conforme Carrão-Panizzi, Góes-Favoni e Kikuchi (2002). A análise quantitativa das diferentes formas de isoflavonas foi

realizada segundo metodologia descrita por Berhow (2002), por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando o cromatógrafo líquido (Waters, modelo 2690), equipado com bombas (modelo W600) e injetor automático de amostras (modelo W717 plus). A coluna utilizada foi de fase reversa, do tipo ODS C18 (YMC Pack ODS-AM Column), com 250 mm de comprimento x 0,4 mm de diâmetro interno e partículas de 5 μm . Para a separação das isoflavonas, adotou-se o sistema de gradiente linear binário, tendo como fases móveis: 1) metanol contendo 0,025% ácido trifluoroacético (TFA) (solvente A) e 2) água destilada deionizada ultrapura contendo 0,025% de TFA (solvente B). A condição inicial do gradiente foi de 20% para o solvente A que, aos 40 min, atingiu a concentração de 100% para, em seguida, retornar a 20% aos 41 min e permanecer nestas condições até completar 60 min, tempo total de corrida para cada amostra. A vazão da fase móvel foi de 1,0 mL/min e a temperatura durante a corrida, 25 °C. A detecção das diferentes formas de isoflavonas foi realizada utilizando o detector de arranjo de foto diodo (Waters, modelo W996), ajustado para o comprimento de onda de 260 nm. Para a identificação dos picos correspondentes a cada uma das 12 diferentes formas de isoflavonas, foram utilizados padrões de daidzina, daidzeína, genistina, genisteína, glicitina, gliciteína e também padrões das formas acetil e malonil, solubilizados em metanol (grau HPLC), nas seguintes concentrações: 0,00625 mg/mL; 0,0125 mg/mL; 0,0250 mg/mL; 0,0500 mg/mL e 0,1000 mg/mL. A quantificação das 12 diferentes formas de isoflavonas foi realizada por padronização externa (área dos picos) e utilizados os padrões como referência. A identificação dos picos correspondentes a cada uma das 12 diferentes formas de isoflavonas nas amostras foi feita por meio da comparação dos tempos de retenção de cada padrão, bem como os respectivos espectros de absorção.

Como as diferentes formas de isoflavonas possuem massa molar diferente, os resultados foram expressos em base molar, como a soma de cada forma de isoflavonas para cada grupo (β -glicosídeos, malonilglicosídeos, acetilglicosídeos e agliconas). Assim, os teores das diferentes formas de isoflavonas foram calculados e expressos em μmol de isoflavona/g de amostra em base seca (média \pm desvio padrão).

2.6. Caracterização química das sementes e brotos de soja

As sementes e os brotos de soja que apresentaram melhor medida física e maior teor de isoflavonas foram caracterizados quimicamente pela determinação da composição, do teor de vitamina C e da atividade dos inibidores de tripsina.

A composição química foi determinada por meio de análises do teor de proteínas, lipídios, umidade, cinzas e carboidratos totais por diferença, utilizando os métodos descritos pela AOAC (1995).

A vitamina C foi determinada pelo método oficial da AOAC (1995) n. 967.21, que se baseia na redução do corante (2,6-diclorofenol indofenol) por uma solução ácida de vitamina C. Os teores de vitamina C foram expressos como mg de ácido ascórbico/g de amostra em base seca.

A atividade dos inibidores de tripsina foi determinada pelo método oficial da AOCS (2009), utilizando 1 g de amostra desengordurada e extração com 50 mL de solução de hidróxido de sódio 0,01 M, seguido de agitação por 3 h à 25 °C. Uma unidade de tripsina (1 UT) foi definida arbitrariamente como um aumento de 0,01 unidade de absorvância, a 410 nm, para 10 mL de mistura reativa (2 mL alíquota, 2 mL solução de tripsina, 5 mL solução de BAPNA e 1 mL de solução de ácido acético para interromper a reação), sob as condições utilizadas neste ensaio. A unidade de inibidores de tripsina (UIT) foi calculada pela diferença na absorvância entre o tubo padrão e tubo de amostra. Os níveis de inibidores de tripsina foram expressos como UIT/g de amostra em base seca.

2.7. Análise estatística

A metodologia de superfície de resposta foi utilizada para avaliar os efeitos das variáveis do processo de germinação de soja sobre as medidas físicas e teor das diferentes formas de isoflavonas. Os modelos foram obtidos por análise de variância (ANOVA, $p=0,05$) e análise de regressão, utilizando o software Statistic 8.0 (Statsoft, Tulsa, OK, USA), o qual construiu também os gráficos de superfície de resposta. O modelo para cada função resposta foi expresso conforme a equação $Y = \beta_0 + \beta_1X_1 + \beta_2X_2 + \beta_3X_3 + \beta_{12}X_1X_2 + \beta_{13}X_1X_3 + \beta_{23}X_2X_3 + \beta_{123}X_1X_2X_3 + \varepsilon$; onde: Y é a

função resposta, x_1 , x_2 e x_3 são os níveis das variáveis codificadas, β são os coeficientes estimados pela regressão e ε é o erro.

3. Resultados e discussão

3. 1. Efeitos das variáveis do processo de germinação sobre as medidas físicas

O efeito das variáveis X_1 (horas de maceração), X_2 (horas de frequência de irrigação) e X_3 (dias de germinação) sobre as medidas físicas dos brotos de soja estão apresentados na Tabela 1. Os parâmetros de regressão e análise de variância (ANOVA) para a função resposta Cbro indicaram que as variáveis x_1 (h de maceração) e x_3 (d de germinação) apresentaram efeito linear positivo e significativo ($p < 0,05$). A falta de ajuste do modelo não foi significativa ($p > 0,05$) e 98% (R^2) dos dados experimentais foram ajustados adequadamente ao modelo proposto como sendo, $Cbro = 13,545 + 1,599x_1 + 6,055x_3$. A superfície de resposta (Figura 2a) indicou que a função resposta Cbro foi máxima e igual a 21,2 cm, ou seja, quando $0,5 \leq x_1 \leq 1$ (5 h de maceração $\leq X_1 \leq 6$ h de maceração) e x_3 igual a +1 (7 d de germinação), o que correspondeu aos ensaios 6 e 8. Entretanto, os brotos de soja com 21,2 cm não possuem características próprias de brotos, uma vez que há surgimento acentuado de raiz e transformações dos cotilédones em folhas (Figura 2c3). Contudo, observou-se que o comprimento dos brotos de soja foi mínimo e igual a 5,89 cm, ou seja, quando $-1 \leq x_1 \leq -0,5$ (2 h de maceração $\leq X_1 \leq 3$ h de maceração) e x_3 igual a -1 (3 d de germinação), correspondendo aos ensaios 1 e 3. Nestas condições, os brotos de soja apresentavam cotilédones ainda preservados e não ocorreu o surgimento de raízes (Figura 2c1). Os brotos de soja com comprimento ao redor de 8,75 cm ainda preservavam as características próprias de um broto e foram observados nos ensaios 2 e 4 (6 h de maceração e 3 d de germinação) (Figura 2c2). Segundo Huang, Cai e Xu (2014) o alongamento das radículas de soja germinada com 8,5 cm de comprimento foi mais efetivo nos primeiros estágios de germinação, ou seja, entre 1 e 3 dias.

Os parâmetros de regressão e análise de variância (ANOVA) para a função resposta % Rend indicaram que somente a variável x_3 (d de germinação) apresentou efeito linear positivo e significativo ($p < 0,05$). A falta de ajuste do modelo

não foi significativa ($p > 0,05$) e 89% (R^2) dos dados experimentais foram ajustados adequadamente ao modelo proposto como sendo, $\% \text{ Rend} = 195,454 + 46,250x_3$. A superfície de resposta (Figura 2b) indicou que função resposta $\% \text{ Rend}$ foi máxima e igual a 241,7%, ou seja, quando x_3 igual a +1 (7 d de germinação), correspondente aos ensaios 5 e 7. Entretanto, se considerarmos o comprimento dos brotos de soja de 18,5 e 16,9 cm respectivamente, observou-se que esses brotos já não preservavam a integridade do cotilédone e havia surgimento acentuado de raízes. Assim sendo, para a análise das medidas físicas dos brotos de soja, foram consideradas as funções respostas $\% \text{ Rend}$ e Cbro , associando-as com as características próprias de brotos de soja. Assim, foi observado que os brotos de soja germinados por 3 d e 2 h de maceração, apresentaram rendimento de 128% (ensaio 1) e 144% (ensaio 3), enquanto que os brotos germinados por 3 d, porém com 6 h de maceração, apresentaram rendimento maior, de 152% (ensaio 2) e 166% (ensaio 4). Desta forma, considerando que o rendimento do ensaio 4 foi superior e o broto de soja apresentou o comprimento de 8,4cm, com preservação da integridade do cotilédone, sem surgimento acentuado de raízes e com características próprias de brotos, recomenda-se o processo de germinação seja realizado nas seguintes condições: 6 h de maceração (X_1), 8 h de frequência de irrigação (X_2) e 3 d de germinação (X_3).

3. 2. Efeitos das variáveis do processo de germinação sobre o teor das diferentes formas de isoflavonas

O efeito das variáveis X_1 (horas de maceração), X_2 (horas de frequência de irrigação) e X_3 (dias de germinação) sobre as funções respostas das diferentes formas de isoflavonas (βgli , Mgli , Agl e IsoT) estão apresentados na Tabela 1. De acordo com os parâmetros de regressão e análise de variância (ANOVA) para a função resposta βgli , as variáveis x_1 , x_2 e x_3 não apresentaram efeitos significativos e, portanto a equação do modelo não foi estimada.

Os parâmetros de regressão e análise de variância (ANOVA) para a função resposta Mgli indicaram que somente a variável x_3 (d de germinação) apresentou efeito linear negativo e significativo ($p < 0,05$). A falta de ajuste do modelo não foi significativa ($p > 0,05$) e 77% (R^2) dos dados experimentais foram ajustados

ao modelo proposto como sendo, $Mgli = 9,199 - 0,968x_3$. A superfície de resposta (Figura 3a) indicou que a função resposta $Mgli$ foi máxima, ou seja, igual a $10,168 \mu\text{mol/g}$ quando $-1 \leq x_3 \leq -0,5$ (3 d de germinação $\leq X_3 \leq$ 4 d de germinação). Este resultado indicou que neste intervalo de dias de germinação o teor de $Mgli$ dos brotos de soja aumentou 78,38% quando comparada com o teor de malonilglicosídeos das sementes não germinadas ($5,70 \pm 1,39 \mu\text{mol/g}$). Kim et al. (2006) observaram um aumento médio de 110 e 33 vezes no teor de malonilglicosídeos de sete cultivares de soja germinados por 120 h (5 d) com e sem luz a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente. Entretanto, Shi, Nam e Ma (2010) observaram que o teor de malonildaidzina, malonilglucitina e malonilgenistina em sementes de soja germinadas diminuiu de 7,7, 1,4 e 2,0 vezes após 168 h (7 d de germinação) a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ e presença de luz.

Os parâmetros de regressão e análise de variância (ANOVA) para a função resposta $Agli$ indicaram que somente a variável x_3 (d de germinação) apresentou efeito linear negativo e significativo ($p < 0,05$). A falta de ajuste do modelo não foi significativa ($p > 0,05$) e 54% (R^2) dos dados experimentais foram ajustados ao modelo proposto como sendo, $Agli = 0,332 - 0,097x_3$. A superfície de resposta (Figura 3b) indicou que a função resposta $Agli$ foi máxima, ou seja, igual a $0,43 \mu\text{mol/g}$ quando $-1 \leq x_3 \leq -0,5$ (3 d de germinação $\leq X_3 \leq$ 4 d de germinação). Este resultado indicou que neste intervalo de dias de germinação o teor de $Agli$ aumentou de 126,31% quando comparada com o teor das sementes não germinadas ($0,19 \pm 0,05 \mu\text{mol/g}$). Huang, Cai e Xu (2014) observaram que durante 24, 48, 72 e 96 h de germinação, o teor isoflavonas agliconas da soja germinada iniciou com $1,615 \text{ mg/g}$ e atingiu o máximo de $3,99 \text{ mg/g}$ em 72 h e reduziu para $3,20 \text{ mg/g}$ em 96 h. Esses resultados indicaram que o teor de isoflavonas agliconas de soja germinada apresentou um aumento de 147% após 3 dias de germinação, cujos resultados apresentaram uma tendência similar ao presente trabalho. A mesma tendência também foi observada por Paucar-Menacho et al. (2010) que avaliaram o efeito do tempo e temperatura de germinação da cultivar de soja BRS258 sobre o teor de isoflavonas agliconas aplicando o delineamento composto central 2^2 e observaram que em 63 h (2,6 d) de germinação a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ocorreu um aumento máximo de 153,93% no teor de isoflavonas agliconas quando comparada com a semente não germinada ($25,4 \text{ mg/100g}$).

Os parâmetros de regressão e análise de variância (ANOVA) para a função resposta IsoT indicaram que somente a variável x_3 (d de germinação) apresentou efeito linear negativo e significativo ($p < 0,05$). A falta de ajuste do modelo não foi significativa ($p > 0,05$) e 75% (R^2) dos dados experimentais foram ajustados adequadamente ao modelo proposto como sendo, $\text{IsoT} = 10,796 - 0,946x_3$. A superfície de resposta (Figura 3c) indicou que a função resposta IsoT foi máxima, ou seja, igual a $11,74 \mu\text{mol/g}$ quando $-1 \leq x_3 \leq -0,5$ (3 d de germinação $\leq X_3 \leq 4$ d de germinação). Este resultado indicou que neste intervalo de dias de germinação o teor de IsoT aumentou 64,46% quando comparada com o teor nas sementes não germinadas ($7,14 \pm 1,1 \mu\text{mol/g}$). Huang, Cai e Xu (2014) observaram que em um dia de germinação a 25°C o teor de isoflavonas totais aumentou 22% ($4,19 \text{ mg/g}$) em relação a soja não germinada ($3,42 \text{ mg/g}$), enquanto que em três dias de germinação o teor foi máximo e de 37% ($4,68 \text{ mg/g}$) e após quatro dias houve redução de 27% ($3,73 \text{ mg/g}$).

Portanto, para obter brotos de soja da cultivar BRS216 com comprimento e rendimento adequados e maior teor de malonilglicosídeos, agliconas e isoflavonas totais, recomenda-se que o processo de germinação das sementes de soja seja realizado com 6 h de maceração (X_1) e 3 d de germinação (X_3) e independente da frequência de irrigação (X_2). Estas condições do processo de germinação das sementes de soja correspondeu ao ensaio 4 (Tabela 1), cujo broto de soja apresentou características apropriadas conforme mencionado anteriormente (item 3.1). Assim sendo, os brotos de soja do ensaio 4 foram caracterizados quanto a sua composição química, vitamina C e atividade de inibidores de tripsina.

3. 3. Caracterização dos brotos de soja e comparação com as sementes não germinadas

As sementes de soja BRS216 e os brotos de soja do ensaio 4 foram caracterizados quanto à composição química, vitamina C e atividade de inibidores de tripsina (Tabela 2). Nos brotos de soja do ensaio 4 (6 h de maceração e 3 d de germinação) o teor de proteínas, lipídeos, cinzas e carboidratos totais não diferiram em relação as sementes não germinadas. A composição química de duas cultivares de soja Giza 21 e Giza 35 germinadas por 40 h e 60 h a 30 °C, também foi mantida quando comparada com as sementes não germinadas (RAMADAN, 2012). Entretanto, Vilas Boas, Barcelos e Lima (2002) observaram que o teor de lipídios nas sementes de soja da cultivar IAC-8 diminui com a evolução da germinação e foi atribuída à degradação de reservas de nutrientes para o fornecimento de energia requerida durante o crescimento da planta. Porém, Megat Rusydi et al. (2011) observaram que o teor de cinzas de brotos de soja e feijão germinados por 48 h e 28 °C diminuiu em relação as sementes não germinadas.

Destaca-se que o teor de vitamina C nos brotos de soja do ensaio 4 aumentou 61% em relação às sementes não germinadas, indicando que a germinação é um processo que possibilita aumentar o teor deste constituinte. A semente de soja apresentou 1,47 mg/g de vitamina C (Tabela 2). Porém, Fernandez-Orozco et al. (2008) e Huang, Cai e Xu (2014) observaram que o ácido ascórbico não foi detectado nas sementes de soja. Entretanto, Huang, Cai e Xu (2014) também verificaram que após um dia de germinação da soja a 25 °C o teor de ácido ascórbico foi de 5,27 mg/100g enquanto que após três dias de germinação ocorreu um aumento de 13,28% no teor de ácido ascórbico e em cinco dias de germinação este teor diminuiu 22,94%.

Os brotos de soja do ensaio 4 apresentaram redução de 19,10% na atividade de inibidores de tripsina. Segundo Baú et al. (1997) o processo de germinação em diferentes condições pode aumentar a degradação de inibidores de tripsina. Os inibidores de tripsina da soja germinada por 144 h a 25 °C apresentaram uma contínua degradação e que foi aumentada quando a temperatura foi elevada a 35 °C (KUMAR et al., 2006). A degradação dos inibidores de tripsina da soja após 48 h e 72 h de germinação a 25 °C e ausência de luz também foi observada por Rasha

Mohamed et al. (2011). Entretanto, Dia et al. (2012) avaliaram a germinação entre 18 h a 72 h a 25 °C e ausência luz sobre as sementes de soja BRS133 não alterou o teor de inibidores de tripsina. Estes resultados indicaram que a atividade de inibidores de tripsina pode estar associada com as condições do processo de germinação, cultivar ou outros fatores.

O perfil de isoflavonas das sementes e dos brotos de soja do ensaio 4 (Tabela 3) indicou que o teor de daidzina, glicitina e genistina representou 9,94%, 1,68 e 5,88% do total de isoflavonas, respectivamente, nas sementes não germinadas. Nos brotos de soja do ensaio 4 (6 h de maceração e 3 d de germinação) a daidzina e genistina aumentaram 45,07% e 14,29% em relação à semente não germinada. Resultados similares também confirmaram a predominância de daidzina e genistina em 233 cultivares de sementes de soja cultivadas no Brasil (CARRÃO-PANIZZI et al., 2009). Entretanto, Ribeiro et al. (2007) observaram em 18 cultivares de soja que o teor de genistina foi predominante em relação a daidzina. Na soja germinada (ensaio 4) observou-se que o teor da isoflavona glicitina não alterou, sendo que Shi, Nam e Ma (2010) observaram que o teor de glicitina reduziu gradualmente durante o processo de germinação, não sendo detectada após 144 h (6 d). Entretanto, Huang, Cai e Xu (2014) observaram que durante a germinação da soja o teor de glicitina diminuiu 59% em relação a semente não germinada.

Com relação aos malonilglicosídeos nas sementes observou-se uma predominância destas isoflavonas (78,83%), sendo que as formas malonildaidzina, malonilglicitina e malonilgenistina representam 30,25%, 5,60% e 43,97% do total de isoflavonas, respectivamente. Nos brotos de soja do ensaio 4 (6 h de maceração e 3 d de germinação) observou-se também que houve predominância das isoflavonas malonilglicosídeos (82,98%), porém com aumento de 125% de malonildaidzina, 55% de malonilglicitina e 57,64% de malonilgenistina. Resultados similares foram observados por Tsukamoto et al. (1995) em sete variedades de soja, cujo percentual de malonilglicosídeos variou entre 67% e 93% em relação ao total de isoflavonas, sendo que a malonildaidzina e a malonilgenistina representaram, em média 44% e 41% respectivamente. Quinhone Junior e Ida (2014) observaram que a cultivar de soja BRS284 germinada por 168 h a 35 °C, a malonildaidzina e malonilgenistina aumentaram 2,5 e 1,6 vezes em relação à semente não germinada.

As isoflavonas agliconas estão presentes em menor quantidade em relação as outras formas de isoflavonas, sendo que a daidzeína, gliciteína e genisteína contribuíram com 0,70%, 1,68% e 0,42% do total de isoflavonas nas sementes de soja, respectivamente. Nos brotos germinados com 6 h de maceração e por 3 d, as isoflavonas agliconas daidzeína, gliciteína e genisteína aumentaram de 420%, 8,33% e 66,66% respectivamente, em relação a semente não germinada. A mesma tendencia foi observada por Shi, Nam e Ma (2010) em que a concentração de daidzeína e genisteína aumentou 6,6 e 4,5 vezes, respectivamente, entre 48 h e 168 h de germinação a 25 °C e na presença de luz. Quinhone Junior e Ida (2014) observaram que a daidzeína foi detectada somente a partir de 72 h de germinação e apresentou a máxima concentração entre 120 h e 168 h, enquanto que a genisteína apresentou concentração mínima entre 48 h e 120 h, seguido de aumento de 1,5 vezes entre 120 h e 168 h de germinação. Segundo Kim et al. (2006) nenhuma isoflavona aglicona foi detectada em sementes de sete cultivares de soja sem germinar, entretanto, após a germinação por 120 h a 25 °C, com e sem luz, o teor médio de agliconas foi de 0,558 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ e 0,383 $\mu\text{mol.g}^{-1}$, respectivamente, sendo que o total de agliconas representaram 18% e 29% do total de isoflavonas nos brotos de soja germinados com luz e sem luz, respectivamente.

Os acetilglicosídeos não foram detectados no presente estudo, o que já era esperado pois as sementes não sofreram nenhum tipo de tratamento térmico e, segundo Jung, Murphy e Sala (2008), a formação destas isoflavonas ocorre apenas quando a soja ou produtos à base de soja são submetidos à secagem, empregando-se altas temperaturas.

4. Conclusões

Para produção de brotos de soja BRS216 os efeitos do tempo de maceração e germinação foram lineares positivos e significativos sobre o comprimento dos brotos, enquanto que para o rendimento dos brotos, somente o efeito do tempo de germinação foi linear positivo e significativo.

Com relação ao teor de isoflavonas malonilglicosídeos, agliconas e isoflavonas totais dos brotos de soja, somente o efeito do tempo de germinação foi linear negativo e significativo.

Para obter brotos de soja com características próprias, comprimento e rendimento adequados, maior teor de isoflavonas malonilglicosídeos, agliconas e isoflavonas totais, o processo de germinação deve ser realizado utilizando 6 h de maceração, 3 d de germinação e independente da frequência de irrigação.

Os brotos de soja com características próprias e obtidos a partir de 6 h de maceração e 3 d de germinação, mantiveram a composição química, aumento de 61% de vitamina C, redução de 19,10% na atividade de inibidores de tripsina e aumento no teor de 20,8%, 82,98%, 131,57% e 73,38% para as isoflavonas β glicosídeos, malonilglicosídeos, agliconas e isoflavonas totais respectivamente, em relação às sementes não germinadas.

Agradecimentos

Este trabalho foi parcialmente financiado pela Fundação Araucária de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná / Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (PRONEX). MBRS agradece a Fundação CAPES/MEC pela Bolsa de Estudo do Mestrado e EII pela Bolsa Produtividade do CNPq.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflito de interesses. Os autores são responsáveis pelo conteúdo e escrita do artigo.

Referencias

AHMAD, S.; PATHAK, D. K. Nutritional changes in soybean during germination. **Journal of Food Science and Technology**, v.37, n.6, p. 665-666, 2000.

AMERICAM OIL CHEMISTS SOCIETY. **Sampling and analysis of oilseed by-products**. Trypsin Inhibitor Activity. AOCS Official Method Ba 12-75. AOCS, 2009.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMIST. **Official Methods of Analysis**. Ascorbic Acid. AOAC Official Method n.967.21. AOAC, 2012.

- BAÚ, H. M.; VILLAUME, C.; NICOLAS, J. P.; MÉJEAN, L. Effect of germination on chemical composition, biochemical constituents and antinutritional factors of soya bean (*Glycine max*) seeds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.73, n.1, p.1-9, 1997.
- BERHOW, M. A. Modern analytical techniques for flavonoid determination. In: BUSLIG, B. S.; MANTHEY, J. A. (Ed.). **Flavonoids in the Living Cell**. New York: Kluser Academic, 2002. p. 61-76.
- CARRÃO-PANIZZI, M. C.; GÓES-FAVONI, S. P.; KIKUCHI, A. Extraction time for soybean isoflavone determination. **Brazilian Archives of Biology and Technology: An International Journal**, v.45, p.515-518, 2002.
- CARRÃO-PANIZZI, M. C.; PIPOLO, A. E.; ARIAS, C. A. A.; KASTER, M.; OLIVEIRA, M. F.; OLIVEIRA, M. A.; TOLEDO, J. F. F.; MOREIRA, J. U. V.; CARNEIRO, G. E. S. Breeding specialty soybean cultivars for processing and value-added utilization at Embrapa in Brazil. In: World Soybean Research Conference, 8., 2009, Beijing. **Proceedings**. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, Institute of Crop Science, 2009.
- CHAVAN, J. K.; KADAM, S. S. Nutritional improvement of cereals by sprouting. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.28, n.5, p.401-437, 1989.
- DIA, P. V.; GOMEZ, T.; VERNAZA, G.; BERHOW, M.; CHANG, Y. K.; MEJIA, E. G. Bowman-birk and kunitz protease inhibitors among antinutrients and bioactives modified by germination and hydrolysis in brazilian soybean cultivar BRS133. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.60, p.7886-7894, 2012.
- DONG, X.; XU, W.; SIKES, R. A.; WU, C. Combination of low dose of genistein and daidzein has synergistic preventive effects on isogenic human prostate cancer cells when compared with individual soy isoflavone. **Food Chemistry**, v.141, p.1923-1933, 2013.
- FERNANDEZ-OROZCO, R.; FRIAS, J.; ZIELINSKI, H.; PISKULA, M. K.; KOZLOWSKA, H.; VIDAL-VALVERDE, C. Kinetic study of the antioxidant compounds and antioxidant capacity during germination of *Vigna radiata* cv. emerald, *Glycine max* cv. jutro and *Glycine max* cv. merit. **Food Chemistry**, n.111, p.622-630, 2008.
- FLEURY, Y.; WELTI, D. H.; PHILLIPPOSIAN, G.; MAGNOLATO, D. Soybean (Malonyl) Isoflavones: Characterization and Antioxidant Properties. In: HUANG, M.-T.; HO, C.-T.; LEE, C. Y. **Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health**. Washington: American Chemical Society, 1992. v.2, p.98-113.
- GARDNER, C. D.; NEWELL, K. A.; CHERIN, R.; HASKELL, W. L. The effect of soy protein with or without isoflavones relative to milk protein on plasma lipids in hypercholesterolemic postmenopausal women. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, n.4, p.728-735, 2001.

- HUANG, X.; CAI, W.; XU, B. Kinetic changes of nutrients and antioxidant capacities of germinated soybean (*Glycine max L.*) and mung bean (*Vigna radiata L.*) with germination time. **Food Chemistry**, v.143, p.268-276, 2014.
- JUNG, S.; MURPHY, P. A.; SALA, I. Isoflavone profiles of soymilk as affected by high-pressure treatments of soymilk and soybeans. **Food Chemistry**, v.111, n.3, p.592-598, 2008.
- KIM, W. J.; LEE, H. Y.; WON, M. H.; YOO, S. H. Germination effect of soybean on its contents of isoflavones and oligosaccharides. **Food Science and Biotechnology**, v.14, n.4, p.498-502, 2005.
- KIM, E. H.; KIM, S. H.; CHUNG, J. I.; CHI, H. Y.; KIM, J. A.; CHUNG, I. M. Analysis of phenolic compounds and isoflavones in soybean seeds (*Glycine max (L.) Merrill*) and sprouts grown under different conditions. **European Food Research and Technology**, v.22, p.201-208, 2006.
- KIM, S. L.; LEE, J. E.; KWON, Y. U.; KIM, W. H.; JUNG, G. H.; KIM, D. W.; LEE, C. K.; LEE, Y. Y.; KIM, Y. H.; HWANG, T. Y.; CHUNG, I. M. Introduction and nutritional evaluation of germinated soy germ. **Food Chemistry**, v.136, n.2, p.491-500, 2013.
- KUMAR, V.; RANI, A.; PANDEY, V.; CHAUHAN, G. S. Changes in lipoxygenase isozymes and trypsin inhibitor activity in soybean during germination at different temperatures. **Food Chemistry**, v.99, p. 563-568, 2006.
- LEE, J. D.; HWANG, Y. H.; CHO, H. Y.; KIM, D. U.; CHUNG, M. G. Comparison of characteristics related with soybean sprouts between *Glycine max* and *G. soja*. **Korean Journal of Crop Science**, v.47, p.189-198, 2002.
- LEE, S. J.; AHN, J. K.; KHANH, T. D.; CHUN, S. C.; KIM, S. L.; RO, H. M.; SONG, H. K.; CHUN, I. M. Comparison of isoflavone concentrations in soybean (*Glycine max (L.) Merrill*) sprouts grown under two different light conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, n.23, p. 9415-9421, 2007.
- LETHABY, A.; BROWN, J.; MARJORIBANKS, J.; KORNENBERG, F.; ROBERTS, H.; EDEN, J. Phytoestrogens for vasomotor menopausal symptoms. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n.4, 2007.
- LIU, K. Food use of whole soybeans. In: LAWRENCE, A. J.; WHITE, P. J.; GALLOWAY, R. **Soybeans Chemistry, Production, Processing, and Utilization**. Urbana: AOCS Press, 2008.
- MAGEE, A. C. Biological responses of young rats fed diets containing genistin and genistein. **Journal of Nutrition**, v.80, p.151-156, 1963.
- MARTÍN-CABREJAS, M. A.; DÍAZ, M. F.; AGUILERA, Y.; BENÍTEZ, V.; MOLLÁ, E.; ESTEBAN, R. M. Influence of germination on the soluble carbohydrates and dietary fibre fractions in non-conventional legumes. **Food Chemistry**, v.107, n.3, p.1045-1052, 2008.

MEGAT RUSYDI, M. R.; NORALIZA, C. W.; AZRINA, A.; ZULKHAIRI, A. Nutritional changes in germinated legumes and rice varieties. **International Food Research Journal**, v.18, p. 705-713, 2011.

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

MESSINA, M.; WOOD, C. Soy isoflavones, estrogen therapy, and breast cancer risk: analysis and commentary. **Nutrition Journal**, v.7, p.1-11, 2008.

METIVIER, J. R. Dormência e germinação. In: FERRI, M. G. (Coord.) **Fisiologia Vegetal**. São Paulo: EDUSP, 1979. p.343-392.

MONÉAM, N. M. A. Effects of presoaking on faba bean enzyme inhibitors and polyphenols after cooking. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.38, p.1479-1402, 1990.

OLIVEIRA, M. A.; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; MANDARINO, J. M. G.; LEITE, R. S. Produção de brotos de soja utilizando a cultivar BRS 216: caracterização físico-química e teste de aceitabilidade. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.16, n.1, p.34-41, 2013.

PAUCAR-MENACHO, L. M.; BERHOW, M. A.; MANDARINO, J. M. G.; CHANG, Y. K.; MEJIA, E. G. Effect of time and temperature on bioactive compounds in germinated soybean cultivar BRS258. **Food Research International**, v.43, n.7, p.1856-1865, 2010.

PHOMMALTH, S.; JEONG, Y. S.; KIM, Y.H.; HWANG, Y. H. Isoflavone composition within each structural part of soybean seeds and sprouts. **Journal of Crop Science and Biotechnology**, v.11, n.1, p.57-62, 2008.

QUINHONE JÚNIOR, A.; IDA, E. I. Profile of the contents of different forms of soybean isoflavonoids and the effect of germination time on these compounds and the physical parameters in soybean sprouts. **Food Chemistry**, v.166, p.173-178, 2015.

RAMADAN, E. A. Effect of processing and cooking methods on the chemical composition, sugars and phytic acid of soybeans. **Food and Public Health**, v.2, p.11-15, 2012.

RASHA MOHAMED K; A.Y. GIBRIEL; NAGWA M. H. RASMY; FERIAL M. ABU-SALEM; ESMAT A. ABOU- ARAB. Influence of legume processing treatment individually or in combination on their trypsin inhibitors and total phenolic content. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v.5, p. 1310-1322, 2011.

RIBEIRO, M. L. L.; IDA, E. I.; OLIVEIRA, M. C. N. Efeito da germinação de soja cv. BR-13 e paraná sobre ácido fítico, fósforo total e inibidores de tripsina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, n.1, p. 31-36, 1999.

RIBEIRO, M. L. L.; MANDARINO, J. M. G.; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; OLIVEIRA, M. C.; CAMPO, C. B.; NEPOMUCENO, A. L.; IDA, E. I. Isoflavone content and β -glucosidase activity in soybean cultivars of different maturity groups. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, p.19-24, 2007.

SANGRONIS, E.; MACHADO, C. J. Influence of germination on the nutritional quality of *Phaseolus vulgaris* and *Cajanus cajan*. **LWT Food Science and Technology**, v.40, p.116-120, 2007.

SHI, H.; NAM, P.; MA, A. Comprehensive profiling of isoflavones, phytosterols, tocopherols, minerals, crude protein, lipid, and sugar during Soybean (*Glycine max*) germination. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, p.4970-4976, 2010.

STATSOFT, Inc. 2007. **STATISTICA** (data analysis software system), version 8.0. www.statsoft.com.

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. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.43, n.5, p.1184-1192, 1995.

VIEIRA, R. F.; NISHIHARA, M. K. Comportamento de cultivares de mungo-verde (*Vigna radiata*) em Viçosa, MG. **Revista Ceres**, v.39, n.221, p.60-83, 1992.

VILAS BOAS, E. V. B.; BARCELOS, M. F. P.; LIMA, M. A. C. Tempo de germinação e característica físicas, químicas e sensoriais dos brotos de soja e de milho combinado nas formas isoladas e combinadas. **Ciência e Agrotecnologia**, v.26, n.1, p.148-156, 2002.

WADA, K.; NAKAMURA, K.; TAMAI, Y.; TSUJI, M.; KAWACHI, T.; HORI, A.; TAKEYAMA, N.; TANABASHI, S.; MATSUSHITA, S.; TOKIMITSU, N.; NAGATA, C. Soy isoflavone intake and breast cancer risk in Japan: from the Takayama study. **International Journal of Cancer**, v.133, p.952-960, 2013.

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

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

WONG, E.; FLUX, D. S. Estrogenic activity of red clover isoflavones and some of their degradation products. **Journal of Endocrinology**, v.24, p.341-348, 1962.

YUAN, J. P.; LIU, Y. B.; PENG, J.; WANG, J. H.; LIU, X. Changes of isoflavone profile in the hypocotyls and cotyledons of soybeans during dry heating and germination. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, n.19, p.9002-9010, 2009.

Tabela 1 – Efeito das variáveis do processo de germinação de soja BRS216 sobre as funções respostas Cbro, %Rend, β gli, Mgli, Agli e IsoT.

Ensaio	Variáveis originais e codificadas			Funções Respostas					
	X ₁ (h)	X ₂ (h)	X ₃ (dias)	Cbro (cm)	Rend (%)	β gli (μ mol/g)	Mgli (μ mol/g)	Agli (μ mol/g)	IsoT (μ mol/g)
1	-1 (2)	-1 (4)	-1 (3)	5,9 \pm 1,0	128	0,88 \pm 0,29	10,42 \pm 2,54	0,42 \pm 0,11	11,72 \pm 2,07
2	1 (6)	-1 (4)	-1 (3)	9,1 \pm 1,1	152	1,09 \pm 0,32	10,27 \pm 2,37	0,39 \pm 0,08	11,75 \pm 1,99
3	-1 (2)	1 (8)	-1 (3)	5,6 \pm 1,4	144	0,86 \pm 0,26	9,81 \pm 2,33	0,38 \pm 0,08	11,05 \pm 1,93
4	1 (6)	1 (8)	-1 (3)	8,4 \pm 1,1	166	1,51 \pm 0,47	10,43 \pm 2,48	0,44 \pm 0,11	12,38 \pm 2,02
5	-1 (2)	-1 (4)	1 (7)	18,5 \pm 3,1	254	1,41 \pm 0,45	8,31 \pm 2,61	0,11 \pm 0,05	9,83 \pm 1,84
6	1 (6)	-1 (4)	1 (7)	22,1 \pm 2,3	216	1,32 \pm 0,39	8,17 \pm 2,55	0,23 \pm 0,06	9,72 \pm 1,79
7	-1 (2)	1 (8)	1 (7)	16,9 \pm 3,1	258	1,12 \pm 0,35	8,51 \pm 2,66	0,29 \pm 0,06	9,92 \pm 1,87
8	1 (6)	1 (8)	1 (7)	19,9 \pm 2,0	232	1,45 \pm 0,46	8,19 \pm 2,56	0,22 \pm 0,03	9,86 \pm 1,79
9	0 (4)	0 (6)	0 (5)	14,5 \pm 1,9	196	1,28 \pm 0,39	8,89 \pm 2,57	0,29 \pm 0,05	10,46 \pm 1,88
10	0 (4)	0 (6)	0 (5)	13,4 \pm 3,1	204	1,42 \pm 0,42	10,02 \pm 2,79	0,36 \pm 0,06	11,8 \pm 2,08
11	0 (4)	0 (6)	0 (5)	14,6 \pm 2,4	200	1,57 \pm 0,50	8,17 \pm 2,34	0,53 \pm 0,18	10,27 \pm 1,69

*Expressos em base seca;

Cbro = Comprimento dos brotos, Rend = Rendimento dos brotos, β gli = teor de β glicosídeos, Mgli = teor de malonilglicosídeos, Agli = teor de agliconas e IsoT = teor de isoflavonas totais.

Tabela 2 – Composição química, vitamina C e atividade de inibidores de tripsina nas sementes e nos brotos de soja BRS216.

Caracterização Química	Teor	
	Soja BRS216	Brotos de Soja (ensaio 4)
Composição química (%)		
Proteínas	44,77 ± 2,89	47,25 ± 0,63
Lipídeos	17,66 ± 0,89	14,57 ± 0,58
Cinzas	6,59 ± 0,03	5,45 ± 0,14
Carboidratos totais	30,97 ± 1,46	32,73 ± 0,29
Vitamina C (mg/g)	1,47 ± 0,06	2,38 ± 0,10
Atividade de Inibidores de Tripsina (UIT/g)	38.593 ± 2.111	31.221 ± 2.502

*Expressos em base seca.

Tabela 3 - Perfil de isoflavonas nas sementes e nos brotos de soja BRS216.

Isoflavonas	Teor ($\mu\text{mol/g}$)	
	Soja BRS216	Brotos de Soja (ensaio 4)
β -Glicosídeos totais	1,25 \pm 0,29	1,51 \pm 0,47
Daidzina	0,71 \pm 0,13	1,03 \pm 0,02
Glicitina	0,12 \pm 0,02	0,12 \pm 0,01
Genistina	0,42 \pm 0,08	0,36 \pm 0,01
Malonilglicosídeos totais	5,70 \pm 1,39	10,43 \pm 2,48
Malonil-daidzina	2,16 \pm 0,27	4,86 \pm 0,09
Malonil-glicitina	0,40 \pm 0,07	0,62 \pm 0,01
Malonil-genistina	3,14 \pm 0,58	4,95 \pm 0,11
Agliconas totais	0,19 \pm 0,05	0,44 \pm 0,11
Daidzeína	0,05 \pm 0,01	0,26 \pm 0,00
Gliciteína	0,12 \pm 0,02	0,13 \pm 0,01
Genisteína	0,03 \pm 0,01	0,05 \pm 0,00
Isoflavonas Totais	7, 14 \pm 1,10	12, 38 \pm 2,02

*Expressos em base seca.

Figura 1 - Recipiente utilizado para o processo de germinação das sementes de soja BRS216 (a) e brotos de soja produzidos (b).

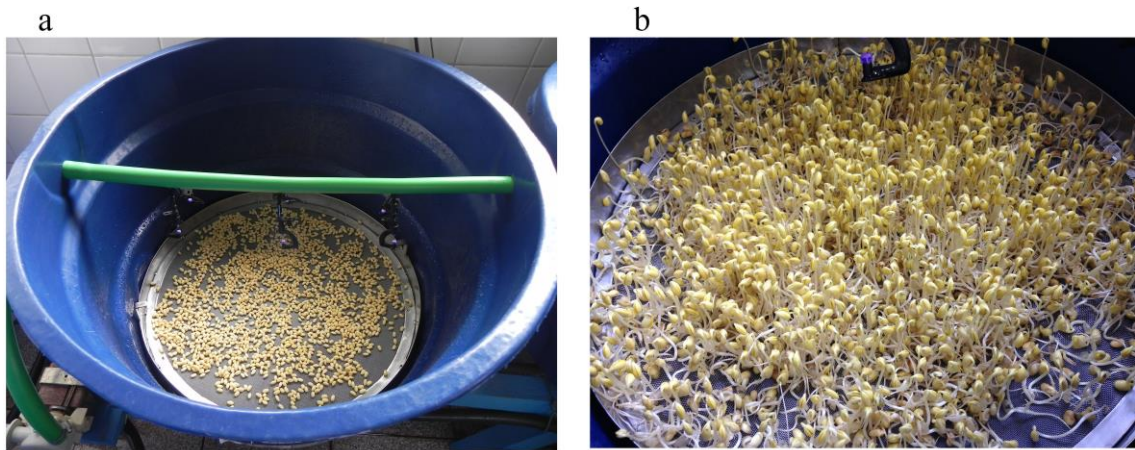


Figura 2 – Superfície de resposta para brotos de soja BRS216 em função do tempo de maceração e germinação. (a) Cbro. (b) % Rend. (c) Brotos de soja obtidos em diferentes condições de processo.

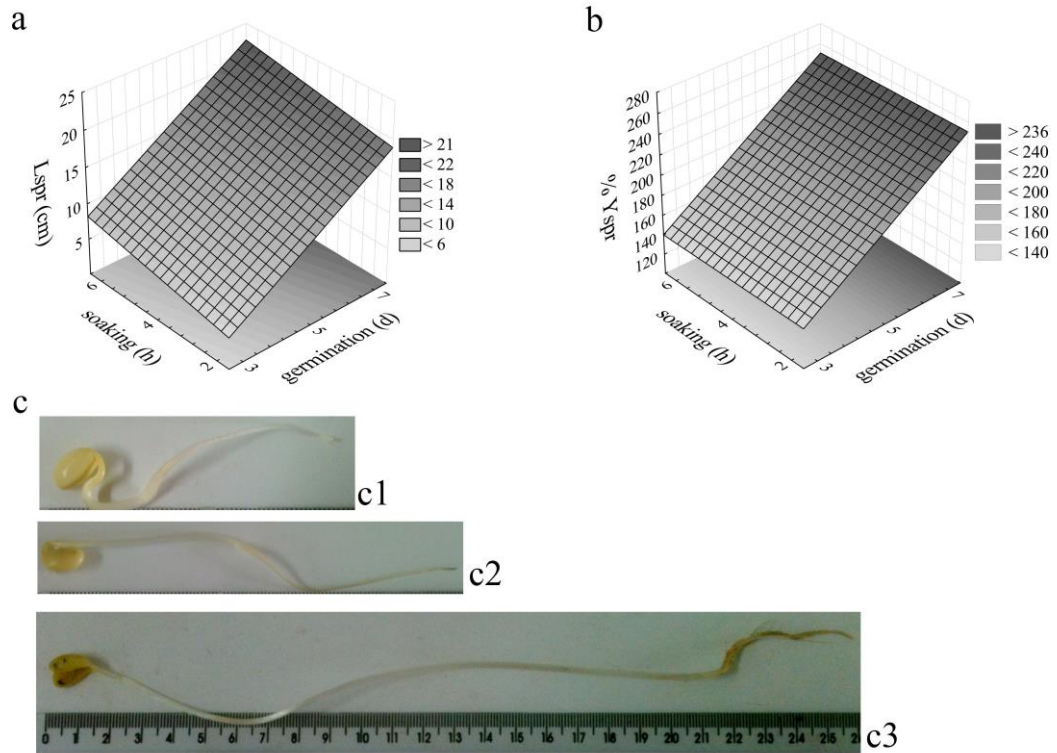
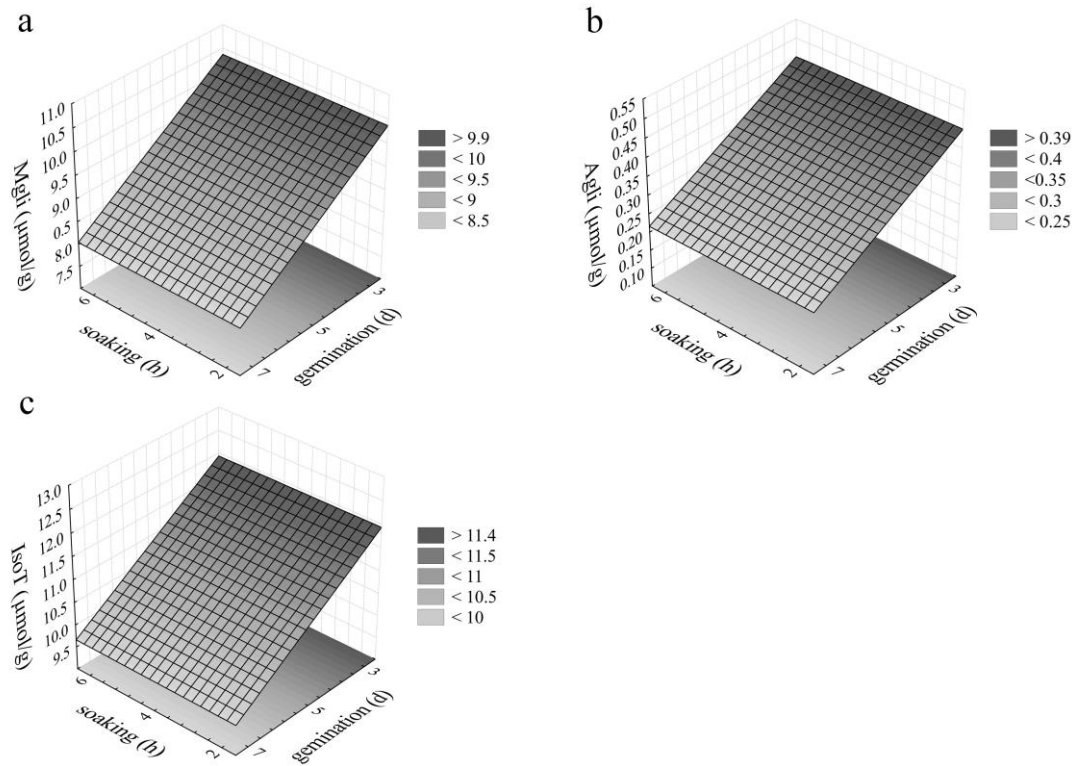


Figura 3 – Superfície de resposta para brotos de soja BRS216 em função do tempo de maceração e germinação. (a) Mgli. (b) Agli. (c) IsoT.



7 CONCLUSÕES

Para produção de brotos de soja BRS216 os efeitos do tempo de maceração e germinação foram lineares positivos e significativos sobre o comprimento dos brotos, enquanto que para o rendimento dos brotos, somente o efeito do tempo de germinação foi linear positivo e significativo.

Com relação ao teor de isoflavonas malonilglicosídeos, agliconas e isoflavonas totais dos brotos de soja, somente o efeito do tempo de germinação foi linear negativo e significativo.

Para obter brotos de soja com características próprias, comprimento e rendimento adequados, maior teor de isoflavonas malonilglicosídeos, agliconas e isoflavonas totais, o processo de germinação deve ser realizado utilizando 6 horas de maceração, 3 dias de germinação e independente da frequência de irrigação.

Os brotos de soja obtidos pelo processo selecionado, quando comparados às sementes mantiveram a composição química inalterada, apresentaram aumento de 61% no teor de vitamina C, redução de 19,10% na atividade de inibidores de tripsina e aumento no teor de isoflavonas (β -glicosídeos (20,8%), malonilglicosídeos (82,98%), agliconas (131,57%) e isoflavonas totais (73,38%)).