



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

DAIANA ROSSO FERREIRA

**COMPOSTOS BIOATIVOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE
DA SOJA PRETA**

Londrina
2013

DAIANA ROSSO FERREIRA

**COMPOSTOS BIOATIVOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE
DA SOJA PRETA**

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.

Orientadora: Profa. Dra. Adelaide Del Pino Beléia.

Londrina
2013

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

F383c Ferreira, Daiana Rosso.
Compostos bioativos e atividade antioxidante da soja preta
/ Daiana Rosso Ferreira. – Londrina, 2013.

60 f. : il.

Orientador: Adelaide Del Pino Beléia.

Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2013.

Inclui bibliografia.

1. Soja – Teor protéico – Teses. 2. Antioxidantes – Teses. 3. Soja como alimento – Teses. 4. Antocianina – Teses. 5. Compostos bioativos – Teses. I. Beléia, Adelaide Del Pino. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. III. Título.

CDU 641:54

DAIANA ROSSO FERREIRA

**COMPOSTOS BIOATIVOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA SOJA
PRETA**

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

Profa. Dra. Adelaide Del Pino Beléia
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Michele Rosset
Instituto Federal do Paraná - IFPR –
Jacarezinho

Dra. Josemeyre Bonifácio da Silva
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 29 de agosto 2013.

*Para Rossano Patrick Callai,
companheiro de todas as horas,
dedico.*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Adelaide Del Pino Beléia, pela dedicação e competência na orientação deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos fornecida.

À EMBRAPA SOJA e a Naturalle pelas amostras de soja fornecidas.

À Profa. Dra. Elza Ida pela disponibilidade do UPLC.

Ao Laboratório de Solos da Universidade Estadual de Londrina pela análise de minerais.

Aos docentes do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos – DCTA da Universidade Estadual de Londrina, pelo incentivo, atenção e conhecimentos transmitidos.

Aos funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, em especial a Neusa Cassula dos Santos, pela amizade e ajuda durante o trabalho no laboratório.

Aos colegas de mestrado, especialmente Juliana Almeida, Mônica Reis, Natália Bom, Cristiane Borges, Gleice Almeida, Cíntia Handa e Diogo Pedrollo, pela amizade e companherismo.

As verdadeiras amigas que fiz nesses dois anos de mestrado Marina Bertoni e Lilian Ravazzi.

À companheira de laboratório Aline Yamashita, por todo auxílio prestado. A Beatriz Bolanho, pela imensa ajuda dentro e fora do laboratório.

À minha amiga pra vida inteira Renata Monteiro Collares, por todo carinho, amizade e força.

A toda a minha família, em especial a minha mãe, Lizete Rosso, e ao meu irmão, Rafael Rosso, por todo amor, atenção, zelo, compreensão.

Em especial ao meu marido, Rossano Callai, por estar sempre comigo e não deixar que em momento nenhum o desânimo ou as dificuldades superassem a vontade de alcançar esse objetivo.

A todos que apoiaram e colaboraram para a realização desse trabalho.

A Deus, sem o qual nada seria possível.

*“O sucesso nasce do querer, da determinação e
persistência em se chegar a um objetivo.
Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos,
no mínimo fará coisas admiráveis.”*

José de Alencar

FERREIRA, Daiana Rosso. **Compostos bioativos e atividade antioxidante da soja preta**. 2013. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

RESUMO

A soja e seus derivados são fontes de nutrientes importantes, tais como proteínas, lipídeos, vitaminas e minerais. Além disso, contém compostos fenólicos, flavonoides e ácido fítico (AF), considerados antioxidantes, pois interagem com radicais livres (RL) ou seus precursores, impedindo danos oxidativos às biomoléculas. A soja preta [*Glycine max* (L.) Merrill] é uma variedade de soja pouco conhecida no Brasil, que além de possuir os benefícios relacionados ao consumo da soja, apresenta antocianinas na casca, auxiliando na atividade antioxidante. Grande parte da literatura científica refere-se à soja amarela, enquanto estudos sobre a soja preta ainda são escassos. O objetivo desse estudo foi analisar grãos de soja preta e amarela, crus e cozidos, quanto ao teor dos principais compostos bioativos e avaliar o potencial antioxidante, por diferentes métodos. Foram determinados compostos fenólicos totais, flavonoides totais, ácido fítico, isoflavonas, antocianinas, macro nutrientes e minerais (potássio, magnésio, ferro, fósforo). Atividade antioxidante (AA) foi avaliada pelos métodos de ABTS^{•+}, DPPH[•] e FRAP. A identificação e quantificação de isoflavonas por CLUE, e antocianinas pelo método do pH diferencial. Os grãos de soja preta crus apresentaram as maiores concentrações de compostos fenólicos, flavonoides e maior AA; após o processamento térmico houve um redução nestes teores nas duas cultivares de soja. Os teores de antocianinas totais nos grãos de soja preta sofreram uma redução de 83 % após o cozimento. As cultivares de soja preta e amarela cruas apresentaram diferenças no teor de fósforo total, mas não diferiram nos teores de fósforo fítico e AF. Observou-se uma redução no teor de AF após o cozimento sendo de 18,9 % na soja preta e de 36,2 % na soja amarela. Os valores de macro nutrientes encontrados apresentaram diferença. A cultivar de soja amarela apresentou maior teor de lipídeos, e o teor de proteínas foi o mesmo para as duas cultivares. Não houve diferença no teor de micro nutriente entre as cultivares de soja preta e amarela, a maior concentração foi do mineral potássio 1,55 e 1,72 g 100 g⁻¹ na soja preta e amarela, respectivamente. Cinco das doze formas químicas de isoflavonas foram detectadas e quantificadas nos grãos de soja preta e amarela, crus e cozidos. A forma malonilglicosídica apresentou a maior concentração nas duas cultivares, e após o cozimento houve um acréscimo da forma aglicona nas cultivares de soja preta e amarela. Assim, o consumo de soja preta ou mesmo a produção de novos alimentos a partir desses grãos poderá oferecer ao consumidor a possibilidade de diversificar a sua dieta, introduzindo um alimento com a mesma qualidade nutricional da soja amarela e, possivelmente, maiores benefícios à saúde.

Palavras-chave: Compostos fenólicos. Ácido fítico. Isoflavonas. Antocianinas.

FERREIRA, Daiana Rosso. **Bioactive Compounds and Antioxidant Activity of Black Soybeans**. 2013. 60 p. Dissertation (Master's Degree in Food Science) – State University of Londrina, Londrina, 2013.

ABSTRACT

Soy and soy products are a source of important nutrients, like proteins, lipids, vitamins and minerals. Furthermore, they have phenolics compounds, flavonoids and phytic acid (PA), considered antioxidants, because they interact with free radicals or with its precursors, preventing oxidative damage to biomolecules. Black soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] is a little known variety in Brazil, which also has the benefits related to soy consumption, anthocyanins presents in your seed coat, aiding in antioxidant activity. Most of the scientific literature refers to yellow soybeans, while studies on black soybeans are still scarce. The aim of this study was to analyze soybeans black and yellow, raw and cooked, the contents of the main bioactive compounds and to evaluate the antioxidant potential, by different methods. We determined total phenolics, total flavonoids, phytic acid, isoflavones, anthocyanins, macro nutrients and minerals (potassium, magnesium, iron, phosphorus). Antioxidant activity (AA) was assessed by the methods of ABTS•+, DPPH•, FRAP. The identification and quantification of isoflavones per HPLC, and anthocyanins by the method of differential pH. Soybeans raw black showed the greatest concentrations of phenolic compounds, flavonoids and higher AA, after thermal processing there was a significant reduction in these levels in the two soybean cultivars. The total anthocyanins in black soybean were reduced by 83% after cooking. The soybean cultivars black and yellow raw differences in the content of total phosphorus, but did not differ in levels of phytate phosphorus and PA. There was a reduction in PA content after cooking and 18.9% in soybean and black soybean yellow 36.2%. The amounts of macro nutrients found differences. The yellow cultivar showed higher lipid content, and protein content was the same for both cultivars. There was no difference in the content of micronutrients among soybean cultivars black and yellow, the highest concentration of the mineral potassium was 1.55 and 1.72 in soy black and yellow, respectively. Five of the twelve chemical forms of isoflavones were detected and quantified in soybeans black and yellow, raw and cooked. The way malonylglucosides showed the highest concentration in both cultivars and after cooking was an increase in the aglucones form in soybean cultivars black and yellow.

Keywords: Phenolic compounds. Phytic acid. Isoflavones. Anthocyanins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –Estrutura básica dos flavonoides.....	21
Figura 2 –Estrutura química de isoflavonas da soja.....	22
Figura 3 –Estrutura do cátion flavílico (a) e estrutura da antocianidina (b).....	23
Figura 4 –Estrutura da cianidina-3-O-glucosídeo.....	24
Figura 5 –Estrutura do ácido fítico.....	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –Teores de compostos fenólicos totais, flavonoides totais, antocianinas totais e monoméricas nos grãos de soja preta e amarela, crus e cozidos.....	38
Tabela 2 –Atividade Antioxidante avaliada pelos métodos de DPPH•, ABTS•+, FRAP nos grãos de soja preta e amarela, crus e cozidos	41
Tabela 3 –P total, P fítico, AF nos grãos de soja preta e amarela, crus e cozidos	44
Tabela 4 –Teores de isoflavonas nos grãos de soja preta e amarela, crus e cozidos	46
Tabela 5 –Teores de macro nutrientes nos grãos de soja preta e amarela, crus e cozidos	48
Tabela 6 –Teor de K, Mg, Fe nos grãos de soja preta e amarela, crus e cozidos	49
Tabela 7 –Massa de 100 grãos nas cultivares de soja preta e amarela cruas	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Atividade antioxidante
ABTS	2,2-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico
AF	Ácido fítico
AM	Antocianina monomérica
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
AT	Antocianina total
b.s.	Base seca
b.u.	Base úmida
Ca	Cálcio
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
DP	Desvio-padrão
EAG	Equivalente ácido gálico
EQ	Equivalente quercetina
Fe	Ferro
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
G	Gramma
HCl	Ácido clorídrico
K	Potássio
Mg	Magnésio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
nm	Nanômetro
P	Fósforo
PF	Fósforo Fítico
PT	Fósforo Total
rpm	Rotação por minuto
TCA	Ácido tricloroacético
TPTZ	2,4,6-tripiridil-s-triazina
UV-VIS	Ultra violeta - Visível
µg	Micrograma
µL	Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	15
2.1	OBJETIVO GERAL	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3'	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1	CARACTERÍSTICAS GERAIS DA SOJA	16
3.2	SOJA PRETA.....	18
3.3	COMPOSTOS BIOATIVOS DA SOJA.....	19
3.3.1	Compostos Fenólicos	20
3.3.2	Flavonoides	20
3.3.2.1	Isoflavonas	21
3.3.2.2	Antocianinas	22
3.3.3	Ácido Fítico.....	24
3.4	CAPACIDADE ANTIOXIDANTE	26
3.4.1	Métodos Utilizados para Determinação da Capacidade Antioxidante	26
4	MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1	MATERIAL.....	28
4.1.1	Soja	28
4.1.2	Reagentes	28
4.2	MÉTODOS.....	28
4.2.1	Obtenção dos Grãos Hidratados	28
4.2.2	Obtenção dos Grãos Cozidos.....	29
4.2.3	Extração de Componentes Antioxidantes.....	29
4.2.4	Determinação do Teor de Compostos Fenólicos Totais.....	29
4.2.5	Determinação do Teor de Flavonoides Totais	30
4.2.6	Determinação da Atividade Antioxidante	30
4.2.6.1	Atividade antioxidante avaliada pelo sequestro do radical livre DPPH•	30

4.2.6.2	Atividade antioxidante avaliada pelo poder de redução do ferro FRAP	31
4.2.6.3	Atividade antioxidante avaliada pelo sequestro do radical livre ABTS•+	31
4.2.7	Determinação de Ácido Fítico.....	32
4.2.8	Antocianinas Totais e Monoméricas	33
4.2.9	Quantificação de Isoflavonas por CLUE	34
4.2.10	Determinação de Proteínas	35
4.2.11	Determinação de Lipídeos.....	35
4.2.12	Determinação de Umidade	35
4.2.13	Determinação de Cinzas	35
4.2.14	Determinação de Carboidratos.....	36
4.2.15	Determinação de Minerais.....	36
4.2.16	Massa de 100 Grãos	36
4.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
5	RESULTADO E DISCUSSÃO	38
5.1	MICROCONSTITUINTES ANTIOXIDANTES.....	38
5.2	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	41
5.3	DETERMINAÇÃO DE P TOTAL, P FÍTICO E AF	43
5.4	TEORES DE ISOFLAVONAS.....	45
5.5	TEORES DE MACRO NUTRIENTES	47
5.6	TEORES DE MINERAIS.....	49
5.7	MASSA DE 100 GRÃOS	50
6	CONCLUSÕES	51
	REFERÊNCIAS	52

1 INTRODUÇÃO

Estudos mostrando a relação entre dieta e saúde, somados ao crescente interesse de alguns indivíduos em consumir alimentos mais saudáveis, têm levado a indústria alimentícia ao desenvolvimento de novos produtos, cujas funções pretendem ir além do fornecimento de nutrientes básicos e da satisfação do paladar do consumidor (BEHRENS; DA SILVA, 2004).

Diversos estudos apontaram para a ação benéfica de componentes alimentares, dando origem a uma nova ciência, conhecida hoje como a “Ciência dos Alimentos Funcionais”. Os alimentos funcionais devem ser reconhecidos como alimentos, e os efeitos devem ser demonstrados em quantidades que possam ser normalmente ingeridos em uma dieta; não são pílulas ou cápsulas, mas componentes normais de um padrão alimentar (VIGGIANO, 2005).

Entre os constituintes desta categoria, a soja figura como um dos alimentos funcionais mais completos e estudados, pois contém componentes que agem no metabolismo reduzindo risco de várias patologias, inclusive o câncer (CHANG, 2001).

Das substâncias funcionais da soja destacam-se as proteínas e as isoflavonas, associadas à atividade anticarcinogênica, diminuição do colesterol plasmático e redução da perda de massa óssea (MESSINA, 1999).

Dentre as variedades de soja, a preta se diferencia por sua casca escura, possuindo além das características próprias da soja, isoflavonas e proteínas, atividade antioxidante devido aos pigmentos fenólicos da casca denominados de antocianinas. (TAKAKASHI et al., 2005; XU; CHANG, 2008a).

Diante dos potenciais efeitos funcionais da soja preta, o objetivo desse trabalho foi quantificar os principais compostos bioativos presentes e avaliar o potencial antioxidante, por diferentes métodos nos grãos de soja preta crus e cozidos; fazendo uma comparação com uma cultivar amarela destinada ao consumo humano.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar grãos de soja preta e amarela, crus e cozidos, quanto ao teor dos principais compostos bioativos e avaliar o potencial antioxidante, por diferentes métodos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar o teor de compostos fenólicos totais e flavonoides totais;
- Avaliar a capacidade antioxidante através dos métodos ABTS^{•+}; DPPH[•] e FRAP;
- Quantificar a principal antocianina (cianidina-3-O-glicosídeo) presente na soja preta;
- Analisar o teor e o perfil das isoflavonas presente na soja preta;
- Determinar o teor dos minerais: potássio, magnésio, fósforo e ferro;
- Determinar a composição centesimal.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA SOJA

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é uma leguminosa cultivada pelos chineses há cerca de cinco mil anos. Há três mil anos se espalhou pela Ásia e, no início do século XX, passou a ser cultivada comercialmente nos Estados Unidos. A partir de então, houve um rápido crescimento na produção, com o desenvolvimento dos primeiros cultivos comerciais (LIU, 2004).

No Brasil, a soja foi introduzida na Bahia por Gustavo Dutra em 1882, com sementes trazidas dos Estados Unidos; entretanto, os primeiros relatos do seu cultivo comercial datam de 1924, no Rio Grande do Sul. Em 1941, a soja aparecia pela primeira vez nas estatísticas agrícolas oficiais (EMBRAPA, 1981; COSTA, 1996).

Hoje, o Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja. Na safra 2009/2010, a cultura ocupou uma área de 23,6 milhões de hectares, o que totalizou uma produção de 68,7 milhões de toneladas. A produtividade média da soja brasileira foi de 2941 kg por hectare (EMBRAPA, 2011).

A soja contém cerca de 40 % de proteínas de alta qualidade, aproximadamente 20 % de lipídeos com alta concentração de ácidos graxos poliinsaturados, aproximadamente 35 % de carboidratos, vitaminas do complexo B e minerais como magnésio, fósforo, ferro e zinco (CARRÃO-PANIZZI, 2000; MORAES et al., 2006). Representa uma fonte proteica vegetal importante devido às propriedades funcionais e o elevado valor nutritivo (LIU et al., 2007; MUJOO; TRINH; NG, 2003; RIBLETT et al., 2001), sendo rica em aminoácidos, como leucina e lisina (CARRÃO-PANIZZI; BORDIGNON, 2000), mas limitada em aminoácidos sulfurados como metionina, cisteína (CARRÃO-PANIZZI; BORDIGNON, 2000; SNYDER; KWON, 1987).

As principais frações protéicas da soja são a 2S, 7S, 11S e 15S conforme coeficientes de sedimentação. O conteúdo percentual das frações 2S, 7S, 11S e 15S correspondem a 15 %, 34 %, 41,9 % e 9,1 %, respectivamente (TAY; XU; PERERA, 2005). A fração 2S é composta por proteínas biologicamente ativas, inibidores de tripsina e globulinas 2S. A fração 7S é composta pelas enzimas β -amilase e lipoxigenase, hemaglutinina e citocromo C, e pela globulina conhecida

como β -conglucina. A glicina (11S) e β -conglucina (7S) são as duas principais proteínas de reserva da soja e representam 70 % do total (LIU et al., 2007; MUJOO; TRINH; NG, 2003 ; RIBLETT et al., 2001).

Os lipídeos da soja compreendem 15 % de ácidos graxos saturados e 85 % de insaturados. Dentre os ácidos graxos poli-insaturados destacam-se o ácido linoléico (57 %) e o linolênico (7 %), considerados essenciais (MORAIS; SILVA, 1996; MESSINA, 1999).

Em relação aos carboidratos, a soja apresenta em sua composição carboidratos solúveis, dos quais 2,5 a 8,2 % são sacarose, 0,1 a 0,9 % rafinose e 1,4 a 4,1 % estaquiose. Dentre os carboidratos insolúveis, destacam-se a celulose, a hemicelulose e a pectina são encontrados principalmente na parede celular e traços de amido (LIU, 1997).

Os grãos de soja contêm 5 % de minerais, sendo que o potássio encontra-se em maior concentração, seguido pelo fósforo, magnésio, enxofre, cálcio, cloro e sódio (MORAES et al., 2006). A soja também é fonte de vitaminas hidrossolúveis, como a tiamina, riboflavina, niacina, ácido pantotênico, biotina e ácido fólico e vitaminas lipossolúveis, como a vitamina A (β -caroteno) e E (tocoferol) (LIU, 1997).

A princípio, a importância da soja na nutrição humana era atribuída ao seu elevado teor protéico de alto valor biológico, contudo, hoje sabe-se que os grãos de soja são também uma fonte rica de fitoquímicos, os quais conferem importantes efeitos benéficos à saúde humana e animal (SETCHELL; CASSIDY, 1999).

No Brasil, o produto derivado de soja mais consumido e de maior valor comercial é o óleo (MALHOTRA; COUPLAND, 2004), mas, não há um consumo generalizado da soja e a falta de produtos à base de soja e associado ao sabor característico tem limitado a aceitabilidade. A situação está mudando face à disponibilidade de tecnologias que favorecem a melhora do sabor, como o tratamento térmico dos grãos ou melhoramento genético para eliminação da lipoxigenase, enzima responsável pelo desenvolvimento do sabor característico (CARRÃO-PANIZZI, 2001).

Assim, a soja e seus derivados constituem matérias-primas altamente promissoras para uso na indústria de alimentos, sobretudo para a adição em produtos à base de cereais e de carnes.

3.2 SOJA PRETA

A soja preta é uma variedade de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] que tem o tegumento preto (CHANG; SU; SHIAU, 2009; FENG et al., 2007) devido à presença de antocianinas, que são compostos fenólicos do grupo dos flavonoides, amplamente distribuídos nas plantas e consumidos na dieta humana através do consumo de feijão, frutas e legumes (LEE et al., 2009).

É nutricionalmente atraente, pois possui proteína de boa qualidade sendo fonte de isoflavonas e vitaminas B e E (HUANG; CHOU, 2009; CHANG; SU; SHIAU, 2009). As isoflavonas podem prevenir a osteoporose, o câncer de mama e doenças cardiovasculares (SONG; PAIK; JOUNG, 2008), e poucas pessoas são alérgicas às proteínas da soja (WILSON; BLASCHEK; DE MEJIA, 2005). Sendo uma fonte abundante e barata de proteínas e calorias (HUANG; CHOU, 2009).

A soja preta tem sido usada na medicina tradicional chinesa como alimento funcional, mas ainda não é amplamente produzida e consumida como a soja amarela (FENG et al., 2007). Os estudos demonstraram que a soja preta pode ter mais micronutrientes bioativos que a amarela (KIM et al., 2005), pois o conteúdo de isoflavonas da soja preta é superior ao da soja amarela (KIM et al. 2007).

A ingestão média de antocianinas principalmente de frutas pelos cidadãos americanos tem sido estimada em até 180-215 mg/dia superior a outros flavonoides, tais como os flavonóis (CLIFFORD, 2000). As antocianinas estão associadas a uma vasta gama de atividades biológicas incluindo, antioxidante (TSUDA; HORIO; OSAWA, 2003; WANG; CAO; PRIOR, 1997), antiinflamatória (WANG; MAZZA, 2002; YODIM et al., 2002) e anticarcinogênica (BOMSER et al., 1996; HOU, 2003).

Segundo Lee et al. (2009) as três principais antocianinas isoladas e identificadas a partir do tegumento da soja preta são: delphinidina-3-O-glicosídeo, cianidina-3-O-glicosídeo e petudinina-3-O-glicosídeo, sendo a cianidina-3-O-glicosídeo presente em maior quantidade.

Estudos recentes sobre a atividade antioxidante mostram que a soja preta possui maior atividade inibitória contra a oxidação do LDL (proteínas de baixa densidade), apresenta capacidade de sequestrar radicais DPPH (2-difenil 1-picrilhidrazil), além da redução do poder oxidante do ferro (FRAP) e de absorver radicais oxigênicos (ORAC) (XU; CHANG, 2008a).

A soja deve ser processada antes do consumo, e a sua capacidade de promoção de saúde é dependente do tipo de processamento. O processamento dos legumes não só melhora o sabor e a palatabilidade, mas também aumenta a biodisponibilidade de nutrientes, pela inativação de fatores antinutricionais, como inibidores de tripsina e aglutininas heme. O cozimento da soja é um dos métodos mais tradicionais para o consumo humano nos países do Leste Asiático. Antes da cocção, a imersão em água é um passo importante, pois ajuda a suavizar a textura e reduz o tempo de cozimento; cozinhar sob pressão também pode ser usado para esta finalidade (XU; CHANG, 2008b).

O processamento térmico pode causar reações químicas e alterações físicas, incluindo a lixiviação de fenólicos solúveis em água, a degradação dos polifenóis, repartição e transformação de compostos fenólicos, e a formação de produtos complexos a partir de compostos fenólicos e proteínas (DAVIES et al., 1998). Toda et al. (2000) relataram mudanças nas isoflavonas durante o processo de cocção e torração da soja integral.

Estudos anteriores têm enfatizado o papel das isoflavonas e as antocianinas foram negligenciadas, especialmente a quantificação e atividade biológica (LEE et al., 2009). Por isso, faz-se necessária uma maior investigação da presença desse composto, já que os estudos mostram seus benefícios à saúde humana.

3.3 COMPOSTOS BIOATIVOS DA SOJA

A dieta habitual fornece, além dos macro e micronutrientes essenciais, alguns compostos químicos, que exercem uma potente atividade biológica. Esses compostos são chamados de compostos bioativos ou fitoquímicos e podem desempenhar diversos papéis em benefício da saúde humana (CARRATU; SANZINI, 2005).

Os compostos bioativos são, em sua maioria, metabólitos secundários geralmente relacionados aos sistemas de defesa das plantas, contra a radiação ultravioleta e agressões de insetos ou patógenos (MANACH, 2004).

Devido à incompleta eficiência de nosso sistema endógeno de defesa, à influência de fatores externos como o fumo, a poluição, a radiação UV e a alimentação, bem como a existência de alguns processos fisiopatológicos (envelhecimento, obesidade, inflamação e isquemia), está bem estabelecida a

importância de compostos bioativos provenientes da dieta, que podem ajudar a suprir esta deficiência e também promover proteção, prevenção ou redução dos efeitos causados pelo estresse oxidativo (HUANG; OU; PRIOR, 2005; PIETTA, 2000).

3.3.1 Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos estão amplamente distribuídos no reino vegetal e são definidos como substâncias que possuem um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais (SHAHIDI; NACZK, 1995).

Os compostos fenólicos são considerados metabólitos secundários sintetizados pelas plantas durante o desenvolvimento normal e em resposta a condições de estresse, tais como infecções, radiação ultravioleta, entre outros. Nos alimentos, os compostos fenólicos contribuem com o gosto amargo, adstringência, cor, sabor, odor e estabilidade oxidativa (NACZK; SHAHIDI, 2004).

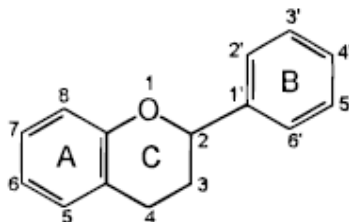
Nos grãos de soja o teor de compostos fenólicos é variável e o método de extração pode influenciar nos resultados. Ao utilizar diferentes solventes para a extração, Xu e Chang (2007a) encontraram nas variedades de soja preta e amarela uma variação de 3,73 a 6,18 e 2,27 a 2,62 mg equivalente de ácido gálico (EAG) g⁻¹ no teor de compostos fenólicos, respectivamente.

Segundo Xu e Chang (2008c) alguns processamentos como a maceração, fervura e cozimento sob vapor podem causar mudanças no teor de compostos fenólicos. Para os autores, as perdas se devem à passagem dos compostos fenólicos para a água de hidratação, bem como a interconversão desses compostos durante o processamento.

3.3.2 Flavonoides

Os flavonoides são compostos fenólicos formados a partir dos aminoácidos aromáticos fenilalanina e tirosina e o ânion malonato. Dentre as classes de flavonoides os mais importantes são as flavonas, flavononas, isoflavonas, flavonóis, flavan-3-ol e antocianinas (Figura 1) (PIETTA, 2000).

Figura 1 – Estrutura básica dos flavonoides



Fonte: PIETTA, 2000.

Mais de 4.000 flavonoides diferentes já foram identificados em plantas e há muitas variações no tipo e na quantidade, relacionadas ao estágio de desenvolvimento, grau de maturidade e condições ambientais (COOK; SAMMAN, 1996).

O perfil de flavonoides se difere nos grãos e folhas da soja; nas folhas principalmente flavonoides derivados do camptoferol, enquanto que nos grãos, estas estruturas não estavam presentes, sendo as isoflavonas as formas predominantes (HO et al., 2002).

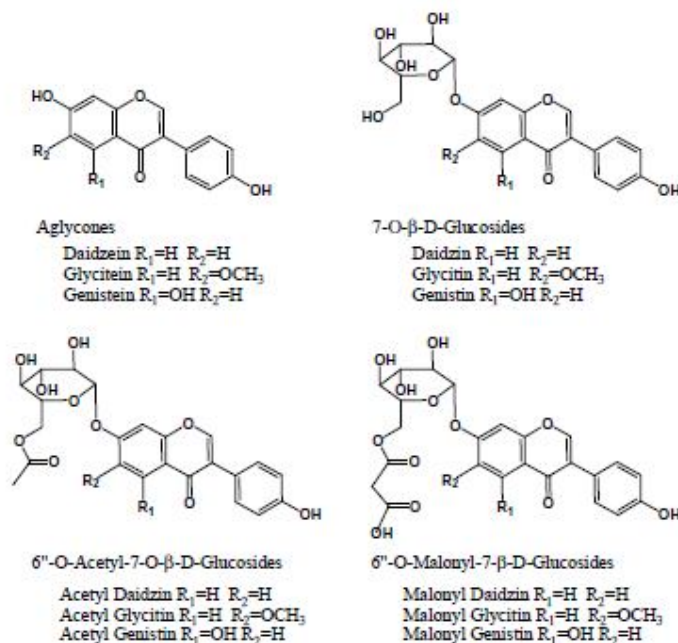
Xu e Chang (2007a) ao utilizar diferentes solventes para a extração, encontraram teores de flavonoides na soja de variedade preta e amarela variando de 0,72 a 2,57 e 0,25 a 0,50 mg de equivalente de catequina (EC) g⁻¹, respectivamente.

3.3.2.1 Isoflavonas

As isoflavonas são compostos fenólicos pertencentes ao grupo dos flavonoides encontrados quase que exclusivamente nas leguminosas e fabáceas (TAPIERO; NGUYENBA; TEW, 2002). Na soja podem existir em quatro formas químicas, β-glicosídeos (daidzina, genistina e glicitina), agliconas (genisteína, daidzeína e gliciteína) e conjugadas malonilglicosídeo (6"O-malonil-daidzina, 6"O-malonil-genistina e 6"O-malonil-glicitina) e acetilglicosídeo (6"O-acetil-daidzina, 6"O-acetil-genistina e 6"O-acetil-glicitina) (Figura 2) (LIU, 1997). As formas agliconas têm estruturas similares ao estrógeno, sendo capazes de se ligarem aos receptores desse hormônio exercendo efeito modular seletivo. Em alguns tecidos desencadeiam efeito estrogênico, enquanto que em outros, o efeito é anti-estrogênico (MESSINA; LOPRINZI, 2001). Além disso, desempenham papel

essencial na prevenção de certos tipos de cânceres e na redução do risco de doenças cardiovasculares (LEE; AHN; CHUNG, 2003).

Figura 2 – Estrutura química das isoflavonas da soja



Fonte: SHAO et al., 2009.

Em relação à capacidade antioxidante, os isoflavonoides glicosilados podem ser transformados, por processos enzimáticos em agliconas como, daidzeína e genisteína, cuja atividade antioxidante é superior às das formas glicosiladas, daidzina e genistina (PARK et al., 2001).

O teor de isoflavonas nas cultivares é influenciado por diversos fatores, que incluem condições ambientais e genéticas, além do processamento, os quais determinam a concentração e o perfil das isoflavonas nos produtos derivados de soja e nos alimentos que a contém como ingrediente (GENOVESE; LAJOLO, 2002).

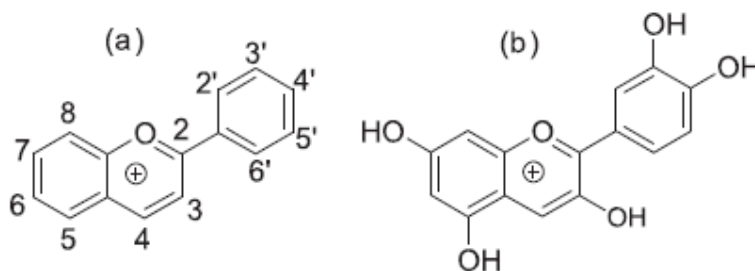
3.3.2.2 Antocianinas

As antocianinas são compostos da família dos flavonoides e constituem grupo de pigmentos responsáveis pelas cores em flores, frutas, folhas, caules e raízes de plantas (MARKAKIS, 1982). Estruturalmente, as antocianinas são derivadas

glicosiladas do cátion 2-fenil-benzopirilium, também denominado de cátion flavílico (JACKMAN; YADA; TUNG, 1987).

Os pigmentos ocorrem geralmente na forma de antocianinas, que são derivadas das antocianidinas. As antocianidinas não possuem grupos glicosídicos e a maioria possui hidroxilas nas posições 3, 5 e 7. Já nas antocianinas, uma ou mais destas hidroxilas estão ligadas a açúcares, sendo os de mais comuns glicose, xilose, arabinose, ramnose, galactose ou dissacarídeos constituídos por esses açúcares, aos quais podem estar ligados ácidos fenólicos, como *p*-coumárico, cafêico, fenílico e vanílico. O açúcar presente nas moléculas de antocianinas confere maior solubilidade e estabilidade a estes pigmentos, quando comparados com as antocianidinas (Figura 3) (MARÇO; POPPI; SCARMINIO, 2008).

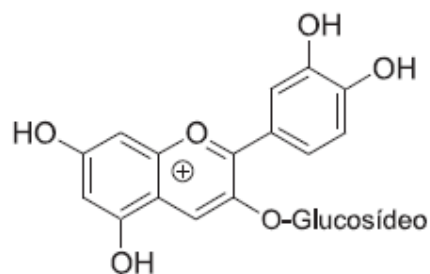
Figura 3 - Estrutura do cátion flavílico (a) e estrutura da antocianidina cianidina (b)



Fonte: MARÇO; POPPI; SCARMINIO, 2008.

O termo antocianina tem origem grega, sendo que “antho” significa flor e “kiano” significa azul. Este termo foi proposto por Marquat em 1835 para designar os pigmentos azuis, violetas e vermelhos encontrados em flores. Atualmente, sabe-se que as antocianinas são responsáveis pelas cores laranja, rosa, vermelha, violeta e azul de flores, frutas e também de folhas (HARDONE, 1994). Esses pigmentos conferem diferentes tonalidades de cor, oscilando entre vermelho, laranja e roxo, de acordo com condições intrínsecas, como o pH, encontradas nos vegetais (BROUILLARD, 1983). A Figura 4 é um exemplo de estrutura de antocianina presente na maioria dos vegetais, a cianidina 3-O-glicosídeo.

Figura 4 – Estrutura da cianidina-3-O-glucosídeo



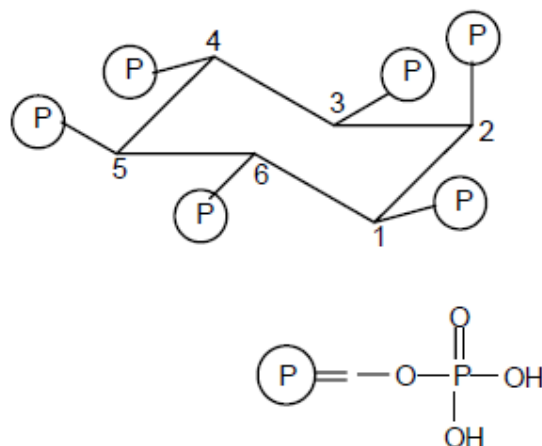
Fonte: MARÇO; POPPI; SCARMINIO, 2008.

As antocianinas são compostos solúveis em água e sensíveis ao calor (SHAHIDI; NACZK, 1995) apresentando-se, na maior parte das vezes, glicosiladas com açúcares que auxiliam na estabilização da molécula (FRANCIS, 1989). As antocianinas estão presentes na casca da soja preta. Pesquisas recentes sobre a atividade antioxidante de antocianinas mostram que, a soja preta possui atividade inibitória contra a oxidação do LDL (LEE et al., 2009).

3.3.3 Ácido Fítico

O ácido fítico (AF) ou ácido mio-inositol hexafosfórico ou 1,2,3,4,5,6,-*hexakis* (diidrogeno fosfato) *mio*-inositol (IUPAC-IUB, 1968), é encontrado na maioria das leguminosas, cereais e nos tubérculos, representando a reserva primária de fósforo das plantas. O ácido fítico pode existir na forma de ácido livre, fitato (sal de cálcio do AF) ou fitina (sal de cálcio/magnésio do AF) dependendo do pH e íons metálicos presentes (Figura 5) (OATWAY; VASANTHAN; HELM, 2001).

Figura 5 – Estrutura do ácido fítico



Fonte: COSTELLO; GLONEK; MYERS, 1976.

Nos grãos de soja, a concentração de fitato varia de 1 a 1,47 % (base seca), equivalente a 51,4-75,56 % do total de fósforo presente, no entanto, a concentração detectada não depende apenas da variedade, mas das condições de processamento e metodologia empregada. Nos produtos derivados de soja, o teor de ácido fítico é elevado em farinhas (1,42 %) e isolados protéicos (1,52 %) (LIU, 1997). O AF tem sido considerado um antinutriente devido ao seu efeito inibitório na biodisponibilidade dos minerais, devido a sua ação quelante, porém esta propriedade confere ao AF a função de antioxidante, devido à sua capacidade de quelar o ferro, bloqueando todas as possibilidades de ligação e impedindo que este mineral catalise a formação de hidroxilas (ZHOU; ERDMAN, 1995).

Recentes pesquisas têm focado nos possíveis efeitos benéficos dos alimentos contendo fitato para a saúde, dentre estes efeitos podem ser citados a diminuição no risco de doenças cardiovasculares, do índice de colesterol e de triglicérides, da formação de cálculos renais e ação contra alguns tipos de cânceres (MASSEY et al., 2005).

3.4 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

As moléculas orgânicas e inorgânicas e os átomos que contêm um ou mais elétrons não pareados, podem ser classificados como radicais livres. Esta configuração faz dos radicais livres moléculas instáveis e quimicamente muito reativas (POMPELLA, 1997).

Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias que, quando presentes em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável em alimentos, são capazes de inibir ou retardar substancialmente a oxidação daquele substrato (KAUR; KAPOOR, 2001).

Os estudos sobre antioxidantes têm ressaltado, o uso de nutrientes isolados no tratamento e prevenção de doenças, entretanto, nos alimentos é encontrada uma grande variedade de substâncias que podem atuar em sinergismo na proteção das células (JACOB, 1995).

3.4.1 Métodos Utilizados para Determinação da Capacidade Antioxidante

A determinação da capacidade antioxidante em produtos alimentícios é um grande desafio para os pesquisadores. Devido à falta de um método padrão, torna-se difícil comparar resultados de diferentes pesquisas e a indústria química e nutracêutica não pode estabelecer um controle efetivo dos seus produtos contendo antioxidantes (HUANG; OU; PRIOR, 2005).

Evidências epidemiológicas crescentes do papel de alimentos antioxidantes na prevenção de certas doenças têm conduzido ao desenvolvimento de grande número de métodos para determinar a capacidade antioxidante (PÉREZ-JIMÉNEZ; SAURA-CALIXTO, 2006). Estes métodos podem ser baseados na captura do radical peroxila (ORAC e TRAP), poder de redução do metal (FRAP e CUPRAC), captura do radical hidroxila (método de desoxirribose), captura do radical orgânico (ABTS^{•+}, DPPH[•]), quantificação de produtos formados durante a peroxidação de lipídeos (TBARS, oxidação do LDL, co-oxidação do β -caroteno) (FRANKEL; MEYER, 2000; SÁNCHEZ-MORENO, 2002; ARUOMA, 2003). Dentre estes métodos, ABTS, FRAP, DPPH e ORAC são os dos mais usados (PÉREZ-JIMÉNEZ; SAURA-CALIXTO, 2006).

O método de DPPH é baseado na captura do radical DPPH[•] (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) por antioxidantes, produzindo um decréscimo da absorvância a 515 nm (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995). A capacidade da amostra em reduzir o DPPH[•], ou seja, evitar a sua oxidação, é evidenciada pela porcentagem de DPPH[•] restante no sistema, que pode ser correlacionado com a concentração de antioxidante (TOMEI; SALVADOR, 2007). O teste de redução do radical DPPH[•] está sendo muito empregado para determinar a capacidade antioxidante devido a sua rapidez e facilidade.

O ensaio baseado na captura do radical ABTS^{•+}, também está sendo amplamente utilizado para estimar a capacidade antioxidante. Ao contrário do radical DPPH que é obtido diretamente sem uma preparação prévia, o radical ABTS^{•+} precisa ser gerado, por meio de uma reação química, enzimática ou eletroquímica. Neste ensaio, o ABTS é oxidado pelo radical peroxil ou outros oxidantes para ser um radical cátion, ABTS^{•+}, que é intensamente colorido, e a atividade antioxidante é medida pela capacidade que o composto em teste possui em decrescer a cor reagindo diretamente com o radical ABTS^{•+} (KUSKOKI et al., 2005).

O método de FRAP é baseado na reação que mede a redução férrica de 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) para um produto colorido, detectando compostos com potencial redox < 0,7 V, o potencial redox do Fe⁺³-TPTZ. O poder redutor está relacionado com o grau de hidroxilação e com a extensão dos conjugados presentes na estrutura dos flavonoides (PULIDO; BRAVO; SAURA-CALIXTO, 2000). O ensaio de FRAP mede somente os mecanismos de transferência de elétrons, então em combinação com outros métodos pode ser útil na distinção de mecanismos antioxidantes (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Soja

Para as análises nos grãos de soja preta, crus e cozidos foram utilizados grãos fornecidos pela Naturalle (Uberlândia - MG), cultivar NT 7001 (safra 2010/2011), e para as análises comparativas foi utilizada a soja amarela, e uma cultivar destinada ao consumo humano, BRS 216 (safra 2010/2011), fornecido pela EMBRAPA – Soja (Londrina – PR).

4.1.2 Reagentes

O padrão de Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchromo-2 ácido carboxílico) foi obtido da Sigma Aldrich Chemie (Steinheim, Alemanha), a Quercetina da Acros Organics, e o padrão de Ácido Gálico da Quimibrás. Os reagentes ABTS (2,2-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6 ácido sulfônico), DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) foram obtidos da Sigma Aldrich Chemie (Steinheim, Alemanha), TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina) e Persulfato de Potássio da Acros Organics. O reagente de Folin-Ciocalteu foi obtido da Laborclin. Os demais reagentes utilizados nas análises foram de grau analítico e de diferentes fontes/marcas.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Obtenção dos Grãos Hidratados

A hidratação dos grãos de soja preta e amarela foi realizada com um conteúdo de água 2,2 vezes o peso da amostra por 16 horas a 25 °C. A hidratação com teor reduzido de água evita a perda de substâncias solúveis para o meio e o possível descarte das substâncias antes da cocção.

4.2.2 Obtenção dos Grãos Cozidos

Os grãos de soja preta e amarela hidratados foram cozidos numa panela de pressão por 10 minutos a temperatura de 180 °C, mantendo-se a água de hidratação e adicionando-se 500 mL de água destilada. Após a cocção, os grãos de soja foram drenados, congelados e liofilizados. Na sequência foram triturados em liquidificador e em moinho analítico; a farinha obtida foi passada por tamis de 40 mesh e armazenada sob refrigeração até o momento das análises.

4.2.3 Extração de Componentes Antioxidantes

A extração dos compostos fenólicos foi realizada conforme descrito por Hung et al. (2009). Um grama da amostra, previamente triturada e peneirada em tamis de 40 mesh foi misturado com 10 mL de etanol 80 % e agitado por 20 minutos a 200 rpm em mesa agitadora (Shaker Marconi, RT 500) a 25 °C. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 2500 x g (Harrier, 15/80 MSE) por 10 minutos, sendo o sobrenadante (extrato contendo os compostos fenólicos) coletado. O resíduo foi re-extraído duas vezes com 10 mL de etanol 80 % e os sobrenadantes foram combinados. Por último, o extrato obtido foi concentrado em rota-evaporador (Tecnal, TE 210) a temperatura de 40 °C, e o volume completado para 10 mL com etanol 80 %, sendo estocado a -26 °C até o momento da análise.

4.2.4 Determinação do Teor de Compostos Fenólicos Totais

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado por Folin-Ciocalteu, conforme descrito por Swain e Hillis (1959), com algumas modificações. Neste método ocorre a redução do reagente pelos compostos fenólicos formando um complexo azul, determinada a 760 nm. Para a reação colorimétrica foi utilizado uma alíquota de 0,5 mL de extrato devidamente diluído e adicionados 2,5 mL de solução aquosa de Folin-Ciocalteu a 10 % e 2 mL de solução de carbonato de sódio 7,5 %. A mistura foi incubada por 5 minutos em banho-maria a 50 °C, e a absorbância medida a 760 nm usando etanol absoluto como branco (espectrofotômetro UV-VIS). A concentração total de fenóis de cada extrato foi quantificada por meio de uma curva padrão (0,1 a 0,6 mM) preparada com ácido gálico. O resultado foi expresso

como mg de equivalente de ácido gálico em base seca por 100 g de amostra (mg EAG 100 g⁻¹ b.s).

4.2.5 Determinação do Teor de Flavonoides Totais

O teor de flavonoides totais foi determinado conforme descrito por Boateng et al. (2008). Assim 0,5 mL dos extratos foram adicionados de 2 mL de água deionizada. A mistura reagiu com 150 µL de nitrito de sódio 50 g L⁻¹ (NaNO₂), por 5 minutos. Logo após foram adicionados 150 µL de cloreto de alumínio 100 g L⁻¹ (AlCl₃) que forma um complexo com os flavonoides presentes no extrato. A amostra foi incubada por mais 5 minutos, então, é adicionado 1 mL de hidróxido de sódio 1M (NaOH) e, mais 1,5 mL de água deionizada. A leitura da absorbância foi realizada a 415 nm. O teor de flavonoides totais foi calculado com base na curva padrão de quercetina (0,1 a 0,5 mg mL⁻¹) e expresso em mg de equivalente de quercetina por 100 g (mg EQ 100 g⁻¹ b.s.).

4.2.6 Determinação da Atividade Antioxidante

4.2.6.1 Atividade antioxidante avaliada pelo sequestro do radical livre DPPH*

A capacidade antioxidante foi medida pelo sequestro do radical livre DPPH* conforme (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995). A capacidade do extrato em doar íons hidrogênio ao radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH*) é relativamente estável. Em um tubo de ensaio foram misturados 1 mL de tampão 100 mM em pH 5,5; 1 mL de etanol absoluto, 0,5 de solução etanólica de DPPH* 250 µM e 50 µL da amostra. Os tubos de ensaio contendo as misturas foram mantidos a temperatura ambiente por 30 minutos no escuro e, posteriormente, a absorbância das soluções foram lidas a 517 nm. Um controle positivo foi preparado contendo todas as soluções, exceto a amostra. A quantificação da atividade antioxidante dos extratos foi realizada por meio de uma curva padrão de Trolox (0,10 a 1,0 mM). Os resultados foram expressos em µmoles equivalentes de Trolox por grama de amostra em base seca (µmoles eq. de Trolox g⁻¹ de amostra b.s).

4.2.6.2 Atividade antioxidante avaliada pelo poder de redução do ferro FRAP

O poder de redução dos extratos foi realizado de acordo com Benzie e Strain (1996), com algumas modificações. O reagente FRAP é uma combinação de 2,5 mL de uma solução TPTZ 10 mM em HCl 40 mM, 2,5 mL de cloreto férrico 20 mM e 25 mL de tampão de acetato 0,3 mM pH 3,6, sendo utilizado imediatamente após o seu preparo. Para a avaliação da capacidade antioxidante, uma alíquota de 90 μ L de cada diluição foi transferida para tubos de ensaio acrescentados 270 μ L de água destilada e 2,7 mL do reagente FRAP preparado previamente. Após a homogeneização em agitador de tubos, as amostras foram incubadas a 37 °C por 30 minutos e a leitura da absorbância realizada em 595 nm. Soluções com diferentes concentrações de Trolox (0,1 a 0,75 mM) foram utilizadas para construir a curva de calibração. Os resultados foram expressos em μ moles equivalentes de Trolox por grama de amostra em base seca (μ moles eq. de Trolox g^{-1} de amostra b.s.).

4.2.6.3 Atividade antioxidante avaliada pelo sequestro do radical livre ABTS^{•+}

A capacidade antioxidante dos extratos frente ao radical livre ABTS^{•+} foi avaliada de acordo com Thaipong et al. (2006), com algumas modificações. O cátion ABTS^{•+} foi preparado a partir da reação de 5 mL da solução estoque de ABTS 7 mM com 88 μ L da solução de persulfato de potássio 140 mM. A mistura foi armazenada em frasco a 25 °C por 12-16 horas antes do uso. No momento da análise, a mistura foi diluída com álcool etílico até uma absorbância de $0,70 \pm 0,5$ nm a 734 nm. Em ambiente escuro, foi transferido uma alíquota de 30 μ L de cada diluição do extrato ou do Trolox para 3 mL da solução ABTS^{•+}. Após homogeneização; foi realizada a leitura em 734 nm após 6 minutos de reação, utilizando álcool etílico como branco. Soluções de etanol com concentrações conhecidas de Trolox (0,1 a 2 mM) foram usadas para calibração. Os resultados foram expressos em μ moles equivalentes de Trolox por grama de amostra em base seca (μ moles eq. de Trolox g^{-1} de amostra b.s.).

4.2.7 Determinação de Ácido Fítico

O P fítico foi extraído de acordo com Thompson e Erdman Jr. (1982). Dessa forma, 2 g da amostra foram misturados com 100 mL de uma solução TCA 3 % + Na₂SO₄ 10 % sob agitação mecânica por 2 horas a 100 rpm (Shaker, Marconi). Em seguida, filtrou-se em papel filtro qualitativo, sendo o extrato coletado e o material retido desprezado.

Em seguida, foram adicionados em tubos de centrífuga 10 mL do extrato + 10 mL de água deionizada + 12 mL de FeCl₃. Os mesmos foram colocados em banho-Maria a 100 °C por 75 minutos. Decorrido esse período, os tubos foram resfriados a 25 °C e centrifugados por 15 minutos a 5800 rpm (Harrier, 15/80 MSE). O sobrenadante foi descartado (P inorgânico) e ao precipitado, adicionou-se 5 mL HCl 0,6 % + Na₂SO₄ 2,5 % e centrifugou-se por 15 minutos, sendo este procedimento repetido mais 3 vezes, totalizando 4 lavagens.

Após descartar o último sobrenadante, o precipitado foi lavado com 7 mL de solução digestora (HNO₃/HClO₄ 4:1 v/v), e transferido para tubos de ensaio de alta resistência.

Estes tubos foram colocados no bloco digestor (Tecnal, TE 007D) a 50 °C, sendo a temperatura elevada gradativamente até 200 °C. Após a digestão e diluição adequada das amostras, o fósforo fítico foi determinado colorimetricamente, segundo Chen, Toribara e Warner (1956), e foi utilizado um fator 3,55, referente aos 28,2 % de fósforo presente na molécula de ácido fítico, para converter o P fítico em AF.

O procedimento consistiu na construção de uma curva padrão a partir de uma solução estoque (0,05 g de K₂HPO₄ em 200 mL H₂O) e solução trabalho (2 mL da solução estoque em 10 mL de H₂O), obtendo concentrações entre 0,9 e 9,0 µg de fósforo. Para a quantificação foi empregado o reagente de cor, constituído por uma solução de água deionizada, molibdato de amônio 2,5 %, ácido ascórbico 10 % e ácido sulfúrico 6 N (2:1:1:1 v/v). A leitura foi realizada em espectrofotômetro UV-VIS (Libra, S22) a 820 nm.

4.2.8 Antocianinas Totais e Monoméricas

O teor de antocianinas totais (AT) e monoméricas (AM) foi determinado segundo metodologia descrita por Giusti e Wrolstad (2001). Para antocianinas totais, 1 g de amostra foi extraído com 50 mL de solução de cloreto de potássio (KCl) 0,025 M, pH 1, sendo agitado e deixado em repouso por 25 minutos em ambiente escuro. Em seguida, as amostras foram filtradas e realizou-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro UV-VIS a 510 e 700 nm (Libra, S22). A quantificação foi feita através da equação descrita abaixo, e o resultado das AT expresso em mg eq. de antocianina predominante (cianidina-3-O-glicosídeo) em 100 g de amostra em base seca ou mg CyE 100 g⁻¹ b.s.

$$AT = (A \times PM \times FD \times 10^3 / \epsilon \times b) \times 100$$

AT = Antocianinas Totais

A = Absorbância a 510 e 700 nm [(A₅₁₀ - A₇₀₀)_{pH1}]

PM = massa molecular Cianidina-3-O-glicosídeo (449,2 g mol⁻¹)

FD = Fator de diluição (0,05)

ε = Coeficiente de extinção Molar (26.900 mol L cm⁻¹)

b = caminho óptico (1 cm)

Para AM, 1 g da amostra foi extraído com 50 mL de solução de acetato de sódio 0,4 M, pH 4,5 sendo agitado e deixado em repouso por 25 minutos em ambiente escuro. Em seguida filtraram-se as amostras e realizou-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro UV-VIS a 510 e 700 nm (Libra, S22). A quantificação foi feita através da equação descrita abaixo, e o resultado das AM expresso em mg eq. de cianidina-3-O-glicosídeo, antocianina majoritária, presentes em 100 g de amostra em base seca ou mg CyE 100 g⁻¹ b.s.

$$AM = (A \times PM \times FD \times 10^3 / \epsilon \times b) \times 100$$

AM = Antocianinas Monoméricas

A = Absorbância a 510 e 700 nm [(A₅₁₀ - A₇₀₀)_{pH1} - (A₅₁₀ - A₇₀₀)_{pH4,5}]

PM = massa molecular Cianidina-3-O-glicosídeo (449,2 g mol⁻¹)

FD = Fator de diluição (0,05)

ϵ = Coeficiente de extinção Molar (26.900 mol L cm⁻¹)

b = caminho óptico (1 cm)

4.2.9 Quantificação de Isoflavonas por CLUE (cromatografia líquida de ultra eficiência)

Os grãos de soja preta e amarela, crus e cozidos, foram liofilizados, moídos, desengordurados com hexano (1:10, m/v) por 30 minutos a 25 °C com agitação rotativa contínua e filtradas à vácuo. A extração de isoflavonas foi realizada com uma mistura de solventes orgânicos contendo água ultra pura, acetona e etanol (1:1:1, v/v/v), conforme descrito por Yoshiara et al. (2012). A extração foi realizada em triplicata utilizando 0,3 g de amostra com 6 mL de solvente extrator e agitação em vortex a cada 15 minutos por 1 hora a 25 °C, centrifugadas (2500 x g a 4 °C e 15 minutos) (Centrifuge 5804R – Eppendorf, Hamburg, GE) e filtradas (Millex filter – LH, 0,22 µm). Alíquotas de 1,4 µL em triplicata do filtrado foram injetadas automaticamente no cromatógrafo líquido UPLC® Waters. A coluna foi de fase reversa (modelo ACQUITY – UPLC BEH C18, Waters) com dimensão de 2,1 mm x 50 mm e tamanho de partícula de 1,7 µm. A eluição foi realizada com gradiente não linear, utilizando fase móvel A água acidificada em pH 3,0 ajustado com ácido acético glacial e B acetonitrila com fluxo de 0,7 mL minuto⁻¹ a 35 °C. O gradiente foi iniciado com 90 % de eluente A e 10 % de eluente B e em 8 minutos de eluição, o gradiente atingiu proporção de 0 % de A e 100 % de B e as condições iniciais retornaram em 9 minutos. O tempo total de corrida foi de 10 minutos. O detector foi arranjo de diodos (Waters) com comprimento de onda ajustado para 260 nm. As soluções padrão para a construção das curvas de calibração (área do pico x teor de isoflavonas) foram daidzina, genistina, glicitina, malonil daidzina, malonil genistina, malonil glicitina, acetil daidzina, acetil genistina, acetil glicitina, gliciteína e genisteína (0,1; 0,025; 0,006 e 0,002 mg mL⁻¹) e daidzeína (0,1; 0,025; 0,006; 0,002 e 0,001 mg mL⁻¹). Os padrões em triplicata foram injetados originando os cromatogramas correspondentes e cada forma química de isoflavonas com respectivos tempos de retenção correspondentes. Os picos de cada forma de isoflavonas foram identificados por comparação dos tempos de retenção e espectros na região do UV dos respectivos padrões de referência. O aplicativo acoplado no cromatógrafo gerou

as curvas de calibração e as concentrações de isoflavonas foram calculadas e expressas em μg de isoflavonas por g de amostra liofilizada e desengordurada. O total de isoflavomas foi expresso como a soma dos componentes depois da normalização das diferenças de pesos moleculares das formas glicosiladas.

4.2.10 Determinação de Proteínas

O teor de proteínas nos grãos crus e cozidos foi determinado conforme metodologia da Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1998) através da técnica de Kjeldahl para análise de nitrogênio total (utilizando o fator de correção de 6,25). Os resultados foram expressos em $\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ em base seca.

4.2.11 Determinação de Lipídeos

O teor de lipídeos nos grãos crus e cozidos foi determinado pelo método de extração a quente - Soxhlet, empregando éter de petróleo como solvente, conforme descrição da AOAC (1998). Os resultados foram expressos em $\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ em base seca.

4.2.12 Determinação de Umidade

A umidade dos grãos crus e cozidos foi determinada por secagem em estufa a 105°C até o peso constante de acordo com o método da AOAC (1998). Os resultados foram expressos em $\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$.

4.2.13 Determinação de Cinzas

O teor de cinzas dos grãos crus e cozidos foi determinado conforme descrição da AOAC (1998), utilizando a incineração seguida de calcinação da amostra em mufla a 550°C . Os resultados foram expressos em $\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ em base seca.

4.2.14 Determinação de Carboidratos

A fração de carboidratos foi obtida pelo cálculo da diferença percentual entre os valores obtidos na determinação de cinzas, lipídeos e proteínas. Os resultados expressos foram em $\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ em base seca.

4.2.15 Determinação de Minerais

Foram analisados os teores de Mg, Fe, P e K nos grãos de soja preta e amarela crus e cozidos. As concentrações de Fe foram analisadas para verificar sua relação com a atividade antioxidante. A determinação de P é importante, pois representa a soma do teor de P orgânico e inorgânico, sendo que o P fítico está contido na fração orgânica. As análises de Fe e Mg foram necessárias devido a habilidade quelante que o AF apresenta sobre esses minerais. Já a determinação de K foi necessária, pois é um mineral é predominante na soja.

Para a análise destes minerais, as amostras foram digeridas em solução nitroperclórica ($\text{HNO}_3/\text{HClO}_4$, 4:1 v/v). Após a diluição adequada, a leitura de Fe e Mg foi realizada por espectrofotometria de absorção atômica – EAA. A leitura de K foi realizada por fotômetro de chama, e a leitura do P foi realizada por espectrofotometria com azul-de-molibdênio a 660 nm (espectrofotômetro UV-VIS). As análises foram feitas no Laboratório de Solos da Universidade Estadual de Londrina (UEL, Londrina – PR). OS resultados foram expressos em $\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ b.s. para K, Mg e em $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ b.s. para Fe.

4.2.16 Massa de 100 Grãos

Como há variedade no tamanho dos grãos em diferentes cultivares foi determinada massa de 100 grãos, contados manualmente. Os resultados foram expressos em $\text{g } 100 \text{ grãos}^{-1}$ de amostra crua.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados com o auxílio do programa Statistica 7.0, aplicando-se análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey (significância de 5 %), para a comparação das médias dos resultados das amostras. As análises foram realizadas em triplicatas genuínas. Os resultados encontrados na soja preta foram comparados com os resultados uma variedade de soja amarela destinada ao consumo humano.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 MICROCONSTITUINTES ANTIOXIDANTES

Em relação aos compostos fenólicos totais, a soja preta apresentou quantidades superiores à soja amarela, antes e após os processos de cozimento (Tabela 1).

Os grãos de soja preta e amarela, crus e cozidos, apresentaram concentrações de compostos fenólicos totais equivalentes a 296,0; 142,2; 271,6 e 139,5 mg EAG 100 g⁻¹, respectivamente. A cocção reduziu o teor de compostos fenólicos totais em 52 % para a soja preta e em 49 % para a soja amarela, no entanto, a soja preta cozida apresentou quantidade maior de compostos fenólicos totais que a soja amarela.

Tabela 1 – Teores de compostos fenólicos, flavonoides totais, antocianinas totais e monoméricas nos grãos de soja preta e amarela, crus e cozidos.

Amostras*	Fenólicos Totais	Flavonoides Totais	Antocianinas Totais	Antocianinas Monoméricas
SP1	296,0 ± 6,5 ^a	185,7 ± 3,9 ^a	67,0 ± 3,3 ^a	57,4 ± 4,1 ^a
SP2	142,2 ± 8,1 ^c	82,5 ± 1,6 ^c	11,1 ± 1,0 ^b	7,9 ± 0,4 ^b
SA1	271,6 ± 1,5 ^b	168,2 ± 2,8 ^b	ND**	ND**
SA2	139,5 ± 2,4 ^c	66,8 ± 1,0 ^d	ND**	ND**

Valores médios ± DP de triplicatas.

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (Tukey, $p \leq 0,05$).

* SP1: soja preta crua; SP2: soja preta cozida; SA1: soja amarela crua; SA2: soja amarela cozida.

** ND: não detectado.

Whent et al. (2011) realizaram um estudo comparativo dos compostos fenólicos totais em soja preta e amarela crua, e os resultados foram superiores aos deste trabalho, com teores médios de 490 e 350 mg EAG 100 g⁻¹, respectivamente. Pesquisas realizadas com soja preta e amarela verificaram uma grande variação no teor de compostos fenólicos totais de 81 a 1210 mg EAG 100 g⁻¹ em soja preta e de 80 a 220 mg EAG 100 g⁻¹ em soja amarela (SLAVIN; KENWORTHY; YU, 2009; KUMAR et al, 2010; MALENCIC; CVEJIC; MILADINOVIC, 2012).

Jeng et al. (2010) ao analisarem três cultivares de soja preta crua em relataram conteúdos de compostos fenólicos totais entre 438 a 749 mg EAG 100 g⁻¹,

enquanto Zhang et al (2011) analisaram 60 variedades de soja preta na China e encontraram teores de 51 a 606 mg EAG 100 g⁻¹. Um estudo com 11 cultivares de soja amarela crua provenientes da Índia e Bulgária indicaram teores de compostos fenólicos totais entre 151 a 506 mg EAG 100 g⁻¹ (SAKTHIVELU et al, 2008). Bolanho e Beléia (2011) ao analisarem o teor de compostos fenólicos totais dos grãos da cultivar BRS-267 obtiveram 187,8 mg EAG 100 g⁻¹ em base seca.

Xu e Chang (2007a) em estudos comparativos entre soja preta e amarela crua relataram teores de compostos fenólicos totais de 223 e 618 mg EAG 100 g⁻¹, respectivamente. Em outro estudo obtiveram teores de 557 mg EAG 100 g⁻¹ em soja preta e de 171 mg EAG 100 g⁻¹ em soja amarela (XU; CHANG, 2007b). Os autores justificam a discrepância desses resultados devido a safras distintas, condições e tempo de armazenamento dos grãos.

Ao analisarem o efeito do cozimento sobre os compostos fenólicos totais da soja preta e amarela, Xu e Chang (2008b) encontraram após 120 minutos de cozimentos a pressão ambiente teores de 262 mg EAG 100 g⁻¹ na soja preta e 156 mg EAG 100 g⁻¹ na soja amarela. Observou-se que a redução de compostos fenólicos totais devido à cocção foi de 35 % maior na soja preta do que na soja amarela, totalizando uma perda de 62 %, redução maior que a da soja preta neste trabalho, que foi de 52 %.

Com relação aos flavonoides totais, a soja preta apresentou quantidades superiores à soja amarela, antes e após os processos de cocção. Os grãos de soja preta e amarela, crus e cozidos, apresentaram concentrações de flavonoides totais equivalentes a 185,7; 82,5; 168,2 e 66,8 mg EQ 100 g⁻¹, respectivamente (Tabela 1).

Lin e Lai (2006) em um estudo com quatro variedades de soja preta e três de soja amarela obtiveram teores de até 200 mg EC 100 g⁻¹ em soja preta e menores que 60 mg EC 100 g⁻¹ em soja amarela. Xu e Chang (2007a) observaram teores de flavonoides de 257 mg EC 100 g⁻¹ e 41 mg EC 100 g⁻¹ em soja preta e amarela, respectivamente, em outro estudo observaram teores de 404 mg EC 100 g⁻¹ em soja preta e 114 mg EC 100 g⁻¹ em soja amarela (XU; CHANG, 2007b). Um ano depois publicaram outros resultados de flavonoides em soja, após avaliarem 26 cultivares de soja amarela e duas safras da mesma variedade de soja preta com uma variação de 18 a 58 mg EC 100 g⁻¹ em soja amarela e 534 e 595 mg EC 100 g⁻¹ em soja preta (XU; CHANG, 2008d). Saha et al. (2008) fez um estudo com 20 variedades de soja

preta da Índia e reportaram teores de flavonoides totais variando de 60,4 a 143,4 $\mu\text{g EC g}^{-1}$ de amostra.

A variação de compostos fenólicos e flavonoides nos grãos de soja pode ser atribuída a fatores como genótipo, condições ambientais, grau de maturidade e local de plantio (CARRÃO-PANIZZI et al., 1999; WANG; MURPHY, 1994), podendo ser essa a causa da diferença dos compostos fenólicos e flavonoides encontrados na soja preta e amarela, quando comparamos os resultados obtidos para estas cultivares com as estudadas por outros autores.

A soja preta apresentou teor de antocianinas totais de 67,0 mg CyE 100 g^{-1} b.s. e sofreu uma redução de 83 %, após o processo de cozimento, restando apenas 11,1 mg CyE 100 g^{-1} b.s. . O mesmo pode ser observado em relação às antocianinas monoméricas que passou de 57,4 mg CyE 100 g^{-1} b.s. para 7,9 mg CyE 100 g^{-1} b.s. após o processo de cocção, uma redução de 86 % (Tabela 1). Na soja amarela não foram detectadas antocianinas, assim como demonstrado por outros autores (KIM et al., 2006; XU; CHANG, 2008b; MALENCIC; CVEJIC; MILADINOVIC, 2012).

Malencic, Cvejic e Miladinovic (2012) em seus estudos obtiveram um teor médio de 61 mg CyE 100 g^{-1} de AT em soja preta. Xu e Chang (2008b) encontraram 0,43 mg CyE 100 g^{-1} de AT em soja preta. Ao avaliarem 127 genótipos de soja preta crua, cultivada na China, Jin-Rui et al. (2007) relataram uma faixa de variação de 22 a 187 mg CyE 100 g^{-1} de AT.

Sabendo-se que as antocianinas da soja preta estão majoritariamente presentes na casca, e que o cotilédone contém teores insignificantes, alguns pesquisadores optaram em medir a concentração desses compostos apenas na casca do grão (KIM et al., 2006, XU; CHANG, 2008a). Jeng et al. (2010) encontraram 723, 1881 e 2025 mg 100 g^{-1} de AT na casca de três cultivares de soja preta. Outro estudo com 60 variedades de soja preta da China apresentou uma variação de 98 a 2132 mg 100 g^{-1} , com uma média de 770 mg 100 g^{-1} (ZHANG et al., 2011).

Xu e Chang (2008a) relataram que a casca representa 10,3 % da massa do grão de soja preta. Yao et al. (2010) também apresentaram uma porcentagem semelhante de 11,3 %, após encontrarem 655 mg 100 g^{-1} de antocianinas na casca de soja preta e 74 mg 100 g^{-1} no grão inteiro. Verificamos que, se os teores de antocianinas encontrados para a casca de soja preta descritos anteriormente,

fossem extrapolados para o grão inteiro, estariam de acordo com os resultados obtidos neste trabalho.

Quanto ao processo de cozimento, Xu e Chang (2008b) observaram uma redução de 93% do teor de antocianinas da soja preta crua, após 120 minutos de cocção a pressão ambiente. Nesse estudo, o teor de antocianinas diminuiu de 43 para 3 mg CyE 100 g⁻¹. Portanto, foram mais sensíveis ao cozimento do que os outros flavonoides e os compostos fenólicos totais.

5.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

As cultivares de soja preta e amarela, cruas e cozidas, apresentaram diferenças em relação à atividade antioxidante avaliada pelos métodos de sequestro de radicais livres DPPH^{*}, ABTS^{**} e pelo poder de redução do ferro FRAP (Tabela 2).

Tabela 2 – Atividade Antioxidante avaliada pelos métodos de DPPH^{*}, ABTS^{**}, FRAP nos grãos de soja preta e amarela, crus e cozidos.

Amostras*	DPPH [*]	ABTS ^{**}	FRAP
SP1	6,84 ± 0,05 ^a	10,05 ± 0,04 ^a	9,16 ± 0,09 ^a
SP2	3,36 ± 0,03 ^c	5,15 ± 0,05 ^c	5,28 ± 0,28 ^c
SA1	4,75 ± 0,17 ^b	8,81 ± 0,23 ^b	6,71 ± 0,11 ^b
SA2	2,33 ± 0,08 ^d	4,37 ± 0,20 ^d	3,80 ± 0,13 ^d

Valores médios ± DP de triplicatas com 3 repetições.

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (Tukey, p ≤ 0,05).

* SP1: soja preta crua; SP2: soja preta cozida; SA1: soja amarela crua; SA2: soja amarela cozida.

Os extratos de compostos fenólicos da soja preta crua e cozida apresentaram pelo método de DPPH^{*} maiores teores de AA 6,84 e 3,36 μmoles eq. de Trolox g⁻¹ de amostra b.s., respectivamente, quando comparados a cultivar de soja amarela crua e cozida 4,75 e 2,33 μmoles eq. de Trolox g⁻¹ de amostra em b.s., respectivamente (Tabela 2). Jeng et al. (2010) ao avaliarem três variedades de soja preta pelo mesmo método obtiveram valores de AA na faixa de 7,05 a 15,98 mg eq. de Trolox g⁻¹ b.s. Ao avaliarem a atividade antioxidante de farinha de soja integral preta e amarela, Whent et al. (2011) encontraram de 6,93 a 14,61 μmoles eq. de Trolox g⁻¹ e de 0,48 a 2,38 μmoles eq. de Trolox g⁻¹, respectivamente. Estudos comparativos de atividade antioxidante de soja preta e amarela, realizados por Xu e Chang (2007a,

2007b, 2008d) encontraram pelo método de DPPH[•] de 16,39 a 18,44 $\mu\text{moles eq. de Trolox g}^{-1}$ em soja preta e de 0 a 1,96 $\mu\text{moles eq. de Trolox g}^{-1}$ em soja amarela. As diferenças encontradas estão relacionadas aos maiores teores de compostos fenólicos e flavonoides na variedade de soja preta.

Barbosa et al. (2006) em um estudo da capacidade antioxidante de derivados de soja, obtiveram pelo método de DPPH[•] atividade antioxidante igual a 3,7 $\mu\text{moles eq. de Trolox g}^{-1}$ de amostra b.s., para os grãos de soja amarela. Bolanho e Beléia (2011) ao estudarem os compostos bioativos e o potencial antioxidante de produtos de soja obtiveram para a cultivar de soja amarela BRS 267, pelo método de DPPH[•], atividade antioxidante igual a 4,0 $\mu\text{moles eq. de Trolox g}^{-1}$ de amostra b.s.

Observou-se pelo método de DPPH[•], que o processo de cozimento reduziu em 51 % atividade antioxidante da soja preta e, em 51 % atividade antioxidante da soja amarela. Xu e Chang (2008b) relataram uma redução de 53 % a 58 % da atividade antioxidante, pelo método de DPPH[•], após o cozimento da soja preta por 120 minutos a pressão ambiente.

A cultivar de soja preta, crua e cozida, apresentou pelo método do sequestro de radicais livres ABTS^{•+} maiores teores de atividade antioxidante 10,05 e 5,15 $\mu\text{moles eq. de Trolox g}^{-1}$ de amostra b.s., respectivamente, quando comparados a cultivar de soja amarela, crua e cozida, 8,81 e 4,37 $\mu\text{moles eq. de Trolox g}^{-1}$ de amostra em b.s., respectivamente (Tabela 2). Bolanho e Beléia (2011) para a cultivar BRS 267, avaliada pelo método do sequestro de radicais livres ABTS^{•+}, encontraram teor igual a 7,1 $\mu\text{moles eq. de Trolox g}^{-1}$ de amostra em base seca.

As cultivares de soja preta e amarela, cruas e cozidas, apresentaram diferenças em relação à atividade antioxidante avaliada pelo poder de redução do ferro FRAP, obtendo-se os seguintes teores: 9,16 para a soja preta crua e 5,28 $\mu\text{moles eq. de Trolox g}^{-1}$ de amostra b.s para a soja preta cozida, 6,71 para a soja amarela crua e 3,80 $\mu\text{moles eq. de Trolox g}^{-1}$ de amostra b.s para a soja amarela cozida (Tabela 2). Jeng et al. (2010) ao analisarem atividade antioxidante de três variedades de soja preta provenientes de Taiwan, pelo poder de redução do ferro FRAP, obtiveram valores entre 96,6 a 181,3 $\text{mg eq. de Trolox g}^{-1}$. Xu e Chang (2008d) ao analisarem atividade antioxidante, pelo poder de redução do ferro FRAP, de 30 cultivares de soja provenientes da região norte de Dakota – Minnesota, obtiveram de 0,83 a 1,34 $\text{mmol eq. F}^{+2} 100 \text{ g}^{-1}$ de amostra b.s. para a soja amarela e de 13,05 a 14,01 $\mu\text{moles eq. de Trolox g}^{-1}$ de amostra b.s para a soja preta. Os

mesmos autores Xu e Chang (2007b) em outro trabalho reportaram valores de atividade antioxidante para a soja preta e amarela, pelo método de redução do ferro FRAP, iguais a 9,43 e 1,24 mmol eq. F^{+2} 100 g^{-1} de amostra b.s., respectivamente.

Xu e Chang (2007a) realizaram um estudo comparativo sobre o perfil de fenólicos e atividade antioxidante afetados por solventes de extração, obtiveram atividade antioxidante avaliada pelo poder de redução do ferro FRAP, para a soja preta de 9,93 a 1,27 mmol eq. F^{+2} 100 g^{-1} de amostra b.s. e de 0,13 a 0,34 mmol eq. F^{+2} 100 g^{-1} de amostra b.s. para a soja amarela. Porém, como os autores utilizaram como padrão para a curva de calibração sulfato ferroso, portanto resultados diferentes eram esperados. Bolanho e Beléia (2011) reportaram atividade antioxidante para a cultivar BRS 267, avaliada pelo poder de redução do ferro FRAP, igual a 8,4 $\mu\text{moles eq. de Trolox g}^{-1}$ de amostra b.s.

Pelo poder de redução do ferro FRAP o processo de cocção reduziu em 42 % atividade antioxidante da soja preta, e em 43 % atividade antioxidante da soja amarela. Boateng et al. (2007) ao realizarem o método de FRAP para vários grãos, incluindo a soja, demonstraram que os compostos fenólicos totais diminuem após a maceração, mas aumentam depois da torra. A maceração leva ao amaciamento da parede celular dos tecidos que é usualmente acompanhada pela solubilização dos flavonoides ligados a esta estrutura, conseqüentemente é provável que estes compostos possam ser lixiviados pela água durante o processamento. Entretanto, durante o aquecimento ocorre a ruptura celular ou a quebra dos compostos insolúveis, facilitando a extração dos mesmos.

Sabe-se que a atividade antioxidante de um alimento depende da natureza e concentração dos antioxidantes naturais presentes, e que certos compostos podem agir em sinergismo (ALONSO et al.,1999). As atividades antioxidantes determinadas em amostras desengorduradas podem ser maiores que, a do grão cozido pronto para o consumo e, todos os métodos concordam com a redução de atividade antioxidante depois do cozimento.

5.3 DETERMINAÇÃO DE P TOTAL, P FÍTICO E AF

As cultivares de soja preta e amarela cruas apresentaram diferenças no teor de fósforo total, mas não diferiram nos teores de fósforo fítico e ácido fítico (Tabela 3). Nos grãos de soja preta, crus e cozidos, as concentrações de P total, P fítico e

AF corresponderam a 0,54, 0,36, 1,27 g 100 g⁻¹ b.s. e a 0,52, 0,29, 1,03 g 100 g⁻¹ b.s., respectivamente. E nos grãos de soja amarela, crus e cozidos, os teores de P total, P fítico e AF corresponderam a 0,76, 0,39, 1,38 g 100 g⁻¹ b.s. e 0,62, 0,25, 0,88 g 100 g⁻¹ b.s., respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3 - P total, P fítico, AF nos grãos de soja preta e amarela, crus e cozidos.

Amostra*	P total	P fítico	AF
SP1	0,54 ± 0,01 ^b	0,36 ± 0,01 ^a	1,27
SP2	0,52 ± 0,08 ^b	0,29 ± 0,03 ^b	1,03
SA1	0,76 ± 0,01 ^a	0,39 ± 0,04 ^a	1,38
SA2	0,62 ± 0,02 ^b	0,25 ± 0,00 ^b	0,88

Valores médios ± DP de triplicatas com 3 repetições.

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (Tukey, $p \leq 0,05$).

* SP1: soja preta crua; SP2: soja preta cozida; SA1: soja amarela crua; SA2: soja amarela cozida.

Karkle e Beléia (2010) estudaram o efeito de maceração e cocção sobre concentração de fitato, minerais e textura em sojas para consumo humano, e ao analisarem a cultivar de soja amarela BRS 216, crua e cozida, obtiveram os seguintes teores de P total, P fítico e AF correspondentes a 0,44, 0,26, 0,90 g 100 g⁻¹ e a 0,35, 0,18, 0,64 g 100 g⁻¹, respectivamente. Os teores são semelhantes aos relatados neste trabalho, considerando que as autoras fizeram um balanço de massa para expressar os teores, antes e após o processo de cocção dos grãos. Kamizake (2012) em seu estudo constatou que o teores de AF e P total para a cultivar BRS 267 correspondeu a 1,72 e 0,65 g 100g⁻¹, respectivamente, e para a cultivar Coodetec 214 correspondeu a 1,01 e 0,44 g 100 g⁻¹, respectivamente. Bolanho e Beléia (2011) reportaram teores de P total, P fítico e AF para a cultivar de soja amarela BRS 267 iguais a 0,79, 0,55 e 1,94 g 100 g⁻¹ b.s., respectivamente.

Saha et al. (2008) ao estudarem atributos físico-químicos e nutricionais de 20 variedades de soja preta crua relataram teores de ácido fítico variando entre 0,26 a 0,69 g 100 g⁻¹, e teores de fósforo entre 0,13 a 0,21 g 100 g⁻¹ de amostra, valores inferiores aos relatados neste trabalho. Yamada et al. (2003) ao analisarem quatro cultivares diferentes de soja amarela encontraram valores de fósforo entre 0,42 a 0,58 g 100 g⁻¹ de amostra.

Em relação ao processo de cocção dos grãos das cultivares de soja preta e amarela, houve uma redução significativa no teor de AF, sendo mais expressiva na

cultivar amarela, com uma redução de 36 %, e uma redução de 19 % na cultivar de soja preta.

O ácido fítico é termoestável, não sendo destruído por cocção a 100 °C (LIU, 1997). Sathe e Venkatachalam (2002) afirmaram que pode haver redução de AF se houver ação da enzima fitase nas etapas iniciais de cocção. Nas cultivares de soja preta e amarela analisadas, isso foi observado já que os grãos foram colocados na água fria e levados a cocção, e não colocados diretamente em água fervente, onde a inativação da enzima seria mais rápida.

A cocção resultou em diminuição tanto do fósforo total como do ácido fítico. A soja preta reteve 96 % de fósforo total e a amarela 81 %. A redução de fósforo fítico foi maior, sendo que a soja preta reteve 80 % e a amarela 64 %. A redução das cinzas nas amostras cozidas confirma a redução de fósforo e ácido fítico.

5.4 TEORES DE ISOFLAVONAS

Cinco das doze formas químicas de isoflavonas foram detectadas e quantificadas nos grãos de soja preta e amarela, crus e cozidos (Tabela 4).

Em relação ao conteúdo, em base seca de isoflavonas β -glicosídicas, daidzina apresentou o maior valor nos grãos de soja amarela crus 226,7 $\mu\text{g g}^{-1}$ de amostra desengordurada, e a forma química genistina não apresentou diferença significativa entre os grãos de soja preta e amarela crus 410,5 e 382,2 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente. Após o processo de cocção dos grãos, ambas as cultivares sofreram redução nos teores de β -glicosídica, sendo mais expressiva na forma química daidzina, com uma redução de 65 % nas duas cultivares.

Xu e Chang (2008b) observaram um acréscimo no teor de isoflavonas β -glicosídeos, após a cocção sob pressão por 15 minutos dos grãos de soja preta e amarela, de 297 % daidzina e 185 % genistina, 265 % daidzina e 292 % genistina, respectivamente. Lin e Lai (2006) ao analisarem quatro cultivares de soja preta cruas e três cultivares de soja amarela cruas observaram teores de β -glicosídeos de 70,1 a 196,6 daidzina e 274,5 a 412,0 $\mu\text{g g}^{-1}$ genistina, 144,8 a 656,8 daidzina e 107,1 a 921,7 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente.

Tabela 4 – Teores de isoflavonas nos grãos de soja preta e amarela, crus e cozidos.

Amostras*	AGLICONAS	MALONILGLICOSÍDEOS		β-GLICOSÍDEOS		TOTAL
	GEN	MDAI	MGEN	DAI	GEN	
SP1	33,9±0,03 ^c	428,9±0,03 ^b	1466,7±0,03 ^a	77,3±0,02 ^b	410,5±0,03 ^a	1316
SP2	264,4±0,87 ^a	157,9±0,86 ^d	627,4±0,28 ^c	27,7±0,12 ^c	285,2±0,08 ^b	863
SA1	87,6±0,01 ^b	590,6±0,08 ^a	955,7±0,17 ^b	226,7±0,02 ^a	382,2±0,05 ^a	1261
SA2	261,4±0,90 ^a	171,2±0,25 ^c	374,7±0,86 ^d	78,5±0,17 ^b	211,1±0,22 ^c	721

Valores médios ± DP de triplicatas.

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (Tukey, $p \leq 0,05$).

* SP1: soja preta crua; SP2: soja preta cozida; SA1: soja amarela crua; SA2: soja amarela cozida.

Os maiores teores de malonilglicosídeos foram verificados nos grãos de soja preta crus, e os valores mais expressivos foram da fração malonil-genistina 1466,7 $\mu\text{g g}^{-1}$ de amostra desengordurada. As cultivares de soja preta e amarela sofreram uma redução drástica na concentração de malonilglicosídeos após a cocção dos grãos, sendo mais significativo na cultivar amarela com uma redução de 71 % na forma química malonil-daidzina, no entanto observou-se o aumento significativo no teor de agliconas. Xu e Chang (2008b) após o processamento térmico dos grãos de soja preta e amarela sob pressão, também observaram uma redução no teor de malonilglicosídeos, e uma acréscimo significativo nos teores de β -glicosídeos e agliconas. Segundo Carrão-Panizzi et al. (2003) o cozimento promove a redução nos teores de malonilglicosídeos devido à clivagem dos grupos ésteres malonil para as formas daidzina e genistina, por ações do calor durante o tratamento e de outros mecanismos presentes nas etapas posteriores de moagem e secagem dos grãos.

Xu e Chang (2008a) reportaram em seu estudo concentrações de isoflavonas malonilglicosídeos, para os grãos de soja preta e amarela crus nas frações daidzina e genistina iguais a 656,5 e 340,6 $\mu\text{g g}^{-1}$, 712,1 e 1980 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente. Lin e Lai (2006) observaram para as quatro cultivares de soja preta estudada concentrações de malonilglicosídeos nas formas químicas malonil-daizina de 88,7 a 839,1 $\mu\text{g g}^{-1}$, e malonil-genistina de 785,2 a 911,5 $\mu\text{g g}^{-1}$.

Quanto ao conteúdo de agliconas foram verificadas diferenças entre as duas cultivares de soja preta e amarela cruas, sendo superior na cultivar amarela 87,6 $\mu\text{g g}^{-1}$ de amostra desengordurada. Com a cocção os teores de agliconas da fração genisteína das cultivaras de soja preta e amarela aumentaram e não difeririam, podendo garantir a produção de alimentos de soja com maior valor funcional, sendo

uma excelente fonte de consumo direto de formas de isoflavonas biologicamente mais ativas para o organismo humano.

Xu e Chang (2008b) relataram um aumento nos teores de agliconas após o processo de cocção da soja sob pressão por 15 minutos, das formas químicas daidzeína e genisteína de 4,91 para 8,75 $\mu\text{g g}^{-1}$ e de 3,26 para 6,83 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente, e após 60 minutos nas mesmas condições iniciais para 15,20 e 14,22 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente.

As isoflavonas agliconas nas formas daidzeína e gliciteína não foram detectadas e quantificadas neste trabalho, assim como as acetilglicosídeos (acetil-daidzina, acetil-genistina, acetil-glicitina), pois não houve um processo de torra dos grãos. Lin e Lai (2006) em seu trabalho com quatro cultivares de soja preta obtiveram apenas traços de isoflavonas agliconas, e não detectaram acetilglicosídeos nas formas químicas acetil-daidzina e acetil-genistina. Xu e Chang (2008b) em seu estudo não detectaram antes e após a cocção dos grãos de soja preta e amarela a isoflavona acetil-genistina.

Estas diferenças podem ser explicadas, pelo fato de que os teores de isoflavonas nos grãos de soja variam em função das diferenças genéticas entre as cultivares e podem sofrer influência da temperatura do ambiente durante o desenvolvimento, por exemplo, climas mais frios favorecem o acúmulo de isoflavonas, e de tempo e temperatura de cocção dos grãos (CARRÃO-PANIZZI, 1996; LEE et al., 2003).

5.5 TEORES DE MACRO NUTRIENTES

Os valores de macro nutrientes apresentaram diferença pelo teste de Tukey para lipídeos, proteínas, cinzas e carboidratos (calculados por diferença), entre as variedades de soja preta e amarela, cruas e cozidas (Tabela 5).

No caso da soja preta usada para alimentação, proteína é a fração mais importante. Em base seca a composição e análise estatística indicou que a soja preta tem teores iguais de proteínas à soja amarela e maior quantidade de lipídeos (Tabela 5).

Tabela 5 – Teores de macro nutrientes nos grãos de soja preta e amarela, crus e cozidos.

Amostras*	Lipídeos	Proteínas	Cinzas	Carboidratos
SP1	25,40 ± 0,16 ^b	40,47 ± 0,40 ^b	4,60 ± 0,18 ^b	29,53
SP2	26,67 ± 0,36 ^a	43,39 ± 0,98 ^a	3,41 ± 0,07 ^d	26,53
SA1	18,79 ± 0,15 ^d	40,47 ± 0,43 ^b	5,03 ± 0,01 ^a	35,71
SA2	20,93 ± 0,40 ^c	44,05 ± 0,10 ^a	4,02 ± 0,08 ^c	31,00

Valores médios ± DP de triplicatas com 3 repetições.

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (Tukey, $p \leq 0,05$).

* SP1: soja preta crua; SP2: soja preta cozida; SA1: soja amarela crua; SA2: soja amarela cozida.

Lin e Lai (2006) avaliaram a composição centesimal de 7 variedades de soja preta e apresentaram valores compreendidos entre 9,36 a 18,01 de lipídeos, 38,79 a 43,89 de proteínas, 5,26 a 5,72 de cinzas, 21,77 a 30,31 de carboidratos, valores expressos em $g\ 100\ g^{-1}$ de amostra. Saha et al. (2008) ao analisarem 20 variedades de soja preta cultivadas na Índia obtiveram valores de compreendidos entre 10,80 a 19,63 de lipídeos, 32,11 a 39,77 de proteínas, 3,93 a 6,15 de cinzas, valores expresso em $g\ 100\ g^{-1}$ de amostra. Chang et al. (2011) analisaram a composição centesimal de 5 variedades de soja preta cultivadas em Taiwan e obtiveram os valores de 8,92 de umidade, 17,52 de lipídeos, 38,56 de proteínas, 5,34 de cinzas, valores expressos em $g\ 100\ g^{-1}$.

Em relação à composição centesimal da soja amarela integral, Alves et al. (2011) encontraram para a cultivar BRS 216 aproximadamente, 19,19 de lipídeos, 41,08 de proteínas, 4,45 de cinzas, 29,68 de carboidratos, valores expressos em $g\ 100\ g^{-1}$ de amostra em base seca. No trabalho de Benassi, Benassi e Prudêncio (2011) obtiverem valores de 20,68 de lipídeos, 39,54 de proteína, 5,89 de cinzas, 33,89 de carboidratos, valores expressos em $g\ 100\ g^{-1}$.

Dentre as amostras, os grãos de soja preta crua apresentaram maiores teores de lipídeos, quando comparado aos grãos de soja amarela crua, e não diferiram estatisticamente no nível de 5% de significância quanto aos teores de proteínas.

Houve um acréscimo nos teores de lipídeos e proteínas nos grãos de soja cozidos, quando comparados aos valores obtidos nos grãos de soja crus, por outro lado os teores de carboidratos e cinzas diminuíram, e isso se deve ao fato de que, os grãos cozidos foram posteriormente liofilizados, tinham menor teor de água, e, portanto concentraram maiores teores de proteínas e lipídeos. Provavelmente os

componentes solubilizados na cocção foram carboidratos (açúcares, pectinas, hemiceluloses) e minerais, enquanto proteínas e lipídeos aumentaram de concentração nos grãos.

5.6 TEORES DE MINERAIS

As cultivares de soja preta e amarela, cruas e cozidas não diferiram no teor de potássio (Tabela 6). Vieira, Cabral e De Paula (1999) observaram valores semelhantes para as cultivares de soja amarela 1,57 a 1,82 g 100 g⁻¹ b.s. Yamada et al. (2003) reportaram teores superiores para as cultivares amarelas de 1,94 a 2,07 g 100 g⁻¹ de K. Saha et al. (2008) observaram para as vinte cultivares de soja preta de 1,64 a 2,09 g 100 g⁻¹.

Tabela 6 – Teor de K, Mg, Fe nos grãos de soja preta e amarela, crus e cozidos.

Amostras*	K	Mg	Fe
SP1	1,55 ± 0,03 ^{ab}	0,23 ± 0,01 ^a	8,0 ± 0,01 ^a
SP2	1,19 ± 0,10 ^b	0,17 ± 0,01 ^b	8,4 ± 0,10 ^a
SA1	1,72 ± 0,06 ^a	0,25 ± 0,01 ^a	9,7 ± 0,02 ^a
SA2	1,53 ± 0,12 ^{ab}	0,23 ± 0,06 ^a	7,2 ± 0,59 ^a

Valores médios ± DP de triplicatas.

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (Tukey, p ≤ 0,05).

* SP1: soja preta crua; SP2: soja preta cozida; SA1: soja amarela crua; SA2: soja amarela cozida.

Os teores de magnésio nas cultivares de soja preta e amarela cruas não diferiram significativamente 0,23 e 0,25 g 100 g⁻¹, respectivamente (Tabela 6). Os valores se aproximam aos reportados por Yamada et al. (2003) de 0,24 a 0,27 g 100 g⁻¹ de Mg. Vieira, Cabral e De Paula (1999) observaram para os grãos de seis cultivares de soja amarela de 0,21 a 0,26 g 100 g⁻¹ b.s. Lazzari (2006) obteve para a cultivar BRS-216 0,22 g 100 g⁻¹ b.s de Mg. Observou-se uma diferença no teor de magnésio quando comparamos a soja preta crua e cozida, 0,17 e 0,23 g 100 g⁻¹ b.s., respectivamente.

As cultivares de soja preta e amarela, crua e cozida, não se diferenciaram em relação ao conteúdo de ferro nos grãos, 8,1, 8,4, 9,7, 7,2 mg 100 g⁻¹ em base seca, respectivamente (Tabela 6); são semelhantes aos valores de ferro reportados por Yamada et al. (2003) quando analisaram quatro cultivares de soja amarela

obtiveram de 8,45 a 11,03 mg 100 g⁻¹ e inferiores aos encontrados por Vieira; Cabral; De Paula (1999) 13,39 a 19,12 mg 100 g⁻¹ b.s. Karkle e Beléia (2010) ao analisarem o teor de ferro da cultivar BRS-216 obtiveram 5,7 mg 100 g⁻¹ de Fe. Saha et al. (2008) ao analisarem 20 cultivares de soja preta obtiveram de 6,38 a 13,89 mg 100 g⁻¹ de Fe.

5.7 MASSA DE 100 GRÃOS

As massas de cem grãos nas cultivares de soja preta e amarela cruas foram de 21,95 g e 8,47 g, respectivamente (Tabela 7). A cultivar amarela BRS 216 tem como característica os grãos pequenos, isso explica o fato da sua massa ser 2,5 vezes menor, quando comparamos a mesma quantidade de grãos com a cultivar de soja preta.

Tabela 7 – Massa de 100 grãos nas cultivares de soja preta e amarela cruas.

Amostras*	Massa de cem grãos
SP1	21,95 ± 0,17 ^a
SA1	8,47 ± 0,21 ^b

Valores médios ± DP de triplicatas.

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (Tukey, p ≤ 0,05).

* SP1: soja preta crua; SA1: soja amarela crua.

Saha et al. (2008) realizaram um estudo com 20 cultivares de soja preta da região do Himalaia na Índia e reportaram valores de massa de cem grãos variando de 6,96 a 19,50 g. Jeng et al. (2010) ao avaliarem três variedades de soja preta encontraram de 14,63 a 25,13 g. Kim et al., 2006 ao analisarem nove variedades de soja preta reportaram de 25,7 a 37,6 g.

Quanto à soja amarela, os resultados obtidos são condizentes com Benassi, Benassi e Prudêncio (2011) que reportaram para a massa de cem grãos 10,83 g e Karkle e Beléia (2010) 7,22 g, ambos os trabalhos para a cultivar BRS 216.

6 CONCLUSÕES

- Além da coloração da casca, foi observada uma diferença na massa de cem grãos entre soja preta e amarela crua. Com relação ao teor de antocianinas, na casca da soja preta foi encontrado um teor médio de 67,0 mg eq. cianidina-3-O-glicosídeo por 100 g de amostra em base seca, e foi observada uma redução de 83 % após a cocção dos grãos.
- A soja preta apresentou a mesma qualidade nutricional que a soja amarela, não sendo observadas diferenças no conteúdo de macro e micro nutrientes.
- A soja preta apresentou teores mais elevados de compostos fenólicos totais (CFT) e flavonoides totais em relação à soja amarela. Após o cozimento dos grãos de soja preta houve uma redução de 52 % e 55 % nos teores de CFT e flavonoides, respectivamente.
- As cultivares de soja preta e amarela, cruas e cozidas, apresentaram diferenças em relação à atividade antioxidante avaliada pelos métodos de ABTS^{•+}, DPPH[•], FRAP. Observaram-se maiores teores de AA na cultivar de soja preta, e uma redução nesse teor após o processamento térmico dos grãos.
- As cultivares de soja preta e amarela cruas apresentaram diferenças no teor de fósforo total, mas não diferiram nos teores de fósforo fítico e ácido fítico.
- Cinco das doze formas químicas de isoflavonas foram detectadas e quantificadas nos grãos de soja preta e amarela, crus e cozidos. A forma malonilglicosídeo apresentou a maior concentração nas duas cultivares, e após o cozimento houve um acréscimo da forma aglicona nas cultivares de soja preta e amarela.
- O consumo de soja preta ou mesmo a produção de novos alimentos a partir desses grãos poderá oferecer ao consumidor a possibilidade de diversificar a sua dieta, introduzindo um alimento com a mesma qualidade nutricional da soja amarela e, possivelmente, maiores benefícios à saúde.

REFERÊNCIAS

- ALONSO, P. D. et al. Capacidad antioxidante y potencial de sinergismo entre los principales constituyentes de los alimentos. **Revista Cubana Alimentación y Nutrición**, v. 13, n. 2, p. 104-111, 1999.
- ALVES, F. P. et al. Composição centesimal de grãos de soja de oito diferentes cultivares. **VI Jornada Acadêmica da Embrapa Soja**, Documentos, p.327-328, 2011.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 20 ed. Arlington, 1998.
- ARUOMA, O.I. Methodological characterizations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. **Mutation Research**, v.523-524, p. 9-20, 2003.
- BARBOSA, A. C. L. et al. Teores de isoflavonas e capacidade antioxidante da soja e produtos derivados. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 4, p. 921-926, 2006.
- BEHRENS, J. H., DA SILVA, M. A. A. P. Atitude do Consumidor em Relação à Soja e Produtos Derivados. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 3, p. 431-439, 2004.
- BENASSI, V. T.; BENASSI, M. T.; PRUDÊNCIO, S. H. Cultivares brasileiras de soja: características para a produção de tofu e aceitação pelo mercado consumidor. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, suplemento 1, p. 1901-1914, 2011.
- BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power". The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n.1, p. 70-76, 1996.
- BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.
- BOATENG, J. et al. Effect of processing on antioxidant contents in selected dry beans (*Phaseolus ssp. L.*). **LTW**, v. 20, p. 1-8, 2008.
- BOLANHO, B. C.; BELÉIA, A. P. Bioactive compounds and antioxidant potential of soy products. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v. 22, n. 4, p. 539-546, out./dez 2011.
- BOMSER, J. et al. In vitro anticancer activity of fruit extracts from Vaccinium species. **Planta Medica**, v. 41, p. 212–216, 1996.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft Technologie**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BROUILLARD, R.. The vivo expression of anthocyanin colour in plants. **Phytochemistry**, v. 22, n. 6, p. 311-323, 1983.

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

CARRÃO-PANIZZI, M. C. Melhoria genética da soja para a obtenção de cultivares mais adequados ao consumo humano, **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 15, n. 2, p. 330-340, 2000.

CARRÃO-PANIZZI, M. C.; BORDIGNON, 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. et al. Effect of genetics and environment on isoflavone content of soybean from 35 different regions of Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, n.10, p.1787-1795, 1999.

CARRÃO-PANIZZI, M. C.; GÓES-FAVONI, S. P. G.; KIKUCHI, A. Extraction time for isoflavone determination. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 45, n. 4, p. 515-518, 2002.

CARRATU, E.; SANZINI, E. Sostanze biologicamente attive presenti negli alimenti di origine vegetale. Ann. Ist. **Super Sanità**, 41 (1), p.7-16, 2005.

CHANG, Y. H.; SU, H. J.; SHIAU, S. Y. Rheological and textural characteristics of black soybean touhua (soft soybean curd) prepared with glucono-d-lactone. **Food Chemistry**, v. 115, p. 585–591, 2009.

CHANG, Y. H. et al. Effect of microbial transglutaminase on the rheological and textural characteristics of black soybean packed tofu coagulating with Agar. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 4, p. 1107-1112, 2011.

CHANG, K. Y. Alimentos funcionais e aplicações tecnológicas: padaria da saúde e centro de pesquisas em tecnologia de extrusão, **Anais do I Simpósio Brasileiro Sobre Os Benefícios Da Soja Para A Saúde Humana - EMBRAPA Soja**, p. 41- 45, 2001.

CHEN, P. S.; TORIBARA, T. Y.; WARNER, H. Microdetermination of phosphorus. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 11, p. 1746-1758, 1956.

CLIFFORD, M. N. Anthocyanins nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 1063–1072, 2000.

COOK, N. C.; SAMMAN, S. Flavonoids chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 7, p. 66-76, 1996.

COSTA, J.A. **Cultura da soja**, Porto Alegre, Evangraf, 1996, 233 p.

COSTELLO, A. J. R.; GLONEK, T.; MYERS, T. C. ^{31}P -Nuclear magnetic resonance - pH titrations of myo-inositol hexaphosphate. **Carbohydrate Research**, v. 46, n. 2, p. 159-171, 1976.

DAVIES, C. G. A. et al. Indication of the maillard reaction during storage of protein isolates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 2485–2489, 1998.

DUHAN, A. D.; KHETARPAUL, N.; BISHNOI, S. Content of phytic acid and HCl extractability of calcium, phosphorus and iron as affected by various domestic processing and cooking methods. **Food Chemistry**, v. 78, p. 9-14, 2002.

EMBRAPA, 2011. **Soja em números** (safra 2008/2009). Disponível em: http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=22&cod_pai=16. Acesso em 27 de julho de 2011.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Programa nacional de pesquisa de soja**. Brasília, 1981, 115 p.

FENG, S. et al. Fungal-stressed germination of black soybeans leads to generation of oxooctadecadienoic acids in addition to glyceollins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 8589–8595, 2007.

FRANCIS, F. J. Food Colorants: anthocyanins. **Food Science and Nutrition**, v. 28, p. 273-314, 1989.

FRANKEL, E.N.; MEYER, A.S. The problem of using onedimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.80, p.1925-1941, 2000.

GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Isoflavones in Soy-Based Consumed in Brasil: Levels, Distribution, and Estimate Intake. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 21, p. 5987-5993, 2002.

GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. In: WROLSTAD, R.E. (Ed.). **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**. New York: John Wiley & Sons, 2001.

HARDONE, J. B. **The Flavonoids**: advanced in research since 1986, 5th edition, Chapman and Hall: New York, 1994.

HO, H. M. et al. Difference in flavonoid and isoflavone profile between soybean and soy leaf. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 56, p. 289-295, 2002.

HOU, D. X. Potential mechanisms of cancer chemoprevention by anthocyanins. **Current Molecular Medicine**, v. 3, p. 149–159, 2003.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1841-1856, 2005.

HUANG, R. Y.; CHOU, C. C. Stability of isoflavone isomers in steamed black soybeans and black soybean koji stored under different conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 1927–1932, 2009.

HUNG, P. V. et al. Total phenolic compounds and antioxidant capacity of wheat graded flours by polishing method. **Food Research International**, v. 42, p. 185-190, 2009.

IUPAC - IUB. **European Journal of Biochemistry**, v. 5, n. 1, 1968.

JACKMAN, R. L.; YADA, R. I.; TUNG, M. A. A review: Separation and chemical properties of anthocyanins used for their qualitative and quantitative analysis. **Journal of Food Biochemistry**, v. 11, p. 279-308, 1987.

JACOB, R. A. The integrated antioxidant system. **Nutrition Research**, v. 15, n. 5, p. 755-766, 1995.

JENG, T. L. et al. Comparisons of flavonoids and anti-oxidative activities in seed coat, embryonic axis and cotyledon of black soybeans. **Food Chemistry**, v. 123, p. 1112-1116, 2010.

JIM-RUI, X. et al. Correlation between antioxidation and the content of total phenolics and anthocyanin in black soybean accessions. **Agricultural Science in China**, v. 6, n. 2, p. 150-158, 2007.

KAMIZAKE, N. K. K. **Efeito do envelhecimento da soja (*Glycine max*) sobre as propriedades físicas e químicas dos grãos, extratos e tofus e características sensoriais dos tofus**. 2012. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

KARKLE, E. N. L.; BELEIA, A. Effect of soaking and cooking on phytate concentration, minerals, and texture of food-type soybeans. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 4, p. 1056-1060, 2010.

KAUR, C.; KAPOOR, H. C. Antioxidants in fruits and vegetables: the millenniums health. **International Journal of Food Science on Technology**, v. 37, p. 703-725, 2001.

KIM, J. A. et al. Correlation between the level of phenolic compounds and the antioxidant capacity in cooked-with-rice and vegetable soybean varieties. **European Food Research and Technology**, v. 224, n.2, p. 259-270, 2006.

KIM, J. A. et al. Comparison of isoflavones composition in seed, embryo, cotyledon and seed coat of cooked-with-rice and vegetable soybean (*Glycine max* L.) varieties. **Food Chemistry**, v. 102, p. 738–744, 2007.

KIM, S. L. et al. Variation of anthocyanins and isoflavones between yellow-cotyledon and green-cotyledon seeds of black soybean. **Food Science Biotechnology**, v. 14, p. 778–782, 2005.

- KUMAR, V. et al. 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, n. 1, p. 323-328, 2010.
- KUSKOSKI, E. M. et al. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 726-732, 2005.
- LAZZARI, E. N. **Análise de ácido fítico e minerais nos processos de maceração e cocção da soja**. 2006. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.
- LEE, J. et al. Characterisation of anthocyanins in the black soybean (*Glycine max L.*) by HPLC-DAD-ESI/MS analysis. **Food Chemistry**, p. 226-231, 2009.
- LEE, W. Y.; AHN, J. K.; CHUNG, J. M. Effects of year, site, genotype and their interactions on various soybean isoflavones. **Field Crops Research**, v. 81, p. 181–192, 2003.
- LIN, P. Y.; LAI, H. M. Bioactive compounds in legumes and their germinated products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 11, p. 3807-3814, 2006.
- LIU, C. et al. Optimization of extraction and isolation for 11S and 7S globulins of soybean seed storage protein. **Food Chemistry**, v. 102, n. 4, p.1310-1316, 2007.
- LIU, K. **Soybeans: Chemistry, technology, and utilization**. New York: Chapman & Hall, 1997, 537 p.
- LIU, K. **Soybean as Functional Foods and Ingredients**. Lincoln, CRC Press, 2004.
- MALENCIC, D.; CVEJIC, J.; MILADINOVIC, J. Polyphenol content and antioxidant properties of colored soybean seeds from Central Europe. **Journal of Medicinal Food**, v. 15, n. 1, p. 89-95, 2012.
- MALHOTRA, A.; COUPLAND, J. N. The effect of surfactants on the solubility, zeta potential, and viscosity of soy protein isolates. **Food Hydrocolloids**, v.18, p.101-108, 2004.
- MANACH, C. Polyphenols: food sources and bioavailability. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 79, p.727-747, 2004.
- MARÇO, P. H.; POPPI, R. J.; SCARMINIO, I. S. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. **Química Nova**, v. 31, p. 1218-1223, 2008.
- MARKAKIS, P. Stability of anthocyanins in foods. In: MARKAKIS, P. (Ed.) **Anthocyanins as food colors**. New York: Academic Press, 1982, p. 163-180.

MASSEY, L. K. et al. Oxalate and phytate of soy foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 14, p. 5670-5674, 2005.

MESSINA, MARK. J. Legumes and soybeans: overview of their nutrition profiles and health effects. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 70, p. 439S-450S, 1999.

MESSINA, MARK. J.; LOPRINZI, C. L. Soy for breast cancer survivors: a critical review of the literature, **The Journal of Nutrition**, v.131, p. 3095-3108, 2001.

MORAES, R. M. A. et al. Caracterização bioquímica de linhagens de soja com alto teor de proteína. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 5, p. 725-729, 2006.

MORAIS, A. A. C.; SILVA, A. L. Soja: suas aplicações. Rio de Janeiro. **Medsa**, 1996, 259 p.

MUJOO, R.; TRINH, D.T.; NG, P.K.W. Characterization of storage proteins in different soybean varieties and their relationship to tofu yield and texture. **Food Chemistry**, v.82, p. 265–273, 2003.

NACZK. M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, p. 95-111, 2004.

OATWAY, L.; VASANTHAN, T.; HELM, J. H. Phytic Acid. **Food Reviews International**, v. 17, n. 4, 2001.

PARK, Y. K. et al. Avaliação do teor de isoflavonas em soja brasileira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 3, n. 3, p. 156-160, 2001.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Research International**, v.39, p.791-800, 2006.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1035-1042, 2000.

POMPELLA, A. Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation. **International Journal of Vitamin and Nutrition Research**, v. 67, n. 5, p. 289-297, 1997.

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 48, p. 3396-3402, 2000.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in food and dietary supplements. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 53, p. 4290-4302, 2005.

RIBLETT, R.C. et al. Characterization of β -conglycinin and glycinin soy protein fractions from four selected soybean genotypes. **Journal of Agricultural and food chemistry**, v. 49, p. 4983–4989, 2001.

SAHA, S. et al. Physicochemical and nutritional attributes in 20 black soybean lines (*glycine max* L.) Of Himalayan region, India. **Journal of Food Quality**, v. 31, p. 79-95, 2008.

SAKATHIVELU et al. Isoflavone composition, phenol content, and antioxidant activity of soybean seeds from India and Bulgaria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n.6, p. 2090-2095, 2008.

SÁNCHEZ-MORENO, C. Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Science and Technology International**, v.8, p.121-137, 2002.

SATHE, S.; VENKATACHALAM, M. Influence of processing technologies on phytate and its removal. In: REDDY, N. R.; SHATE, S. K. (Ed.) **Food Phytates**, Florida: CRC Press, 2002, p.157-188.

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

SHAHIDI, F.; NACZK, M. Food Phenolics: sources, chemistry, effects and applications. Lancaster: **Technomic**, 1995, 331 p.

SHAO, A. S. et al. Tracking isoflavones: From soybean to soy flour, soy protein isolates to functional soy bread. **Journal of functional foods**. v.1, p.119 –127. 2009.

SNYDER, H. E.; KWON, T. W. Soybean utilization. New York: **AVI Book**, 1987, 346 p.

SONG, Y. J.; PAIK, H. Y.; JOUNG, H. J. Soybean and soy isoflavone intake indicate a positive change in bone mineral density for 2 years in young Korean women. **Nutrition Research**, v. 28, p. 25–30, 2008.

SLAVIN, M.; KENWORTHY, W.; YU, L. Antioxidant properties, phytochemical composition, and antiproliferative activity of Maryland-grown soybeans with colored seed coats. **Journal of Science Food Agriculture**, v. 57, n. 23, p. 11174-11185, 2009.

SWAIN, T.; HILLIS, W. E. The phenolic constituents of *Prunus domestica* – The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of Science Food Agriculture**, v. 10, p. 63-68, 1959.

TAKAKASHI, R. et al. Antioxidant activities of black and yellow soybeans against low density lipoprotein oxidation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4578-4582, 2005.

TAPIERO, H.; NGUYENBA, G.; TEW, K. D. Estrogens and environmental estrogens. **Biomedical and Pharmacotherapy**, v. 56, p. 36-44, 2002.

- TAY, S.L.; XU, G.Q.; PERERA, C.O. Aggregation profile of 11S, 7S and 2S coagulated with GDL, **Food Chemistry**, v.91, n. 3, p. 457-462, 2005.
- TODA, T. et al. Changes in isoflavone compositions of soybean foods during cooking process. **Food Sci. Technol. Res.**, v. 6, p. 314–319, 2000.
- TOMEI, R. R.; SALVADOR, M. J. Metodologias analíticas atuais para avaliação da atividade antioxidante de produtos naturais. XI Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e VII Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba. **UNIVAP**, 2007.
- THAIPONG, K. et al. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.19, p.669-675, 2006.
- THOMPSON, D. B.; ERDMAN JR, J. W. Phytic acid in soybeans. **Journal of Food Science**, v. 47, n. 2, p. 513-517, 1982.
- TSUDA, T.; HORIO, F.; OSAWA, T. Dietary cyanidin 3-O-beta-D-glucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice. **Journal of Nutrition**, v. 133, p. 2125–2130, 2003.
- VIEIRA, C. R.; CABRAL, L. C.; DE PAULA, A. C. O. Composição centesimal e conteúdo de aminoácidos, ácidos graxos e minerais de seis cultivares de soja destinada à alimentação humana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 7, p. 1277-1283, 1999.
- VIGGIANO, C. E. A Segunda era de ouro da nutrição: alimentos funcionais. **Revista Nutrição Profissional**, Maio/Junho, n. 1, p. 12, 2005.
- WANG, H.; CAO, G.; PRIOR, R. L. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 304–309, 1997.
- WANG, H-J.; MAZZA, G. Effects of anthocyanin and other phenolic compounds on the production of tumor necrosis factor alpha in LPS/IFN-gamma-activated RAW 264.7 macrophages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 4183–4189, 2002.
- 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, n.8, p.1674-1677, 1994.
- WHENT, M. et al. Isoflavone composition and antioxidant capacity of modified-lipoxygenase soybeans grown in Maryland. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.59, p.12902-12909, 2011.
- WILSON, S.; BLASCHEK, K.; DE MEJIA, E. G. Allergenic proteins in soybean: processing and reduction of P34 allergenicity. **Nutrition Reviews**, v. 63, p. 47–58, 2005.

XU, B.; CHANG, S. K. C. A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 2, p. S159-S166, 2007a.

XU, B.; CHANG, S. K. C. Comparative analyses of phenolic composition antioxidant capacity, and color of cool season legumes and other selected food legumes. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 2, p. 167S-177S, 2007b.

XU, B.; CHANG, S. K. C. Antioxidant capacity of seed coat, dehulled bean and whole black soybeans in relation to their distributions of total phenolics, phenolic acids, anthocyanins and isoflavones, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 8365-8373, 2008a.

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

XU, B.; CHANG, S. K. C. Effect of soaking, boiling and steaming and total phenolic content and antioxidant activities of cool season food legumes. **Food Chemistry**, v. 110, n. 1, p. 1-13, 2008c.

XU, B.; CHANG, S. K. C. Characterization of phenolic substances and antioxidant properties of food soybeans grow in the North Dakota-Minnesota region, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 19, p. 9102-9113, 2008d.

YAO, Y. et al. Antioxidant and alpha-glucosidase inhibitory activity of colored grains in China. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 2, p. 770-774, 2010.

YAMADA, L. T. P. et al. Composição química e conteúdo de ferro solúvel em soja [*Glycine max* (L.) Merrill]. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 2, p. 406-413, 2003.

YOSHIARA, L. Y. et al. Optimization of soy isoflavone extraction with different solvents using simplex-centroid mixture design. **International Journal of Food Science and Nutrition**, v. 63, p. 978-986, 2012.

YOUDIM, K. A. et al. Potential role of dietary flavonoids in reducing microvascular endothelium vulnerability to oxidative and inflammatory insults. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.13, p. 282–288, 2002.

ZHANG et al. Phenolic composition and antioxidant activity in seed coats of 60 Chinese black soybean varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.59, p. 5935-5944, 2011.

ZHOU, J. R.; ERDMAN, J. W. Jr. Phytic acid in health and disease. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 35, n. 6, p. 495-508, 1995.