



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MARCELA FERNANDA GETON GUELFÍ

**EFEITO DO FOTOPERÍODO, TEMPERATURA E TEMPO DE
GERMINAÇÃO DA SOJA SOBRE O TEOR DE DIFERENTES
FORMAS DE ISOFLAVONAS E VITAMINA C**

Londrina
2017

MARCELA FERNANDA GETON GUELFÍ

**EFEITO DO FOTOPERÍODO, TEMPERATURA E TEMPO DE
GERMINAÇÃO DA SOJA SOBRE O TEOR DE DIFERENTES
FORMAS DE ISOFLAVONAS E VITAMINA C**

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. Elza Louko Ida.

Londrina
2017

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)

Guelfi, Marcela Fernanda Geton.

EFEITO DO FOTOPERÍODO, TEMPERATURA E TEMPO DE GERMINAÇÃO DA SOJA SOBRE O TEOR DE DIFERENTES FORMAS DE ISOFLAVONAS E VITAMINA C / Marcela Fernanda Geton Guelfi. - Londrina, 2017.
63 f. : il.

Orientador: Elza Louko Ida.

Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2017.
Inclui bibliografia.

1. Soja - Tese. 2. Germinação - Tese. 3. Fotoperíodo - Tese. 4. Isoflavonas - Tese. I. Ida, Elza Louko. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. III. Título.

MARCELA FERNANDA GETON GUELFÍ

**EFEITO DO FOTOPERÍODO, TEMPERATURA E TEMPO DE
GERMINAÇÃO DA SOJA SOBRE O TEOR DE DIFERENTES
FORMAS DE ISOFLAVONAS E VITAMINA C**

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

BANCA EXAMINADORA

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

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

Profa. Dra. Mara Lucia Luis Ribeiro
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 29 de março de 2017.

Dedico

À Deus por estar sempre ao meu lado e nunca me deixar desistir, aos meus pais Carlos Guelfi e Cristina Guelfi e meus irmãos Matheus e Juninho por todo apoio e incentivo, por me acalmarem nos momentos mais difíceis. Aos queridos amigos, em especial Paula, Camila e Fabrício, pela amizade e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

À Profª. Dra. Elza Louko Ida, pela confiança, incentivo e orientação para que fosse possível a conclusão deste trabalho. Muito obrigada pelos ensinamentos, dedicação e paciência.

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

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

Aos Pós-doutorandos, Daniele Rodrigues, Denise Prates, Meg Fernandes e Rafael Carvalho por toda ajuda durante a execução desta pesquisa, pelas contribuições e amizade.

À estagiária Aryella Hoffmann pelo comprometimento, profissionalismo e toda ajuda durante a realização da parte experimental deste trabalho.

À todos os meus amigos e companheiros de laboratório Ariana Justos, Anna Flávia Veronese, Bruna Auriema, Bruna Boger, Bruna Yoshida, Cássia Takabayashi, Dafne Garcia, Fernanda Henrique, Maria Rita Porto, Natália Bom, Rodolfo Zanin, Sabrina Penteado, Talita Kato, Thaísa Marcello, Valéria Brito, pela colaboração e apoio de cada um e momentos de descontração.

Às minhas estimadas amigas e companheiras do grupo de pesquisa, Heloisa Falcão e Mariah Benine por estarem sempre dispostas a ajudar. Em especial aos irmãos científicos Cintia Ladeira Handa, Daniele Honorato e Fernando Sanches, que me acompanham desde o estágio, por acreditarem no meu potencial e nunca desistirem de mim, por todos os ensinamentos e pela paciência durante esses anos, vocês são mais do que especiais, são meus anjos, muito obrigada.

"Nunca se esqueça de quem é, porque é certo que o mundo não se lembrará. Faça disso sua força. Assim, não poderá ser nunca sua fraqueza. Arme-se com esta lembrança, e ela nunca poderá ser usada para magoá-lo".

(George R. R. Martin)

GUELF, Marcela Fernanda Geton. **Efeito do fotoperíodo, temperatura e tempo de germinação da soja sobre o teor de diferentes formas de isoflavonas e vitamina C.** 2017. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

A soja é considerada uma das principais oleaginosas do mundo, devido à sua fácil adaptação aos diversos tipos de clima. Dentre os compostos presentes na soja, as isoflavonas têm sido amplamente investigadas, devido à associação com os efeitos benéficos a saúde como na diminuição do risco de doenças como câncer, sintomas da menopausa e doenças cardiovasculares. A soja germinada é utilizada na alimentação humana, pois apresentam propriedades promotoras de saúde. Durante o processo de germinação ocorrem muitas alterações químicas e bioquímicas na semente melhorando o valor nutritivo e teor de compostos bioativos. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do fotoperíodo, temperatura e tempo de germinação da soja BRS 257 sobre o teor das diferentes formas de isoflavonas e vitamina C. As sementes de soja BRS 257 foram sanitizadas e submetidas ao processo de germinação utilizando o delineamento experimental 2³, cujas variáveis investigadas foram fotoperíodo (h), temperatura (°C) e tempo de germinação (dias) e as funções respostas avaliadas foram as diferentes formas de isoflavonas expressas em µmol/g e teor de vitamina C (g/100). O teor das diferentes formas de isoflavonas foi determinado por cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) e o teor de vitamina C por método titulométrico. O fotoperíodo, temperatura e tempo de germinação da soja BRS 257 exerceram diferentes efeitos sobre o teor de daidzina, genistina, malonilglicetina, daidzeína e genisteína. As isoflavonas β-glicosídeos (glicetina), acetilglicosídeos (acetildaidzina, acetilglicetina e acetilgenestina) e aglicona (gliciteína) não foram detectadas em todas as condições de germinação. Em relação a soja não germinada, a soja germinada por 5 dias a 35°C e sem iluminação, o teor de β-glicosídeos (daidzina e genistina) e malonilglicosídeo (malonilglicetina) diminuiu em 1,8; 3,2 e 19 vezes, respectivamente, enquanto que o teor de agliconas (daidzeína e genisteína) aumentou em 3,2 e 6 vezes, respectivamente. O fotoperíodo, temperatura e tempo de germinação e as interações apresentaram efeitos linear positivo e significativo sobre o teor de vitamina C da soja germinada. O teor máximo de vitamina C ocorreu quando a soja foi germinada com 24 h de iluminação/dia de germinação, 35°C e 5 dias de germinação e foi 9,6 vezes superior à soja não germinada. Entretanto, quando a soja foi germinada sem iluminação à 35°C e 5 dias de germinação, ocorreu uma redução de 42% no teor de vitamina C em relação ao com 24 h de iluminação/dia de germinação.

Palavras-chave: Soja. Germinação. Isoflavonas. Vitamina C. Fotoperíodo.

GUELF, Marcela Fernanda Geton. **Effect of photoperiod, temperature and time of soybean germination on the content of different forms of isoflavones and vitamin C.** 2017. 63 p. Dissertation (Master's Degree in Food Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

Soybeans are considered one of the main oilseeds in the world due to their easy adaptation to different types of climate. Among the compounds present in soy, isoflavones have been widely investigated, due to the association with beneficial health effects such as in reducing the risk of diseases such as cancer, menopause symptoms, cardiovascular diseases. The germinated soybean is used in human food since they present health promoting properties. During the germination process, many chemical and biochemical changes occur in the seed, improving the nutritive value and content of bioactive compounds. The aim of this study was to evaluate the effects of photoperiod, temperature and soybean germination time BRS 257 on the content of different forms of isoflavones and vitamin C. The BRS 257 soybean seeds were sanitized and submitted to the germination process using the experimental design 2^3 , whose variables investigated were photoperiod (h), temperature ($^{\circ}$ C) and germination time (days) and the evaluated responses were the different forms of isoflavones Expressed as $\mu\text{mol} / \text{g}$ and vitamin C content ($\text{g} / 100$). The content of the different forms of isoflavones was determined by ultra-high performance liquid chromatography (UPLC) and the vitamin C content by titrimetric method. The photoperiod, temperature and germination time of BRS 257 soybean had different effects on the content of daidzin, genistin, malonylglycitin, daidzein and genistein. The isoflavones β -glucosides (glycitin), acetylglucosides (acetyl daidzin, acetylglycitin and acetylgenistin) and aglycone (glycitein) were not detected in all germination conditions. In relation to ungerminated soybean, soybean germinated for 5 days at 35° C and no light, the content of β -glucosides (daidzin and genistin) and malonylglucoside (malonylglycitin) decreased by 1.8; 3.2 and 1.9-fold, respectively, while the content of aglycones (daidzein and genistein) increased by 3.2 and 6-fold, respectively. The photoperiod, temperature and germination time and the interactions showed positive and significant linear effects on the vitamin C content of the germinated soybean. The maximum content of vitamin C occurred when the soybean was germinated with 24h of illumination/day of germination, 35° C and 5 days of germination and was about 9.6-fold higher than the non-germinated soybean. However, when the soybean was germinated without light illumination at 35° C and 5 days of germination, there was a 42% reduction in the vitamin C content in comparison to the soybean sprout germinated with 24h of illumination/day of germination.

Keywords: Soybean. Germination. Isoflavones. Vitamin C. Photoperiod.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura da semente de soja	18
Figura 2 - Estrutura química dos flavonóides.....	22
Figura 3 - Estrutura química das isoflavonas.....	23

ARTIGO: FOTOPERÍODO, TEMPERATURA E TEMPO DE GERMINAÇÃO DA SOJA ALTERAM O TEOR DE ISOFLAVONAS E VITAMINA C

Figura 1 - Perfil de desejabilidade e superfície de resposta para Daidzina, sendo x_1 = Fotoperíodo (h), x_2 = Temperatura (°C) e x_3 = Tempo (Dias).....	57
Figura 2 - Perfil de desejabilidade e superfície de resposta para Genistina, sendo x_1 = Fotoperíodo (h), x_2 = Temperatura (°C) e x_3 = Tempo (Dias).....	58
Figura 3 - Perfil de desejabilidade e superfície de resposta para Malonilgicitina, sendo x_1 = Fotoperíodo (h), x_2 = Temperatura (°C) e x_3 = Tempo (Dias).	59
Figura 4 - Perfil de desejabilidade e superfície de resposta para Daidzeína, sendo x_1 = Fotoperíodo (h), x_2 = Temperatura (°C) e x_3 = Tempo (Dias).	60
Figura 5 - Perfil de desejabilidade e superfície de resposta para Genisteína, sendo x_1 = Fotoperíodo (h), x_2 = Temperatura (°C) e x_3 = Tempo (Dias).....	61
Figura 6 - Perfil de desejabilidade e superfície de resposta para vitamina C, sendo x_1 = Fotoperíodo (h), x_2 = Temperatura (°C) e x_3 = Tempo (Dias).	62

LISTA DE TABELAS

ARTIGO: FOTOPERÍODO, TEMPERATURA E TEMPO DE GERMINAÇÃO DA SOJA ALTERAM O TEOR DE ISOFLAVONAS E VITAMINA C

Tabela 1- Delineamento experimental 2^3 do processo de germinação da soja BRS 257 e funções repostas.....	55
Tabela 2- Teor de diferentes formas de isoflavonas e de vitamina C da soja.	56

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	16
2.1 <i>OBJETIVO GERAL</i>	16
2.2 <i>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</i>	16
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 <i>ASPECTOS GERAIS DA SOJA</i>	17
3.4 <i>PROCESSO DE GERMINAÇÃO</i>	20
3.2 <i>ISOFLAVONAS</i>	22
3.2.1 Efeito do processo de germinação sobre o teor de isoflavonas	24
3.3 <i>VITAMINA C</i>	26
REFERENCIAS	28
4 MATERIAL E MÉTODOS	36
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1 <i>ARTIGO CIENTÍFICO</i>	38
6 CONCLUSÃO	63

1 INTRODUÇÃO

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é considerada uma das principais oleaginosas do mundo, devido a sua fácil adaptação aos diversos tipos de clima (BORBA, 2010). O grão de soja possui uma composição química única, sendo constituído por aproximadamente 40% de proteínas, 20% de lipídeos, 34% de carboidratos e 6% de cinzas, sendo que, a composição pode variar em função da cultivar, estágio de maturação e localização geográfica de cultivo (MEDIC; ATKINSON; HURBURGH, 2014).

A soja é um dos alimentos mais econômicos e nutritivo e pode ser utilizado no combate à desnutrição, além de apresentar efeito benéficos à saúde, tais como, na diminuição do risco de doenças como câncer, sintomas da menopausa e doenças cardiovasculares (KUMAR et al., 2006; MCCUE; HORII; SHETTY, 2004). Estes efeitos estão associados aos compostos bioativos da soja, como as isoflavonas, que têm sido amplamente investigadas. O consumo de alimentos de soja em países orientais, tem despertado atenção devido a relação com as boas condições de saúde por meio de comparações entre as dietas, cujas constatações têm sido associadas à presença de isoflavonas (FERRARI; DEMIATE, 2001).

As isoflavonas presentes na soja e em seus produtos ocorrem em quatro grupos distintos: β -glicosídeos (daidzina, glicitina e genistina), malonilglicosídeos (6"-O-malonildaizina, 6"-O-malonilglicitina e 6"-O-malonilgenistina), acetilglicosídeos (6"-O-acetildaizina, 6"-O-acetilglicitina, 6"-O-acetilgenistina) e agliconas (daidzeína, gliciteína e genisteína), completando assim 12 formas (LIU, 2004; WANG, 2008). Na semente de soja há predominância de isoflavonas malonilglicosídeos, seguido de β -glicosídeos, sendo que as agliconas e acetilglicosídeos estão ausentes ou em baixa concentração (PAUCAR-MENACHO et al., 2010, ANDRADE et al., 2016). Entre as diferentes formas de isoflavonas, as agliconas são mais facilmente absorvidas pelo organismo humano (LARKIN; PRICE; ASTHEIMER, 2008). O conteúdo e perfil de isoflavonas na semente de soja pode variar conforme a cultivar e ano de colheita (BERGER et al., 2008; WANG; MURPHY, 1994), localização do plantio (TSUKAMOTO et al., 1995) fatores extrínsecos como as alterações do meio ambiente, teor de água, temperatura e presença de oxigênio (BRITZ; SCHOMBURG; KENWORTHY, 2011; NOGUEIRA; SEDIYAMA, 2013).

A soja pode ser utilizada como alimento para humanos ou animais, após processamento ou como matéria-prima para agroindústrias (MESSINA, 2002). Os alimentos de soja tradicionais são: óleo, natto, tempeh, iogurte de soja, extrato de soja, tofu e pode ser consumida também como hortaliça na forma de broto (LIU, 2012). Os brotos de sementes são obtidos por processo de germinação, que acarreta em alterações na composição dos grãos, bem como em seus compostos bioativos, como os compostos fenólicos, isoflavonas, vitaminas e minerais. Entretanto estas mudanças podem variar dependendo do tipo de vegetal, da variedade e das condições da germinação, tais como, temperatura, umidade, iluminação e tempo (SANGRONIS; MACHADO, 2007; PHOMMALTH et al., 2008; PAUCAR-MENACHO et al., 2010; QUINHONE JUNIOR; IDA, 2015). A germinação da soja pode ainda, promover uma redução nos fatores antinutricionais presentes no grão, tais como os inibidores de tripsina e hidrólise dos oligossacarídeos (rafinose e estaquiose) aumentando assim, o valor nutritivo das sementes germinadas (BAU, DEBRY, 1979).

O processo de obtenção dos brotos é simples, rápido, de baixo custo e são independentes da época e local de cultivo. A prática de germinação é tradicional para vários países como Japão, Coreia e China que consideram como alimentos saudáveis e funcionais (LEE et al., 2002).

No processo de germinação das sementes, a temperatura exerce grande influência na velocidade de germinação, na absorção de água e reações bioquímicas que regulam o metabolismo envolvido no processo (BEWLEY; BLACK, 1994; CARVALHO; NAKAGAWA, 2000). Além disso, o fotoperíodo ou presença controlada de luz também é um fator importante na germinação de várias espécies de sementes. A sensibilidade à luz varia de acordo com a qualidade, a intensidade luminosa e o tempo de iluminação. Tradicionalmente, os brotos de soja são cultivados no escuro e apresentam coloração amarelo brilhante. No entanto, os brotos de soja verde são comercialmente mais aceitos devido à sua cor e sabor (YUAN et al., 2015).

A vitamina C é normalmente encontrada em vegetais, frutas e alguns fungos e está associada com a prevenção do estresse oxidativo no processo de fotossíntese durante o crescimento das plantas (GUO et al, 2013). No processo de germinação da semente de soja, ocorre a ativação das vias de biossíntese do ácido ascórbico e tocoferóis com aumento no teor destes compostos nos brotos (WANG et

al., 2015). A germinação da soja à 30°C e exposição à luz UV-B aumentou o teor de vitamina C quando comparado com a ausência de luz (NOCTOR et al., 2012).

Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do fotoperíodo, temperatura e tempo de germinação da soja BRS 257 sobre o teor das diferentes formas de isoflavonas e vitamina C.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos das variáveis fotoperíodo, temperatura e tempo de germinação da soja BRS 257 sobre o teor de diferentes formas de isoflavonas e vitamina C aplicando o delineamento experimental 2³.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Caracterizar o grão da soja BRS 257 quanto ao seu teor de diferentes formas de isoflavonas e vitamina C.

Avaliar os efeitos do fotoperíodo (0, 12 e 24 h de luz diária), temperatura (25, 30 e 35 °C) e tempo (1,3 e 5 dias) de germinação da soja BRS 257 sobre os teores de diferentes formas de isoflavonas e vitamina C.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ASPECTOS GERAIS DA SOJA

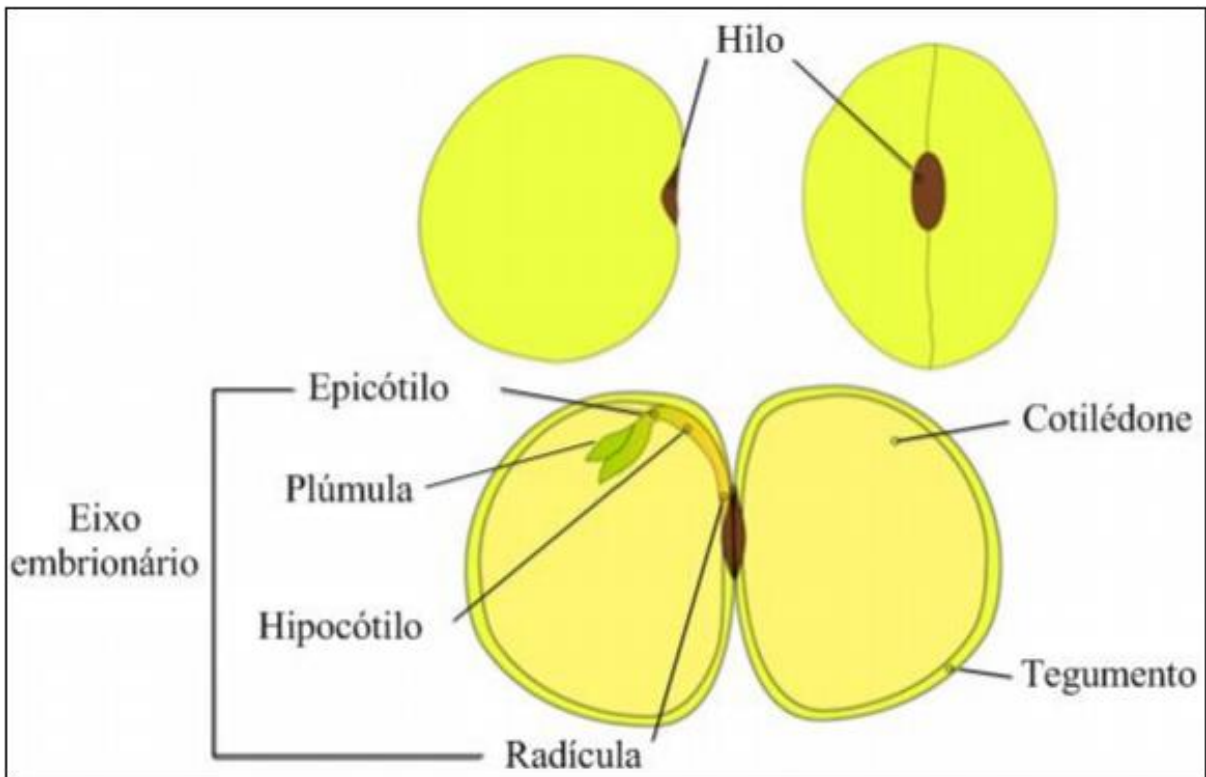
A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] pertence à família Fabaceae (Leguminosae), subfamília Papilionoideae e gênero *Glycine* e por sua fácil adaptação aos diversos tipos de clima, é considerada como uma das principais oleaginosas do mundo (BORBA, 2010). Sua origem se deu há cerca de 5 mil anos na China, nas regiões norte e central e é amplamente utilizada no oriente (LIU, 1997). A China foi o maior produtor e exportador deste grão até meados do século XX. No entanto, a soja começou a despertar o interesse das indústrias devido ao seu elevado teor de proteínas e óleo. Na década de 1950, a produção de soja se desenvolveu rapidamente nos EUA e Brasil, tornando-os assim, os maiores produtores mundiais (CHANG; QUI, 2010).

De acordo com o décimo levantamento realizado pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) de fevereiro de 2017, a safra mundial de soja 2016/2017 apresentou uma queda de 1,2 milhões de toneladas em relação ao mês de janeiro. Entretanto, se prevê ainda uma safra global recorde de 336,6 milhões de toneladas para o período. A produção estimada para os Estados Unidos e Brasil é de 117 e 104 milhões de toneladas, respectivamente, e refere-se a uma produção recorde (USDA, 2017).

Da produção mundial de soja, 85% são processadas para a obtenção de óleo vegetal e farelo de soja, e apenas 10% é usada para a alimentação humana. O restante é usado como sementes, alimentação animal, ou ainda é desperdiçado (RIAZ, 2006).

O grão de soja possui uma composição química única, sendo destacado o seu elevado teor, em base seca, de proteínas com 40 g/100 g de soja e lipídeos com 20 g/100 g de soja. Além disso, possui também em base seca, 34 g de carboidratos totais e 6 g de cinzas/100 g de soja. É uma leguminosa formada por 90% de cotilédones, 2-3% de hipocótilo e 6% de casca em relação a massa total do grão (TSUKAMOTO et al., 2001). Destaca-se que os constituintes estão distribuídos de forma distinta nos diferentes componentes do grão (Figura 1) e suas concentrações variam em função da cultivar de soja, estágio de maturação e localização geográfica de cultivo (MEDIC; ATKINSON; HURBURGH, 2014).

Figura 1- Estrutura da semente de soja



Fonte: Medic, Atkinson e Hurburgh (2014) – Adaptado

A soja é a única espécie vegetal que apresenta composição proteica com valor biológico semelhante às proteínas de origem animal devido à presença dos aminoácidos essenciais (FISCHER, 2001). Ainda que sejam consideradas deficientes em aminoácido sulfurados (cisteína e metionina), o seu teor é suficiente para atender às necessidades dos humanos, além de apresentar alto conteúdo de lisina que está deficiente na maioria dos cereais (MESSINA, 1999). Entretanto, a soja também contém inibidores de proteases que apresentam especificidade de inibir as enzimas proteolíticas, o que provoca a redução da digestibilidade proteica dos alimentos (MONTEIRO et al., 2004).

Aproximadamente 85% dos lipídeos da soja são compostos de ácidos graxos insaturados, sendo 50% ácido linoleico, ácido graxo essencial que ajuda a diminuir os níveis de colesterol do sangue, e o restante é constituído pelos ácido oléico e α -linolênico, conhecido como ω -3, relacionado à diminuição no risco de doenças cardiovasculares (GOLBITZ; JORDAN, 2006). Devido às insaturações presente na cadeia do ácido α -linolênico, o mesmo torna-se bastante suscetível à oxidação pela ação da enzima lipoxigenase, sendo o n-hexanal um dos produtos

secundários da reação oxidativa. O teor de n-hexanal tem apresentado uma correlação positiva com o atributo aroma de grão cozido em produtos derivados de soja (WILSON, 1996; SILVA et al., 2010; SILVA et al., 2012). A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) desenvolveu cultivares de soja isenta das isoenzimas lipoxigenases, para prevenir o desenvolvimento do sabor desagradável aos alimentos à base de soja, como por exemplo a cultivar BRS 257 (MORAES et al., 2007). Essa cultivar pode ser utilizada como matéria-prima de excelente qualidade e com sabor superior em relação a outros grãos (EMBRAPA, 2015).

Os carboidratos da soja são divididos em solúveis e insolúveis. Na fração solúvel são encontrados traços de monossacarídeos como a glicose, frutose e arabinose (GOLBITZ; JORDAN, 2006; WANG; CHEN; ZHANG, 2014), sacarose e os oligossacarídeos, rafinose, estaquiase e a verbascose. Estes oligossacarídeos não são digeríveis pelo organismo humano e no entanto, são metabolizados pelas bactérias presente no intestino, produzindo gases que ocasionam desconforto e flatulência em alguns indivíduos. Contudo estes açúcares podem ser utilizados como prebióticos no estímulo do crescimento de bifidobactérias, que são promotoras da saúde do cólon (HOU; YU; CHOU, 2000; YEO; LIONG; 2010; INOBUCHI et al., 2012). Os carboidratos insolúveis incluem a celulose, hemicelulose e pectina, encontrados principalmente na parede celular e são classificados como fibra alimentar (LIU, 1997). Dentre as fibras alimentares presente na soja, a celulose é o principal constituinte (MEDIC; ATKINSON; HUBURGH, 2014; REDONDO-CUENCA et al., 2007).

O conteúdo de cinzas totais no grão de soja é de aproximadamente 5%, sendo o potássio, sódio, cálcio, magnésio, enxofre e fósforo os principais minerais. As principais vitaminas solúveis são: tiamina, riboflavina, niacina, ácido pantotênico e ácido fólico. A quantidade do teor de ácido ascórbico (vitamina C) não é significativa na soja madura. Estão presentes também no grão de soja as vitaminas lipossolúveis A e E (LIU, 2004; LIEN et al., 2016).

Os produtos a base de soja são amplamente investigados devido ao valor nutritivo, às propriedades funcionais e como alimento funcional devido às suas proteínas (CIABOTTI et al., 2006) e compostos bioativos (SUGANO, 2006). O consumo de alimentos de soja em países orientais, tem sido associado diretamente com as boas condições de saúde de suas populações por meio de comparações entre as dietas e cujas constatações têm sido relacionadas à presença de

isoflavonas nesses alimentos (LEE et al., 1991; FERRARI; DEMIATE, 2001). As isoflavonas da soja tem sido investigadas por apresentarem associações com os efeitos benéficos na diminuição do risco de certos tipos de doenças como câncer, sintomas da menopausa e doenças cardiovasculares (MCCUE; HORII; SHETTY, 2004).

Muitas tecnologias, como físicas, químicas, biológicas ou uma combinação destas, são utilizadas na fabricação de diversos alimentos de soja, fermentados e não-fermentados. Os principais produtos de soja tem sido os fermentados como o natto, tempeh e iogurte de soja e os não fermentados como o extrato de soja, tofu e broto (LIU, 2012).

3.4 PROCESSO DE GERMINAÇÃO

O processo de germinação de sementes é uma tecnologia eficaz e de baixo custo que melhora a qualidade nutricional devido às alterações metabólicas (PAUCAR-MENACHO et al., 2010) que podem aumentar as substâncias desejáveis como por exemplo as isoflavonas agliconas (RIBEIRO et al., 2007; PAUCAR-MENACHO et al., 2010; SHI et al., 2010; QUINHONE; IDA 2015), ácido ascórbico, riboflavinas e tiamina (AHMAD; PATHAK, 2000); fitoesteróis e tocoferóis (SHI, NAM; MA, 2010). Além disso, melhora a digestibilidade e eficiência proteica, disponibiliza os compostos fenólicos e melhorar a qualidade sensorial das leguminosas, proporcionando uma textura crocante e sabor diferenciado (MATRINEZ et al., 2011; RANDHIR, LIN, SHETTY, 2004). A germinação pode promover, também uma redução nos fatores antinutricionais (tais como inibidores de tripsina e lectinas) e favorecer a hidrólise de oligossacarídeos (rafinose e estaquiose) (BAÚ; VILLAUME; MEJEAN, 2000; CREDE et al., 2004; TRUGO et al., 2000; VILAS BOAS; BARCELOS; LIMA, 2002). Na germinação, as formas polimerizadas de amidos e proteínas são transformadas em carboidratos e aminoácidos livres, devido a ativação dos processos enzimáticos. Além disso, há um aumento da resposta de defesa através da biossíntese de compostos fenólicos (RANDHIR; LIN; SHETTY, 2004).

O processo de germinação ocorre naturalmente nas sementes quando as condições são favoráveis para o seu desenvolvimento. Os principais fatores que afetam a germinação são umidade, temperatura, exposição à luz e

nutrientes (SANGRONIS; MACHADO, 2007; VILAS BOAS; BARCELOS; LIMA, 2002). A primeira etapa do processo de germinação é a absorção de água pela semente, a qual promove a reidratação dos tecidos, aumento da respiração e outras atividades metabólicas, que resultam no fornecimento de energia e nutrientes necessários para o crescimento do eixo embrionário (MEDERSKI; JEFFERS; PERERS, 1973; PEREIRA NETO, 2004). A água é um dos componentes que exerce maior influência na germinação das sementes (HICKS, 1978), pois é essencial para a atividade enzimática e para a solubilização e transporte dos compostos de reserva (MARCOS FILHO, 2005).

A composição química e os constituintes bioquímicos das sementes variam devido a alguns fatores intrínsecos como o genótipo, vitalidade, longevidade, viabilidade, maturidade e potencial fisiológico das sementes, e também a fatores extrínsecos como as alterações ambientais, água, temperatura e oxigênio (NOGUEIRA; SEDIYAMA, 2013). Segundo Raven, Evert e Eichhorn (1992), os primeiros estádios do processo germinativo das sementes podem ser completamente anaeróbicos; no entanto, após o rompimento do tegumento pela radícula, a semente passa a realizar respiração aeróbica, a qual depende da presença de oxigênio. Em situação de excesso de água, ocorre a redução da disponibilidade de oxigênio, que pode não ser suficiente para suprir a demanda, ocasionando atraso ou paralisação do desenvolvimento da plântula.

A temperatura afeta o processo germinativo, tanto por agir sobre a velocidade de absorção de água, como sobre as reações bioquímicas de todo processo, interferindo, portanto, não somente na germinação, como também na sua velocidade. A temperatura ótima do solo para a germinação está entre 25 °C e 35 °C (BEWLEY; BLACK, 1994; CARVALHO; NAKAGAWA, 2000).

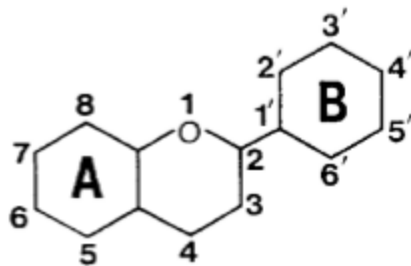
A presença de luz é necessária para a germinação das sementes de várias espécies. Porém, a sensibilidade das sementes à luz varia de acordo com a qualidade, a intensidade luminosa e o tempo de irradiação, bem como com o período e a temperatura durante o processo de hidratação. A luz fornece energia para a fotossíntese, bem como sinais para a fotomorfogênese nas plantas e também está envolvida em várias vias biossintéticas (PHOMMALTH et al., 2008). Luczkiewicz e Glod (2003) verificaram que a luz afeta as enzimas responsáveis pela biossíntese das isoflavonas e de acordo com Kim et al. (2006) a luz pode estimular a formação de fitoquímicos em brotos de soja.

Uma das vantagens de se investigar o processo de germinação da soja é obter os brotos de soja com maior teor de substâncias benéficas à saúde do que a semente não germinada. A germinação da soja aumentou o teor de compostos fenólicos, incluindo as isoflavonas totais e agliconas e ácido ascórbico (HUANG; CAI; XU, 2017; QUINHONE JUNIOR; IDA, 2015; HUANG; CAI; XU, 2014).

3.2 ISOFLAVONAS

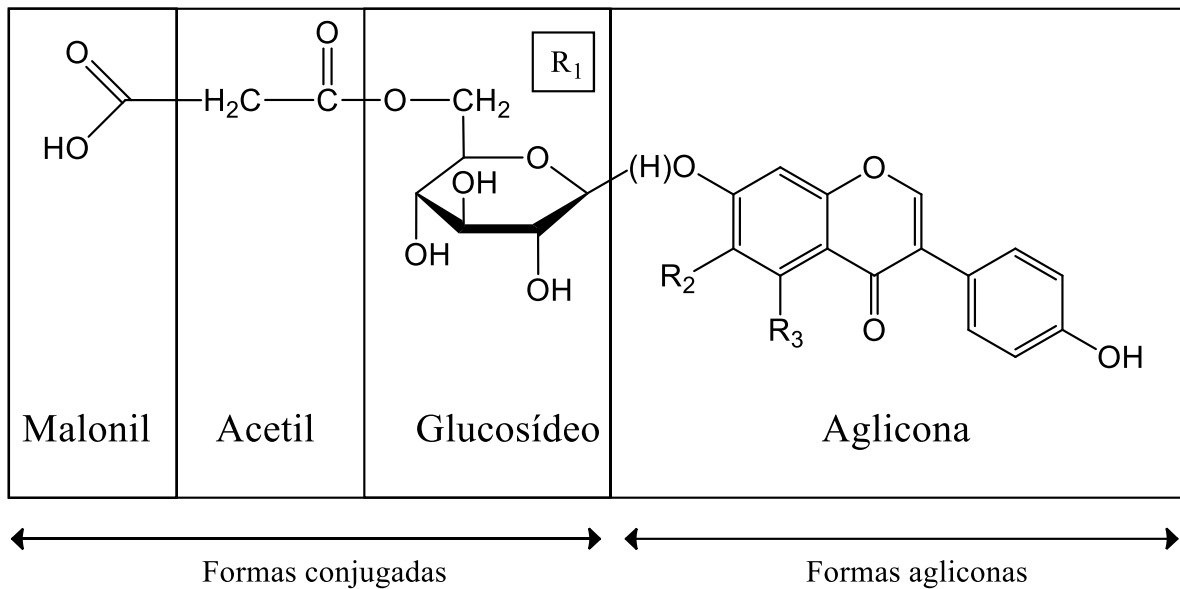
As isoflavonas são metabólitos secundários de plantas que fazem parte do grupo dos flavonóides e assemelham-se à estrutura do estrógeno humano. Podem estar associadas à diminuição do risco de doenças como a osteoporose, câncer, doenças cardiovasculares e síndromes pós-menopausa (NIELSEN; WILLIANSO, 2007). Sua estrutura básica é formada pelo núcleo flavona, que é composto por 2 anéis benzeno (A e B) ligados por um anel heterocíclico pirano (Figura 2) (LIU, 1997; MESSINA, 1999).

Figura 2 - Estrutura química dos flavonóides.



Fonte: Adaptado de Liu (1997)

O grão de soja contém basicamente três tipos de isoflavonas (Figura 3) que se apresentam normalmente em quatro diferentes formas, β -glicosídeos (daidzina, genistina e glicitina); acetilglicosídeos (acetildaidzina, acetilgenistina e acetilglicitina); malonilglicosídeos (malonildaidzina, malonilgenistina e malonilglicitina) e na forma estrutural não conjugada, aglicona (daidzeína, genisteína e gliciteína) (KUDOU et al., 1991; WANG; MARPHY, 1994).

Figura 3 - Estrutura química das isoflavonas.

Fonte: Rostagno, Palma e Barroso (2005).

Na soja, a maioria das isoflavonas estão na forma de malonilglicosídeos seguidos dos β -glicosídeos, agliconas e por último os acetilglicosídeos (HSIEH; KAO; CHEN, 2005). Ribeiro et al. (2007) analisaram o teor de isoflavonas em 18 cultivares de soja de diferentes grupos de maturidade cultivadas nas mesmas condições e os resultados indicaram uma predominância de malonilglicosídeos (67%), enquanto os β -glicosídeos e agliconas representaram 31% e 2% do total de isoflavonas, respectivamente.

A concentração e o perfil de isoflavonas também variam conforme as diferentes partes do grão (KUDOU et al., 1991; TSUKAMOTO et al., 1995). Tsukamoto et al. (1995) observaram que a concentração total de isoflavonas no hipocótilo foi de 5,5 a 6 vezes maior do que nos cotilédones. No entanto, os cotilédones possuem maior proporção de isoflavonas, ou seja, de 80 a 90%, pois correspondem a maior proporção em massa na estrutura do grão, ao contrário do hipocótilo, que apresenta 2% do total de matéria seca do grão. A gliciteína e suas formas químicas derivadas ocorrem exclusivamente no hipocótilo (YUAN et al., 2009) enquanto que o tegumento da semente é praticamente isento de isoflavonas.

As isoflavonas glicosiladas são pouco absorvidas no intestino delgado de humanos devido a sua alta massa molar (CEDERROTH; ZIMMERMANN; NEF, 2012), enquanto que as formas agliconas são absorvidas mais facilmente pelas microvilosidades do tecido epitelial do intestino delgado (LARKIN;

PRICE; ASTHEIMER, 2008). Além disso, as isoflavonas agliconas podem ser metabolizadas por bactérias intestinais e produzir metabólitos específicos, tais como equol e/ou o-desmetilangolensina (ODMA) a partir da daidzeína e p-etilfenol a partir da genisteína (SETCHELL; BROWN; LYDEKING-OLSEN, 2002).

Inúmeros fatores podem alterar a concentração de isoflavonas na soja e em seus derivados, como por exemplo, a variedade da soja, o ano da colheita, a localização geográfica do cultivo, condições de processamento e o tipo de alimento produzido (WANG; MURPHY, 1994; NAKAMURA; TSUJI; TONOGAI, 2000). Os β -glicosídeos podem ser convertidos em agliconas, devido ao aumento da atividade da enzima β -glicosidase, quando a soja é submetida à fermentação (CARRÃO-PANIZZI; BORDIGNON, 2000) ou germinação (RIBEIRO et al., 2006).

Andrade et al. (2016) observaram que a farinha de soja, antes do tratamento térmico, era isenta das formas acetilglicosídeos, no entanto, quando submetida à uma temperatura de 200 °C, foi detectado a presença de acetilglicosídeos enquanto os malonilglicosídeos sofreram uma redução. Dessa forma, quando a soja é submetida a tratamento térmico ou alta pressão, os malonilglicosídeos são convertidos em acetilglicosídeos, que por sua vez, são convertidos em β -glicosídeos.

3.2.1 Efeito do processo de germinação sobre o teor de isoflavonas

O processo de germinação da soja é uma tecnologia utilizada para a obtenção de brotos tanto para fins comerciais como para consumo próprio. Há vários estudos que comprovam que os fatores, tempo, temperatura e fotoperíodo interferem tanto no conteúdo total, quanto na distribuição das diferentes formas químicas das isoflavonas após a germinação. Na germinação da soja, ocorrem alterações bioquímicas, bem como a ativação da enzima β -glicosidase (SANTOSH; BALASUBRAMANIAN; LALITA, 1999), sendo que maior atividade foi descrita no epicótilo de soja após 144 h de germinação na presença de luz (fotoperíodo de 10 h) a 35 °C (YOSHIARA et al., 2012).

Paucar-Menacho et al. (2010) avaliaram o efeito do tempo e temperatura no processo de germinação da soja BRS 133 sobre o teor de agliconas totais. Após 63 h de germinação a 30 °C observaram um aumento de 26% no teor de agliconas, sendo que o teor de genisteína aumentou 212% quando comparado

com a soja não germinada. No entanto, quando o tempo de germinação aumentou para 72 h porém a 25 °C, foi observado uma diminuição no teor de agliconas.

Phommalth et al. (2008) investigaram o efeito de diferentes fontes de iluminação durante a germinação de quatro variedades de soja sobre o teor de isoflavonas e verificaram que o teor de isoflavonas foi dependente da variedade e da exposição às diferentes fontes de luz. Os brotos expostos à iluminação da lâmpada de estufa apresentaram maior teor de isoflavonas totais do que os expostos à lâmpada incandescente. Entretanto, o teor de daidzina e genistina de todas as variedades aumentaram sobre a iluminação com luz de alta intensidade (fluorescente e lâmpada de estufa), enquanto que a daidzeína e genisteína aumentaram sobre iluminação com luz de baixa intensidade (incandescente). O período de exposição à luz também afetou o teor de isoflavonas, sendo que este aumentou até 12 h de exposição diária e diminuiu gradativamente entre 12 e 24 h. Kim et al. (2006) observaram que os brotos de soja cultivados na presença de luz apresentaram uma média maior de isoflavonas totais em relação aos brotos cultivados na ausência de luz. No entanto, o efeito da iluminação sobre o teor de isoflavonas foi dependente das variedades de soja. Chi et al. (2005), observaram que os brotos de soja germinados entre 5 e 7 dias, na presença de luz apresentam maior teor de proteínas, lipídeos, fibras, vitaminas e outros nutrientes, em relação aos brotos germinados na ausência de luz.

Huang, Cai e Xu (2014) observaram que, durante os diferentes tempos de germinação, o teor de isoflavonas agliconas da soja aumentou de 3,10 mg/g para 3,99 mg/g. Após um dia de germinação, o conteúdo de agliconas aumentou 84% enquanto que na soja germinada por 3 dias, aumentou em cerca de 147%. Yoshiara et al. (2012) observaram diferenças entre o perfil de isoflavonas nas diferentes partes da semente, em soja do cultivar BSR257 germinada por 7 dias a 35 °C e presença de luz natural. Para os hipocótilos e radículas, a máxima concentração de agliconas ocorreu após 3 dias de germinação (0,55 mg/g e 1,53 mg/g, em base seca), enquanto que para os cotilédones, a máxima concentração de agliconas (0,89 mg/g) foi obtida após 5 dias e, para os epicótilos (0,96 mg/g), após 7 dias de germinação. Quinhone Junior & Ida (2015) investigaram o efeito do tempo de germinação sobre o perfil das diferentes formas de isoflavonas em brotos de soja e observaram que a concentração de daidzina ($0,256 \mu\text{mol g}^{-1}$) e genistina ($0,343 \mu\text{mol g}^{-1}$) foi mínima em 72 h de germinação e aumentou 2,2 e 2,1 vezes entre 72 h

e 168 h. No entanto, os brotos germinados por 168 h apresentaram uma redução de 1,8 vezes no teor total de β -glicosídeos quando comparados às sementes não germinadas.

O processo de germinação também afeta o teor de outros compostos que apresentam função benéfica à saúde do humano, com destaque à vitamina C. Vários estudos demonstram que o broto de soja apresenta grande quantidade de ácido ascórbico, fenólicos totais e minerais (BAU et al., 1997; XU et al., 2005; KIM et al., 2006; ZOU et al., 2014).

3.3 VITAMINA C

Os ácidos ascórbico e dehidroascórbico apresentam atividade biológica de vitamina C. A função biológica mais importante do ácido ascórbico é a habilidade de interromper a reação em cadeia de radicais livres, devido às suas propriedades redutoras (MAZUREK; JAMROZ, 2015).

O ácido ascórbico é especialmente encontrado em frutas, vegetais e alguns fungos e está associado com a prevenção do estresse oxidativo no processo de fotossíntese para o crescimento das plantas (GUO et al., 2013). Em seres humanos, o ácido ascórbico é indispensável em qualquer dieta saudável e é um antioxidante altamente eficaz para a saúde (Suza et al., 2010), além de fazer parte da síntese de colágeno, contribui com a absorção do ferro, na redução do nível de colesterol no sangue e na melhora do sistema imunológico (CATANI et al., 2005; HUNT et al., 1990; NAIDU, 2003). No entanto, os seres humanos são incapazes de sintetizar este composto, devido à enzima inativa L-gulono-1,4-lactona oxidase, a última enzima chave na biossíntese do ácido ascórbico. Dessa forma, os alimentos à base de plantas são as principais fontes de ácido ascórbico, pois acumula-se em plantas de folhas verdes, principalmente através da via L-galactose (GUO et al., 2013).

Em leguminosas como a soja e o feijão, o teor de ácido ascórbico é baixo, no entanto, pesquisadores tem reportado aumento no teor deste composto, quando estas leguminosas são germinadas. Kumar et al. (2010) avaliaram o conteúdo de vitamina C em grãos maduros de dezoito cultivares de soja, sendo seis cultivares de soja amarela, seis de soja verde e seis de soja preta. Esses autores observaram que o conteúdo de vitamina C variou entre 3,52 e 5,61 mg 100g⁻¹ para

as cultivares amarelas, 4,51 a 6,34 mg 100g⁻¹ para as cultivares verdes e 5,44 a 7,47 mg 100g⁻¹ para as cultivares pretas, sendo que as cultivares de soja preta apresentaram resultados significativamente maiores que as amarelas. Wang et al. (2015) observaram que durante o processo de germinação da soja a 20 °C na ausência de luz por 5 dias de germinação, o teor de vitamina C aumentou 7 vezes em relação ao teor de vitamina C da soja germinada no primeiro dia. A germinação da soja ativa as vias de biossíntese do ácido ascórbico e tocoferóis, o que causa um aumento significativo destes compostos. Huang, Cai e Xu (2014) observaram que o teor de vitamina C aumentou até o terceiro dia de germinação na ausência de luz e reduziu gradativamente até o quinto dia. Resultados similares foram observados por Jiao et al., (2016) que observaram um aumento de 34% no teor de vitamina C quando germinado na presença de luz UV-B a 30 °C por 2 dias, seguido de redução até o sexto dia. Observaram ainda que o broto germinado na presença de luz apresentou maior teor de vitamina C em comparação ao broto germinado na ausência de luz.

REFERENCIAS

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

ANDRADE, J. C., MANDARINO, J. M. G., KUROZAWA, L. E., & IDA, E. I. The effect of thermal treatment of whole soybean flour on the conversion of isoflavones and inactivation of trypsin inhibitors. **Food chemistry**, 194, 1095-1101, 2016.

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

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

BAU, H.M.; DEBRY, G. Germinated soybean protein products chemical and nutritional evaluation. **Journal of the American Oil Chemists' Society, Champaign**, v.56, n.3, p. 160-16, 1979.

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

BERGER, M.; RASOLOHERY, C. A.; CAZALIS, R.; DAYDÉ, J. Isoflavone accumulation kinetics in soybean seed cotyledons and hypocotyls: distinct pathways and genetic controls. **Crops Science**, v. 48, p. 700-708, 2008.

BEWLEY, J. D., BLACK, A. M. Seeds – Physiology of development and germination. **New York: Plenum Press**. 2^a ed., 1994. 445 p.

BORBA, Z. M. S. Análise dos danos causados pelas formigas cortadeiras à cultura da soja no município de Rio Largo- AL. **Trabalho de conclusão de curso**. Universidade Federal de Alagoas- UFA, Rio Largo, 2010.

BRITZ, S. J. SCHOMBURG, C. J.; KENWORTHY, W. J. Isoflavones in seeds of field-grown soybean: variation among genetic lines and environmental effects. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 88, p. 827-832, 2011.

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

CARVALHO, N. M., NAKAGAWA, J. Sementes: ciência, tecnologia e produção. **Jaboticabal: Funep**, p.588, 2000.

CATANI, M. V., SAVIANI, I., ROSSI, A., MELINO, G., & AVIGLIANO, L. Biological role of vitamin C in keratinocytes. **Nutrition Reviews**, 63, 81–90, 2005.

CEDERROTH, C. R.; ZIMMERMANN, C.; NEF, S. Soy, phytoestrogens and their impact on reproductive health. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 355, p. 192-200, 2012.

CHANG, L.-J.; QUI, R. -Z. The origin and history of soybean. In: SINGH, G. The soybean botany, production and uses. **Wallingford: CABI**, 2010. p. 1-24.

CHI HY, ROH JS, KIM JT, LEE SJ, KIM MJ, HAHN S. J. Light quality on nutritional composition and isoflavones content in soybean sprouts. **Korean Journal of Crop Science**. 50: 415-418, 2005.

CIABOTTI, S.; BARCELLOS, M.F.P.; MANDARINO, J.M.G.; TARONE, A. G. Avaliações químicas e bioquímicas de grãos, extratos e tofus de soja comum e de soja livre de lipoxigenase. **Ciência Agrotécnica**, v. 30, n. 5, p. 920-929, 2006.

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

EMBRAPA. Cultivares de soja: Regiões sul e central do Brasil 10/10/2011. 1ª ed., Londrina: **Embrapa Soja**, 2010. 62 p.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em . Acessado em: 15 fevereiro de 2017.

FERRARI, R. A.; DEMIATE, I. M. Isoflavonas de soja – Uma breve revisão. **Biological and Health Sciences**, v. 7, p. 39-46, 2001.

FISCHER, M. Enzymatic extractability of soybean meal proteins and carbohydrates: heat and humidity effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, n. 9, p. 4463-4469, 2001.

GOLBITZ, P.; JORDAN, J. Soyfoods: Market and Products. In: RIAZ, Mian N. Soy application in food. **Boca Raton: Taylor e Francis**, p. 1-22, 2006.

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

GUO, X., LIU, R. H., FU, X., SUN, X., TANG, K. Over-expression of l-galactono- γ -lactone dehydrogenase increases vitamin C, total phenolics and antioxidant activity in lettuce through bio-fortification. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, 114(2), 225-236, 2013.

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

HOU, J.-W.; YU, R.-C.; CHOU, C.-C. Changes in some components of soymilk during fermentation with bifidobacteria. **Food Research International**, v. 33, p. 393-397, 2000.

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

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

HUANG, G., CAI, W., XU, B. Improvement in beta-carotene, vitamin B 2, GABA, free amino acids and isoflavones in yellow and black soybeans upon germination. **LWT-Food Science and Technology**, 75, 488-496, 2017.

HUNT, J. R., MULLEN, L. M., LYKKEN, G. I., GALLAGHER, S. K., NIELSEN, F. H. Ascorbic acid: Effect on ongoing iron absorption and status in iron depleted young woman. **American Journal of Clinical Nutrition**, 51, 649-655, 1990.

INOUCHI, S.; OHASHI, Y.; NARAI-KANAYAMA, A.; ASO, K.; NAKAGAKI, T.; FUJISAWA, T. Effects of non-fermented and fermented soybean milk intake on faecal microbiota and faecal metabolites in humans. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 63, p. 402-410, 2012.

JIAO, C., YANG, R., ZHOU, Y., GU, Z. Nitric oxide mediates isoflavone accumulation and the antioxidant system enhancement in soybean sprouts. **Food chemistry**, 204, 373-380, 2016.

KIM, E. H., KIM, S. H., CHUNG, J. I., CHI, H. Y., KIM, J. A., CHUNG, I. M. Analysis of phenolic compounds and isoflavones in soybean seeds (*Glycine max* (L.) Merrill) and sprouts grown under different conditions. **European Food Research and Technology**, 222(1-2), 201, 2006.

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

KUMAR, V., RANI, A., SOLANKI, S., HUSSAIN, S. M. Influence of growing environment on the biochemical composition and physical characteristics of soybean seed. **Journal of Food Composition and Analysis**, 19(2), 188-195, 2006.

KUMAR, V.; RANI, A.; DIXIT, A. M.; PRATAP, D.;BHATNAGAR, D. A comparative assessment of total phenolic content, ferric reducing-anti-oxidative power, free

radical-scavenging activity, vitamin C and isoflavones content in soybean with varying seed coat colour. **Food Research International**, v.43, p. 323-328, 2010.

LARKIN, T., PRICE, W. E., ASTHEIMER, L. The key importance of soy isoflavone bioavailability to understanding health benefits. **Critical reviews in food science and nutrition**, 48(6), 538-552, 2008.

LEE, H. P., LEE, J., GOURLEY, L., DUFFY, S. W., DAY, N. E., ESTÈVE, J. Dietary effects on breast-cancer risk in Singapore. **The Lancet**, 337(8751), 1197-1200, 1991.

LEE, J. D.; HWANG, Y. H.; CHO, H. Y.; KIM, D. U.; CHUNG, M. G. Comparison of characteristics related with soybean sprouts between *Glycine max* and *G. soja*. **Korean Journal of Crop Science**, v.47, p.189-198, 2002.

LIEN, D. T. P.; PHUC, T. M.; TRAM, P. T. B.; TOAN, H. T. Time and temperature dependence of antioxidant activity from soybean seeds (*Glycine max* L. Merr.) during germination. **International Journal of Food Science and Nutrition**, 2455-4898, v.1, 22-27, 2016.

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

LIU, K. Soybeans as a powerhouse of nutrients and phytochemicals. In: LIU, K. **Soybeans as Functional Foods and Ingredients**, Illinois: AOCS Press, cap. 1, 2004.

LIU, KeShun. **Soybeans: chemistry, technology, and utilization**. Springer, 2012.

LUCZKIEWICZ, M.; GLOD, D. Callus cultures of *Genista* plants: in vitro material producing high amounts of isoflavones of phytoestrogenic activity. **Plant Sci**. 2003, 165, 1101–1108.

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

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

MAZUREK, A., JAMROZ, J. Precision of dehydroascorbic acid quantitation with the use of the subtraction method–Validation of HPLC–DAD method for determination of total vitamin C in food. **Food chemistry**, 173, 543-550, 2015.

MCCUE, P.; HORII, A.; SHETTY, K. Mobilization of phenolic antioxidants from defatted soybean powders by *Lentinus edodes* during solid-state bioprocessing is associated with enhanced production of laccase. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 5, n. 3, p. 385–392, 2004.

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

MEDIC, J.; ATKINSON, C.; HURBURGH, C. R. Current knowledge in soybean Composition. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 91, p. 363–384, 2014.

MESSINA, M. J. Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. **The American journal of clinical nutrition**, 70(3), 439s-450s, 1999.

MESSINA, M. Soy in the prevention and treatment of chronic diseases: a short review of literature. **ASA Technical Bulletin**, v. HN35, p. 1- 19, 2002.

MONTEIRO, M. R. P.; COSTA, N. M. B.; OLIVEIRA, M. G. A.; PIRES, C. V.; MOREIRA, M. A. Qualidade proteica de linhagens de soja com ausência do inibidor de tripsina Kunitz e das isoenzimas lipoxigenases. **Revista de Nutrição**, v.17, n.2, p.195-205, 2004.

MORAES, R. M. A.; BERTAGNOLLI, P. F.; VERNETTI-JR, F.; ANTUNES, I. F.; GARRAFA, M.; BENEDETTI, V. A.; CARRÃO-PANIZZI, M. C. Extensão de indicação da cultivar BRS 257 para o estado do Rio Grande do Sul. In: Reunião de Pesquisa de Soja da Região Sul, 35., 2007, Santa Maria. **Atas e resumos Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria**, 2007. p. 46.

NAIDU, A. K. Vitamin C in human health and disease is still mystery? **An overview. Nutrition Journal**, 2, 1–10, 2003.

NAKAMURA, Y.; TSUJI, S.; TONOGAI, Y. Determination of the levels of isoflavonoids in soybean and soy-derived foods and estimation of isoflavonoids in the Japanese daily intake. **Jurnal of AOAC International**, v. 83, p. 635-650, 2000.

NIELSEN, I. L. F; WILLIANSO, G. Review of the factors affecting bioavailability of soy isoflavones in humans. **Nutrition and Cancer-an International Journal**, 57(1), 1–10. 2007.

NOCTOR, G., MHAMDI, A., CHAOUCH, S., HAN, Y. I., NEUKERMANS, J., MARQUEZ - GARCIA, B. E. L. E. N.; FOYER, C. H. Glutathione in plants: an integrated overview . **Plant, Cell & Environment**, 35(2), 454-484, 2012.

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

PAUCAR-MENACHO, L. M.; BERHOW, M. A.; MANDARINO, J. M. G.; CHANG, Y. K.; MEJIA, E. G. de. Effect of time and temperature on bioactive compounds in germinated Brazilian soybean cultivar BRS 258. **Food Research International**, v.43, n 7, p. 1856-1865, 2010.

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

PHOMMALTH, S., JEONG, Y. S., KIM, Y. H., DHAKAL, K. H., & HWANG, Y. H. Effects of light treatment on isoflavone content of germinated soybean seeds. **Journal of agricultural and food chemistry**, 56(21), 10123-10128, 2008.

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

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biology of plants**. 5 ed. New York: Worth, 1992.

REDONDO-CUENCA, A.; VILLANUEVA-SUÁREZ, M. L.; RODRIGUES-SEVILLA, M. D.; MATEOS-APARICIO, I. Chemical composition and dietary fibre of yellow and green commercial soybeans (*Glycine max*). **Food Chemistry**, v. 101, n.3, p. 1216-1222, 2007.

RIAZ, M. N. Processing of soybeans into ingredients. In **Soy applications in food**. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006. p. 39-62.

RIBEIRO, M. L. L.; MANDARINO, J. M. G.; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; OLIVEIRA, M. C.; CAMPO, C. B. H.; NEPOMUCENO, A. L.; IDA, E. I. β -glucosidase activity and isoflavone content in germinated soybean radicles and cotyledons. **Journal of Food Biochemistry**, v.30, p.453-465, 2006.

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

ROSTAGNO, M. A., PALMA, M., & BARROSO, C. G. Solid-phase extraction of soy isoflavones. **Journal of Chromatography**, 1076(1), 110-117, 2005.

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

SANTOSH, T. R.; BALASUBRAMANIAN, K. K.; LALITA, K. Enhancement of β -glucosidase and β -galactosidase of *Trigonella foenum-graecum* by exposure to the allelochemical mimosine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, p.462-467, 1999.

SETCHELL, K. D. R.; BROWN, N. M.; LYDEKING-OLSEN, E. The clinical importance of the metabolite equol- A clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. **The Journal of Nutrition**, v. 132, p. 3577-3584, 2002.

SILVA, J. B. FELBERG, I.; CARRAO-PANIZZI, M. C.; LEE, S. Y.; PRUDENCIO, S. H. Relationships among sensory analysis, isoflavone and hexanal contents of soymilk powder. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, p. 1197-1204, 2010.

SILVA, J. B. PRUDENCIO, S. H.; CARRAO-PANIZZI, M. C.; GREGORUT, C.; FONSECA, F.; MATTOSO, L. Study on the flavour of soybean cultivars by sensory analysis and electronic tongue. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 10, p. 571-580, 2012.

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

SUGANO, M. Nutritional implications of soybean. In: SUGANO, M. **Soy in health and disease prevention**. CRC Press: Boca Raton, p. 1-16, 2006.

SUZA, W.P., AVILA, C.A., CARRUTHERS, K., KULKARNI, S., GOGGIN, F.L. LORENCE, A. Exploring the impact of wounding and jasmonates on ascorbate metabolism. **Plant Physiology and Biochemistry**, 48, 337–350, 2010.

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

TSUKAMOTO, C.; SHIMADA, S.; IGITA, K.; KUDOU, S.; KOKUBUN, M.; OKUBO, K.; KITAMURA, K. Factors affecting isoflavone content in soybean seeds: changes in isoflavones, saponins, and composition of fatty acids at different temperatures during seed development. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.43, n.5, p.1184-1192, 1995.

TSUKAMOTO, C.; KUDOU, S.; KIKUCHI, A.; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; ONO, T.; KITAMURA, K.; OKUBO, K. Isoflavones in soybean products: composition, concentration, and physiological effects. **Documentos da Embrapa**, v. 169, p. 9-14, 2001.

USDA - **Departamento de Agricultura dos Estados Unidos** 10º levantamento USDA da safra 2016/2017- fevereiro de 2017. Disponível em: <http://www.fiesp.com.br/indices-pesquisas-e-publicacoes/safra-mundial-de-soja/attachment/boletim_soja_fevereiro2017/>. Acesso em: 20 de fev. 2017.

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

WANG, H.; MURPHY, P. A. Isoflavone composition of American and Japanese soybeans in Iowa: Effects of variety, crop year, and location. **Journal of Agricultural**

and Food Chemistry, v. 42, p. 1674-1677, 1994.

WANG, T. Minor Constituents and Phytochemicals of Soybeans in: JOHNSON, L. A.; WHITE, P. J.; GALLOWAY, R. **Soybeans: Chemistry, Production, Processing and Utilization**. Urbana: AOCS Press, 2008. p. 297-330.

WANG, X., YANG, R., JIN, X., CHEN, Z., ZHOU, Y., GU, Z. Effect of germination and incubation on Zn, Fe, and Ca bioavailability values of soybeans (*Glycine max* L.) and mung beans (*Vigna radiate* L.). **Food Science and Biotechnology**, 24(5), 1829-1835, 2015.

WANG, Y.; CHEN, P.; ZHANG, B. Quantitative trait loci analysis of soluble sugar contents in soybean. **Plant Breeding**, v. 133, p. 493-498, 2014.

WILSON, L. A. Comparasion of lipoxygenase-containing soybeans for foods. In: PIAZZA, G. J (Ed). **Lipoxygnase and Lipoxygenase Pathway Enzymes**. Champaign, Illinois: AOCS Press. 1996, p. 209-225.

XU, M. J., DONG, J. F., ZHU, M. Y. Effects of germination conditions on ascorbic acid level and yield of soybean sprouts. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 85(6), 943-947, 2005.

YEO, S.-K.; LIONG, M.T-. Effect of prebiotics on viability and growth characteristics of probiotics in soymilk. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, p. 267-275, 2010.

YOSHIARA, L. Y.; MADEIRA, T. B.; DELAROZA, F.; SILVA, J. B.; IDA, E. I. Optimization of soy isoflavone extraction with different solvents using the simplexcentroid mixture design. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 9, p. 978–986, 2012.

YUAN, J. P., LIU, Y. B., PENG, J., WANG, J. H., LIU, X. (2009). Changes of isoflavone profile in the hypocotyls and cotyledons of soybeans during dry heating and germination. **Journal of agricultural and food chemistry**, 57(19), 9002-9010, 2009.

YUAN, M., JIA, X., YANG, Y., DING, C., DU, L., YUAN, S., CHEN, Y. Effect of light on structural properties and antioxidant activities of polysaccharides from soybean sprouts. **Process Biochemistry**, 50(7), 1152-1157, 2015.

ZOU, T., XU, N., HU, G., PANG, J., XU, H. Biofortification of soybean sprouts with zinc and bioaccessibility of zinc in the sprouts. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 94(14), 3053-3060, 2014.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este item MATERIAL E MÉTODOS está sendo contemplado na descrição do Artigo Científico intitulado " Fotoperíodo, temperatura e tempo de germinação da soja alteram o teor de isoflavonas e vitamina C" que foi redigido e será submetido para publicação em um periódico científico da área de Ciência de Alimentos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este item RESULTADOS E DISCUSSÃO está contemplado na descrição do Artigo Científico “Fotoperíodo, temperatura e tempo de germinação da soja alteram o teor de isoflavonas e vitamina C” no qual foi redigido conforme segue, e será submetido para publicação em um periódico científico da área de Ciência de Alimentos.

5.1 ARTIGO CIENTÍFICO

Fotoperíodo, temperatura e tempo de germinação da soja alteram o teor de isoflavonas e vitamina C

GUELFY, M. F. G.; HANDA, C. L.; RODRIGUES, D.; SILVA, M. R. B.; IDA, E. I.*

Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 86057-970, Londrina, PR, Brasil. *Autor correspondente. Tel.: +55 43 3371 5971; fax: +55 43 3371 4080, elida@uel.br (E. I. Ida).

RESUMO

O processo de germinação da soja tem sido utilizado para aumentar o teor de alguns constituintes desejáveis e benéficos à saúde humana, como as isoflavonas agliconas e vitamina C. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do fotoperíodo, temperatura e tempo de germinação da soja BRS 257 sobre o teor das diferentes formas de isoflavonas e vitamina C. As sementes de soja foram sanitizadas e submetidas ao processo de germinação utilizando o delineamento experimental 2^3 , cujas variáveis investigadas foram fotoperíodo (h), temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e tempo de germinação (dias) e as funções respostas avaliadas foram as diferentes formas de isoflavonas expressas em $\mu\text{mol/g}$ e teor de vitamina C ($\text{g}/100$). O teor das diferentes formas de isoflavonas foi quantificado por cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) e o teor de vitamina C por método titulométrico. O fotoperíodo, temperatura e tempo de germinação da soja exerceram diferentes efeitos sobre o teor de daidzina, genistina, malonilglicetina, daidzeína e genisteína. As isoflavonas β -glicosídeos (glicetina), acetilglicosídeos (acetildaidizina, acetilglicetina e acetilgenistina) e aglicona (gliciteína) não foram detectadas em todas as condições de germinação. Em relação a soja não germinada, a soja germinada por 5 dias a 35°C e ausência de iluminação, o teor de β -glicosídeos (daidzina e genistina) e malonilglicosídeo (malonilglicetina) diminuiu em 1,8; 3,2 e 5,9 vezes, respectivamente, enquanto que o teor de agliconas (daidzeína e genisteína) aumentou em 2,9 e 6 vezes, respectivamente. O fotoperíodo, temperatura e tempo de germinação e as interações apresentaram efeitos linear positivo e significativo sobre o teor de vitamina C da soja germinada. O teor máximo de vitamina C ocorreu quando a soja foi germinada com iluminação de 24 h/dia de germinação, 35°C e 5 dias de germinação e foi cerca de 10 vezes superior à soja não germinada. Entretanto, quando a soja foi germinada na sem iluminação à 35°C e 5 dias de germinação, ocorreu uma redução de 42% no teor de vitamina C em relação ao com iluminação de 24 h/dia de germinação.

Palavras chaves: Germinação, isoflavonas, vitamina C, fotoperíodo.

1. Introdução

A soja é uma leguminosa muito importante para o agronegócio de vários países. É a única leguminosa que contém elevado teor de isoflavonas e são divididos em quatro grupos e 12 formas químicas distintas denominadas de agliconas (daidzeína, genisteína e gliciteína), β -glicosídeos (daidzina, genistina e glicitina), acetilglicosídeos (6''-O-acetildaidzina, 6''-O-acetilgenistina e 6''-O-acetilglicitina) e malonilglicosídeos (6''-O-malonildaizina, 6''-O-malonilgenistina e 6''-O-malonilglicitina) (LIU, 2004).

Na semente de soja, há predominância de isoflavonas malonilglicosídeos, seguido de β -glicosídeos, sendo que as agliconas e acetilglicosídeos estão ausentes ou em baixa concentração (PAUCAR-MENACHO et al., 2010; ANDRADE et al., 2016). Entretanto, o conteúdo e perfil de isoflavonas na soja pode variar conforme a cultivar e ano de colheita (BERGER et al., 2008; WANG e MURPHY, 1994), localização do plantio (TSUKAMOTO et al., 1995) fatores extrínsecos como as alterações do meio ambiente, teor de água, temperatura e presença de oxigênio (BRITZ; SCHOMBURG; KENWORTHY, 2011; NOGUEIRA; SEDIYAMA, 2013).

Estudos epidemiológicos com humanos ou testes com animais, têm demonstrado que as isoflavonas apresentam importantes atividades biológicas. E estas atividades tem sido associadas à redução da incidência de doenças cardiovasculares em mulheres no período pré-menopausa, de alguns tipos de câncer, da hiperglicemia, do avanço do Alzheimer, dos sintomas da menopausa (NIELSEN; WILLIANSO, 2007; DONG et al., 2013; FILIBERTO et al., 2013; PARK et al., 2013; WADA et al., 2013;) e do combate ao diabetes mellitus tipos 1 e 2. As isoflavonas agliconas (genesteína e daidzeína) tem sido descritas como potenciais inibidores das enzimas digestivas de carboidratos (CHOI et al., 2008; PARK et al., 2013). Portanto, a inserção de produtos de soja na alimentação humana com maior teor de isoflavonas agliconas pode ser benéfica.

O processo de germinação de sementes ocorre naturalmente quando as condições de umidade, temperatura e nutrientes são favoráveis para o seu desenvolvimento (SANGRONIS; MACHADO, 2007; VILAS BOAS; BARCELOS; LIMA, 2002) e são independentes da época e local de cultivo. Na germinação da soja ocorre alterações metabólicas e melhora a sua qualidade nutricional, além de

ser uma tecnologia eficaz e de baixo custo (PAUCAR-MENACHO et al., 2010). As principais alterações na soja germinada, são redução do teor de substâncias indesejáveis como ácido fítico, oligossacarídeos, inibidores de tripsinas (RIBEIRO, IDA; OLIVEIRA, 1999; PAUCAR-MENACHO et al., 2010; RAMADAN, 2012) ou aumento de substâncias desejáveis como as isoflavonas agliconas (RIBEIRO et al., 2007; PAUCAR-MENACHO, et al., 2010; SHI et al., 2010; QUINHONE & IDA (2015), ácido ascórbico, riboflavinas e tiamina (AHMAD e PATHAK, 2000); fitoesteróis e tocoferóis (SHI, NAM e MA, 2010). A germinação de soja por 3 a 7 dias obtêm-se os brotos que são consumidos como fontes vegetais ricos em nutrientes e adequados para o humano (Lee et al., 2007). O processo de germinação é uma prática tradicional de vários países como Japão, Coreia, China cuja população consome os brotos como alimentos saudáveis e funcionais e a sua demanda é crescente em países ocidentais (LEE et al., 2002).

Na germinação, a temperatura exerce grande influência e pode atuar na velocidade de germinação, na absorção de água e reações bioquímicas que regulam o metabolismo envolvido no processo (BEWLEY; BLACK, 1994; CARVALHO; NAKAGAWA, 2000). Além disso, para germinar as várias espécies de sementes, o fotoperíodo ou a iluminação controlada também é um fator muito importante. A sensibilidade das sementes à luz varia de acordo com a qualidade, intensidade luminosa e tempo de iluminação. Tradicionalmente, os brotos de soja são cultivados no escuro e apresentam coloração amarelo brilhante. No entanto, os brotos de soja verde são comercialmente mais aceitos devido à sua cor e sabor agradável (YUAN et al., 2015).

Os vegetais, frutas e alguns fungos são fontes de vitamina C que está associada com a prevenção do estresse oxidativo no processo de fotossíntese durante o crescimento das plantas (GUO et al., 2013). Na germinação da semente de soja, ocorre a ativação das vias de biossíntese do ácido ascórbico e tocoferóis e estes aumentam nos brotos (WANG et al., 2015). O teor de vitamina C após a germinação da soja a 30 °C e exposição à luz UV-B aumentou quando comparado com a ausência de luz (NOCTOR et al., 2012).

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do fotoperíodo, temperatura e tempo de germinação da soja BRS 257 sobre o teor das diferentes formas de isoflavonas e vitamina C utilizando o delineamento experimental 2³.

2. Material e Métodos

2.1. Material e reagentes

As sementes da cultivar de soja BRS 257 da safra 2014/2015 foram utilizadas para germinação e obtidas de uma empresa de sementes da região.

Para cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) foram utilizados os padrões individuais de isoflavonas malonilglicosídeos e acetilglicosídeos (Wako Pure Chemical Industries, Ltd. Osaka, Japão), β -glicosídeos e agliconas (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, EUA). Os demais reagentes foram de grau analítico ou cromatográfico.

2.2. Efeitos das variáveis do processo de germinação da soja sobre o teor de diferentes formas de isoflavonas e vitamina C

Para a germinação da soja BRS 257, foram utilizadas 50 g de semente que foram previamente sanitizadas com solução de 1% de hipoclorito de sódio por 15 min. Após a drenagem e enxague dos grãos, foi realizada a hidratação com água destilada na proporção de 1:2 (g:mL) a 25°C por 6 h. Os grãos hidratados foram colocados em duas bandejas perfuradas (30,3 x 22,1 x 7,5 cm, 3,0L) e os ensaios de germinação foram realizados conforme o delineamento experimental (Tabela1). Foi utilizado uma câmara germinadora (TE-402, TECNAL) com temperatura e fotoperíodo (LED Cool White, 24 Volts x 18 Watts, 1980 lumens/3000 Lux) controlados. Após a realização dos ensaios, as sojas germinadas foram liofilizadas (Liofilizador Christ Alpha 1-2 LD plus), trituradas (Moinho Cadence MDR301) e armazenadas a -22 °C até o uso para análises. Foi determinado o teor de umidade pelo uso de estufa a 105 °C conforme descrito pela AOAC (2012).

Para avaliar os efeitos do fotoperíodo (X_1), temperatura (X_2) e tempo de germinação (X_3) da soja sobre o teor das diferentes formas de isoflavonas e vitamina C foi aplicado o delineamento experimental 2^3 (Tabela1) com três variáveis e dois níveis de variação totalizando 11 ensaios, sendo três ensaios no ponto central. Os ensaios da germinação foram realizados aleatoriamente. As variáveis independentes investigadas foram: X_1 (0, 12 e 24 h de fotoperíodo), X_2 (25, 30 e 35 °C, temperatura de germinação) e X_3 (1, 3 e 5 dias de germinação). As funções respostas avaliadas foram: DAI (μmol de daidzina/g), GLI (μmol de glicitina/g), GEN (μmol de genistina/g), MDAI (μmol de malonildaidzina/g), MGLI (μmol de

malonilglucitina/g), MGEN (μmol de malonilgenistina/g), AcDAI (μmol de acetildaidzina/g), AcGLI (μmol de acetilglucitina/g), AcGEN (μmol de acetilgenistina/g), ADAI (μmol de daidzeína/g), AGLI (μmol de gliciteína/g), AGEN (μmol de genisteína/g) e VITC (g de vitamina C/100g).

As funções respostas foram avaliadas conforme o modelo da equação: $Y_i = \beta_0 + B_j + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3 + e$; onde: Y_i (funções respostas); x_1 , x_2 e x_3 (variáveis codificadas); β (coeficientes estimados para cada termo do modelo de superfície de resposta); β_j (coeficiente estimado do bloco para o modelo de superfície resposta); e ε (erro puro). A partir das funções respostas obtidas (DAI, GLI, GEN, MDAI, MGLI, MGEN, AcDAI, AcGLI, AcGEN, ADI, AGLI, AGEN e VITC) foram realizadas as análises de regressão, análise de variância (ANOVA) e determinado o coeficiente de determinação (R^2). Após avaliar os modelos obtidos quanto a melhor condição de germinação, foram construídos os gráficos de superfície de resposta e de desejabilidade utilizando o programa Statistica 8.0 (StatSoft Inc., Tulsa, EUA). (repetido)

2.3. Determinação do teor de diferentes formas de isoflavonas

As sojas germinadas e não germinadas foram desengorduradas com hexano conforme descrito por Lima e Ida (2014). A extração de isoflavonas foi realizada em triplicata utilizando 0,2 g de amostra desengordurada com 8 mL de uma solução contendo água ultra pura, etanol e acetona (na proporção de 1:1:1;v:v:v) conforme descrito por Yoshiara et al. (2012). O material extraído foi centrifugado (4 °C, 794 × g, 15 min; Eppendorf centrifuge 5804R, Hamburg, Alemanha) e o sobrenadante foi filtrado com membranas hidrofílicas (PVDF com 0,22 μm de tamanho de poro Millex-GV, Millepore, Billerica, MA, USA) e coletados em tubos de ensaio com tampa que foram colocados direto no auto-amostrador do cromatógrafo UPLC® (Acquity UPLC® System, Waters, EUA). As diferentes formas de isoflavonas foram separadas e quantificadas utilizando o UPLC conforme descrito por Handa et al. (2014). A identificação de cada forma química de isoflavona foi realizada por comparação do tempo de retenção e espectro UV dos respectivos padrões. As curvas de calibração foram construídas a partir de soluções padrão de concentração 0,5; 1; 5; 10; 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ de solução para cada forma de isoflavonas. A quantificação do teor de isoflavonas foi realizada por integração das áreas de cada pico com padronização externa (área x concentração) usando os

padrões de referências individuais. As diferentes formas de isoflavonas tem diferentes valores de massa molar e as médias e desvio padrão foram expressos em μmol de isoflavonas g^{-1} de amostra em base seca.

2.4. Determinação do teor de vitamina C

O teor de Vitamina C foi determinado pela redução do corante 2,6-diclorofenol indofenol conforme o método (n. 967.21) descrito pela AOAC (2012). As médias e o desvio padrão do teor de vitamina C foram expressos como mg de ácido ascórbico por 100 g de amostra em base seca.

2.5. Análise estatística

O delineamento experimental 2^3 foi aplicado para avaliar o efeito das variáveis independentes (x_1 , x_2 e x_3) e suas interações sobre as funções respostas. A partir das funções respostas foram obtidos os respectivos modelos e seguido da análise de variância (ANOVA) e regressão utilizando o programa Statistica 8.0 (StatSoft Inc., Tulsa, EUA). Foi determinado o coeficiente de determinação (R^2) para verificar o ajuste do modelo aos dados experimentais. Os gráficos de superfície de resposta e parâmetros de desejabilidade foram gerados a partir dos modelos ajustados de cada função resposta e utilizados para avaliar as melhores condições de germinação da soja. Para comparar as médias entre as funções respostas estimadas e as funções respostas obtidas, foi aplicado o teste t- Student.

3. Resultados e Discussão

3.1. Avaliação dos efeitos do fotoperíodo, temperatura e tempo de germinação da soja sobre o teor das diferentes formas de isoflavonas

Os efeitos das variáveis independentes fotoperíodo (X_1), temperatura (X_2) e tempo de germinação (X_3) sobre as diferentes formas de isoflavonas foram avaliados na soja BRS 257 germinada, cujos ensaios foram realizados utilizando o planejamento fatorial 2^3 (tabela 1). Para a DAI, a variável x_3 (dias de germinação) apresentou efeito linear significativo e negativo. Porém, o efeito linear das variáveis x_1 (fotoperíodo) e x_2 (temperatura) e o efeito das interações x_1x_2 ,

x_1x_3 e x_2x_3 não foram significativos ($p= 0.27$; $p=0.15$; $p= 0.37$; $p= 0.74$ e $p= 0.74$), respectivamente. Entretanto, estas variáveis foram mantidas na equação para melhorar o ajuste do modelo aos dados experimentais. A falta de ajuste do modelo não foi significativa e 90% (R^2) dos dados experimentais foram explicados pelo modelo ($DAI = 0,259 + 0,015x_1 - 0,010x_2 - 0,042x_3 - 0,0025x_1x_2 + 0,0025x_1x_3 + 0,0075x_2x_3$). A superfície de resposta (figura 1) indica que a DAI é mínima ($DAI = 0,20$ μmol de daidzina/g de amostra) quando $x_1 = -1$ ($X_1 = 0$ h de fotoperíodo); $x_2 = 1$ ($X_2 = 35$ °C) e $x_3 = 1$ ($X_3 = 5$ dias de germinação) e esta condição de germinação corresponde ao ensaio 7. No gráfico de desejabilidade (figura 1) observa-se que a DAI não diferiu quando $0,5 < x_3 < 1$ ou 2 dias $< X_3 < 5$ dias de germinação; e x_1 e x_2 não diferiram nos respectivos intervalos investigados, ou seja: $-1 < x_1 < 1$ ou $0 \text{ h} < X_1 < 24$ h de fotoperíodo e $-1 < x_2 < 1$ ou 25 °C $< X_2 < 35$ °C. Estes resultados indicaram que a DAI foi mínima quando a soja foi germinada por 2 ou 5 dias e independente do fotoperíodo entre 0 e 24 h e das temperaturas entre 25 e 35 °C. Uma destas condições de ensaio corresponde ao ensaio 7 ($DAI = 0,21$ μmol de daidzina g^{-1} de amostra), cuja germinação foi realizada sem iluminação (0 h de fotoperíodo), 35 °C e 5 dias de germinação. Observa-se que no modelo estimado DAI_{est} foi igual a 0,20 μmol g^{-1} de amostra, cujo resultado não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) em relação a DAI obtida experimentalmente ($DAI = 0,21$ μmol de daidzina g^{-1} de amostra). Desta forma, confirma-se que o modelo proposto está adequado aos dados experimentais. A DAI da soja germinada nas condições do ensaio 7 reduziu em 1,8 vezes em relação ao teor de daidzina da soja não germinada (Tabela 2). Entretanto, Quinhone Junior & Ida (2015) observaram que o teor de daidzina da soja BRS 284 germinada, com iluminação natural à 35°C por 7 dias, reduziu apenas 1,1 vezes em relação a soja não germinada.

As funções respostas do β -glicosídeos (GLI), acetilglicosídeos (ACDAI, ACGLI, ACGEN) e agliconas (AGLI) não foram detectados em todos os ensaios realizados e portanto, não foram avaliadas. Enquanto que as funções respostas do malonilglicosídeos (MDAI e MGEN) não foram explicadas pelo modelo. A ausência dessas formas de isoflavonas da soja BRS 257 foi observado por Andrade et al. (2016). Segundo Villares et al. (2011) as isoflavonas acetilglicosídeos geralmente estão presentes após tratamento térmico da soja e são provenientes da clivagem do grupo carboxílico dos malonilglicosídeos.

Para a GEN, as variáveis x_3 (dias de germinação) e x_2 (temperatura) apresentaram efeitos linear significativo e negativo. O efeito linear da variável x_1 (fotoperíodo) e o efeito da interação x_2x_3 não foram significativos ($p = 0,09$ e $p = 0,08$), respectivamente. Entretanto, os mesmos foram mantidos na equação para melhorar o ajuste do modelo aos dados experimentais. A falta de ajuste do modelo não foi significativa e 93% (R^2) dos dados experimentais foram explicados pelo modelo ($GEN = 0,229 + 0,014x_1 - 0,025x_2 - 0,061x_3 + 0,015x_2x_3$). A superfície de resposta (figura 2) indica que a GEN é mínima ($GEN = 0,13 \mu\text{mol de genistina g}^{-1}$ de amostra) quando $x_1 = -1$ ou $X_1 = 0$ h de fotoperíodo; $x_2 = 1$ ou $X_2 = 35$ °C e $x_3 = 1$ ou $X_3 = 5$ dias de germinação. Entretanto, no gráfico de desejabilidade (figura 2) observa-se que a GEN não diferiu significativamente quando $-1 < x_1 < 1$ ou $0 \text{ h} < X_1 < 24$ h de fotoperíodo; $-1 < x_2 < 1$ ou 25 °C $< X_2 < 35$ °C e $0,5 < x_3 < 1$ ou 4 dias $< X_3 < 5$ dias de germinação. Estes resultados indicam que a GEN_{est} ($0,14 \mu\text{mol de genistina g}^{-1}$ de amostra) foi mínima quando a soja foi germinada por 4 ou 5 dias, independente do fotoperíodo à 25 ou 35 °C. Uma das condições de ensaio correspondeu ao ensaio 7 ($GEN = 0,14 \mu\text{mol de genistina g}^{-1}$ de amostra), cuja condição de germinação foi sem iluminação (0 h de fotoperíodo) a 35 °C e 5 dias de germinação. Os resultados da GEN e GEN_{est} não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e desta forma, confirma-se que o modelo proposto foi adequado aos dados experimentais. A redução no teor da GEN (ensaio 7) foi de 3,2 vezes em relação ao teor de genistina da soja não germinada (Tabela 2). Kumari e Chang (2016) observaram que a soja germinada sem iluminação, temperatura ambiente de 22°C por 5 dias, o teor de genistina diminuiu 1,6 vezes em relação a soja não germinada.

Para a MGLI, somente a variável x_3 (dias de germinação) apresentou efeito linear significativo e negativo. Porém, o efeito linear da variável x_1 (fotoperíodo) e o efeito das interações x_1x_2 , x_1x_3 e $x_1x_2x_3$ não foram significativos ($p = 0,08$; $p = 0,09$; $p = 0,15$ e $p = 0,26$), respectivamente e os mesmos foram mantidos na equação para melhorar o ajuste do modelo aos dados experimentais. A falta de ajuste do modelo não foi significativa e 91 % (R^2) dos dados experimentais foram explicados pelo modelo ($MGLI = 0,402 + 0,028x_1 - 0,041x_3 + 0,021x_1x_2 + 0,027x_1x_3 + 0,014x_1x_2x_3$). A superfície de resposta (figura 3) indica que a MGLI é mínima ($0,27 \mu\text{mol de malonilglicetina g}^{-1}$ de amostra), quando $x_1 = -1$ ou 0 h de fotoperíodo; $x_2 = 1$ ou 35 °C e $x_3 = 1$ ou 5 dias de germinação. No gráfico de desejabilidade (figura 3)

observa-se que a MGLI foi mínima e não diferiu quando $-1 < x_1 < 0$ ou $0 < X_1 < 12$ h de fotoperíodo; $-1 < x_2 < 1$ ou $25 < X_2 < 35$ °C e $0 < x_3 < 1$ ou $3 \text{ dias} < X_3 < 5$ dias de germinação. Uma das condições de ensaio corresponde ao ensaio 7 (sem iluminação, 35 °C e 5 dias de germinação). Nestas condições de germinação a MGLI foi mínima (0,27 μmol de malonilglicetina g^{-1} de amostra) e não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) com relação a MGLI_{est} pelo modelo (0,27 μmol malonilglicetina g^{-1} de amostra) pelo modelo. Desta forma, confirma-se que o modelo proposto foi adequado aos dados experimentais. A redução no teor da MGLI (ensaio 7) foi de 1,9 vezes em relação ao teor de malonilglicetina da soja não germinada (Tabela 2). Entretanto, a soja quando germinada sem iluminação a 22 °C por 5 dias, segundo Kumari e Chang (2016) proporcionou uma diminuição de apenas 1,4 vezes no teor de malonilglicetina.

Para a ADAI, a variável x_3 (dias de germinação) e a interação x_2x_3 (h de fotoperíodo e temperatura de germinação) apresentaram efeitos linear positivo e significativo, enquanto que as interações x_1x_2 e $x_1x_2x_3$ apresentaram efeitos linear significativo e negativo. Porém, o efeito linear da variável x_2 (temperatura de germinação) não foi significativo ($p = 0,05$) e o mesmo foi mantido na equação para melhorar o ajuste do modelo aos dados experimentais. A falta de ajuste não foi significativa e 93% (R^2) dos dados experimentais foram explicados pelo modelo ($\text{ADAI} = 0,080 + 0,028x_2 + 0,067x_3 - 0,04x_1x_2 + 0,03x_2x_3 - 0,04x_1x_2x_3$). A superfície de resposta (figura 4) indica que a ADAI é máxima (0,29 μmol de daidzeína g^{-1} de amostra) quando $x_1 = -1$ ou 0 h de fotoperíodo; $x_2 = 1$ ou 35 °C e $x_3 = 1$ ou 5 dias de germinação. No gráfico de desejabilidade (figura 4) observa-se que a ADAI não diferiu significativamente quando $-1 < x_1 < -0,5$ ou $0 \text{ h} < X_1 < 6$ h de fotoperíodo; $0,5 < x_2 < 1$ ou $32,5 \text{ °C} < X_2 < 35 \text{ °C}$ e $0,5 < x_3 < 1$ ou $4 \text{ dias} < X_3 < 5$ dias de germinação. Estes resultados indicaram que a ADAI foi máxima quando a soja foi germinada com fotoperíodo entre 0 e 6 h, temperatura entre 32,5 e 35 °C por 4 e 5 dias de germinação. Assim, uma das condições de ensaio correspondeu ao ensaio 7 (sem iluminação, 35°C e 5 dias de germinação) cuja ADAI (0,32 μmol de daidzeína g^{-1} de amostra) não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) em relação a ADAI_{est} pelo modelo (0,29 μmol de daidzeína g^{-1} de amostra). Desta forma, confirma-se que o modelo proposto foi adequado aos dados experimentais. O aumento no teor da ADAI (ensaio 7) foi de 3,2 vezes em relação ao teor de daidzeína da soja não germinada (Tabela 2). Observa-se que na soja não germinada o teor de daidzeína

foi baixo (0,1 μmol de daidzeína g^{-1} de amostra), enquanto que nesta mesma cultivar de soja BRS 257 ou BRS 284 não germinadas, o teor desta aglicona não foram detectados respectivamente por Andrade et al. (2016) e Quinhone Junior e Ida (2015), respectivamente.

Para a AGEN, as variáveis x_3 (dias de germinação) e x_2 (temperatura) apresentaram efeitos linear positivo e significativo enquanto que as interações x_1x_2 (fotoperíodo e temperatura) e $x_1x_2x_3$ apresentaram efeitos linear significativo e negativo. Porém, o efeito linear da variável x_1 e o efeito das interações x_2x_3 e x_1x_3 não foram significativos ($p= 0,05$; $p= 0,05$ e $p= 0,05$), respectivamente e os mesmos foram mantidos na equação para melhorar o ajuste do modelo aos dados experimentais. A falta de ajuste não foi significativa e 93% (R^2) dos dados experimentais foram explicados pelo modelo ($\text{AGEN} = 0,16 - 0,06x_1 + 0,06x_2 + 0,11x_3 - 0,10x_1x_2 - 0,06x_1x_3 - 0,06x_2x_3 - 0,10x_1x_2x_3$). A superfície de resposta (figura 5) indica que a AGEN é máxima (0,71 μmol de genisteína g^{-1} de amostra) quando $x_1 = -1$ ou sem iluminação, $x_2 = 1$ ou 35 °C e $x_3 = 1$ ou 5 dias de germinação. Esta condição de germinação correspondeu ao ensaio 7, cuja AGEN é igual a 0,74 μmol de genisteína g^{-1} de amostra. No gráfico de desejabilidade (figura 5) observa-se que não houve diferença significativa quando $-1 < x_1 < -0,5$ ou $0 \text{ h} < X_1 < 6 \text{ h}$ de fotoperíodo; $0,5 < x_2 < 1$ ou $32,5^\circ\text{C} < X_2 < 35^\circ\text{C}$ e $0,5 < x_3 < 1$ ou $4 \text{ dias} < X_3 < 5 \text{ dias}$ de germinação. Estes resultados confirmaram que a AGEN foi máxima na soja germinada com fotoperíodo entre 0 e 6 h, temperatura entre 32,5 e 35 °C e entre 4 e 5 dias de germinação. Assim, uma das condições de ensaio corresponde ao ensaio 7 (sem iluminação, 35°C e 5 dias de germinação) cuja AGEN (0,74 μmol de genisteína g^{-1} de amostra) não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) em relação a AGEN_{est} pelo modelo (0,71 μmol de genisteína g^{-1} de amostra). Desta forma, confirma-se que o modelo proposto foi adequado aos dados experimentais. O aumento no teor da AGEN (ensaio 7) foi de 6 vezes em relação ao teor de genisteína da soja não germinada (Tabela 2). Quinhone Junior e Ida (2015) também observaram que na soja germinada, a partir do quinto dia sob luz natural a 35 °C, ocorreu um aumento no teor das isoflavonas agliconas (daidzeína e genisteína). Kim et al. (2006) verificaram que as formas de isoflavonas agliconas não foram detectadas nos grãos de soja, enquanto que com 5 dias de germinação, as sojas germinadas com iluminação (brotos verdes) e germinadas sem iluminação (brotos amarelos), o teor de agliconas representou 10% e 17,8% do total de isoflavonas,

respectivamente. O efeito do fotoperíodo na germinação da soja pode ser observada no ensaio 5 (0 h de fotoperíodo, 25 °C e 5 dias de germinação) e ensaio 6 (24 h de fotoperíodo, 25 °C e 5 dias de germinação) com aumento da AGEN em aproximadamente 3 vezes quando utilizou-se o fotoperíodo de 24 h de germinação. Na temperatura de germinação da soja a 25 °C e 5 dias, Kim et al. (2006) e Shi et al. (2010) também observaram que a iluminação proporcionou maior teor de agliconas. Shi et al. (2010) observaram que o teor das agliconas daidzeína e genisteína da soja germinadas por 7 dias com iluminação, aumentou 6,6 e 4,0 vezes, respectivamente, enquanto que nas sojas germinadas sem iluminação, o aumento foi de 4,9 e 2,3 vezes, respectivamente. As diferenças de resultados na germinação da soja BRS 257 e os dados encontrados na literatura com relação ao efeito da presença ou ausência de iluminação para obter maior teor de agliconas pode ser explicado pelo modelo proposto. Neste modelo, a interação entre o fotoperíodo (x_1) e temperatura (x_2) foi significativa e negativa e portanto, o modelo indicou que para obter maior teor de agliconas na soja germinada com iluminação, recomenda-se utilizar uma temperatura menor (25 °C) e sem iluminação deve-se utilizar uma temperatura maior (35 °C).

3.2. Avaliação dos efeitos das variáveis do processo de germinação da soja sobre o teor de vitamina C

Os efeitos das variáveis independentes fotoperíodo (X_1), temperatura (X_2) e tempo de germinação (X_3) sobre o teor de vitamina C foram avaliados na soja BRS 257 germinada, cujos ensaios foram realizados utilizando o planejamento fatorial 2^3 (tabela 1). Para a VITC, as variáveis x_1 , x_2 e x_3 e as interações x_1x_2 e x_1x_3 apresentaram efeito linear positivo e significativo. A falta de ajuste não foi significativa e 99% (R^2) dos dados experimentais foram explicados pelo modelo ($VITC = 101,84 + 37,7x_1 + 18,19x_2 + 56,59x_3 + 17,51x_1x_3 + 18,53x_2x_3$). Na superfície de resposta (figura 6) observa-se que o teor da vitamina C é máximo (247,34 mg de vitamina C / 100g de soja germinada) quando $x_1 = 1$ ou 24 h de fotoperíodo; $x_2 = 1$ ou 35 °C e $x_3 = 1$ ou 5 dias de germinação. Ou seja, as condições das três variáveis ocorreram no maior nível, que correspondeu ao ensaio 8. No gráfico de desejabilidade (figura 6) observa-se que a VITC também foi máxima, somente na condição do maior nível de cada variável, ou seja, com $X_1 = 24$ h de

fotoperíodo, $X_2= 35\text{ }^\circ\text{C}$ e $X_3= 5$ dias de germinação. Assim, uma das condições de ensaio correspondeu ao ensaio 8 (24 h de fotoperíodo, 35°C e 5 dias de germinação) e o teor de VITC (247,34 mg de vitamina C/100g de amostra) não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) em relação a VITC_{est} pelo modelo (250,35 mg de vitamina C/100g de amostra). Desta forma, confirma-se que o modelo proposto foi adequado aos dados experimentais. O aumento no teor da VITC (ensaio 8) foi de 9,6 vezes em relação ao teor de vitamina C (25,74 mg/100 g de amostra) da soja não germinada (Tabela 2). Destaca-se que para obter uma soja germinada com elevado teor de vitamina C por 5 dias a $35\text{ }^\circ\text{C}$ foi necessário um fotoperíodo de 24 h. Entretanto, observa-se que no ensaio 7, a soja foi germinada por 5 dias a $35\text{ }^\circ\text{C}$ e sem iluminação, houve uma redução de 42% no teor de vitamina C (103,34 mg/100 g de amostra). O efeito do fotoperíodo no processo de germinação da soja por 5 dias a $25\text{ }^\circ\text{C}$ e sem iluminação (ensaio 5) e com fotoperíodo de 24 h (ensaio 6), também pode ser observada. Verifica-se que a falta de iluminação na germinação da soja reduziu o teor de vitamina C em 55%. Wang et al. (2015) observaram que durante o processo de germinação da soja a $20\text{ }^\circ\text{C}$ e sem iluminação por 5 dias de germinação, o teor de vitamina C aumentou 7 vezes em relação ao teor de vitamina C da soja germinada no primeiro dia. Entretanto, Guo et al. (2012), observaram um aumento de 24 vezes no teor de vitamina C no feijão (*Vigna radiata*) após 8 dias de germinação a $20\text{ }^\circ\text{C}$ sem iluminação em relação à concentração inicial. Entretanto, Jiao et al. (2016) observaram que a presença de luz UV-B a $30\text{ }^\circ\text{C}$ durante a germinação da soja, potencializou o aumento no teor de vitamina C quando comparada com a ausência de luz. O aumento no teor de vitamina C na planta pode ser devido ao estresse ocasionado pela exposição à luz UV-B que aumenta a geração de espécies reativas ao oxigênio (ERO) que ocasiona os danos oxidativos na planta e regula a produção de antioxidantes como a vitamina C que neutraliza os efeitos de ERO (NOCTOR et al., 2012).

4 Conclusão

O fotoperíodo, temperatura e tempo de germinação da soja BRS 257 exerceram diferentes efeitos no teor de daidzina, genestina, malonilglicitina, daidzeína e genesteína.

As isoflavonas β -glicosídeos (glicitina), acetilglicosídeos (acetildaidizina, acetilglicitina e acetilgenestina) e aglicona (gliciteína) não foram detectadas em todas ensaios de germinação.

A soja germinada por 5 dias a 35°C e sem iluminação, apresentou diminuição no teor de β -glicosídeos (daidzina e genistina) e malonilglicosídeo (malonilglicitina) de 1,8; 3,2 e 1,9 vezes, respectivamente e aumento no teor de agliconas (daidzeína e genisteína) de 3,2 e 6 vezes, respectivamente, em relação a soja não germinada.

O fotoperíodo, temperatura e tempo de germinação e as interações apresentaram efeitos linear positivo e significativo no teor de vitamina C da soja germinada.

O teor máximo de vitamina C ocorreu quando a soja foi germinada com fotoperíodo de 24 h, 35°C e 5 dias de germinação e foi 9,6 vezes superior à soja não germinada. Entretanto, quando a soja foi germinada sem iluminação à 35°C e 5 dias de germinação, ocorreu uma redução de 42% no teor de vitamina C em relação ao fotoperíodo de 24 h.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi parcialmente financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. MFGG agradece a Fundação CAPES/MEC pela Bolsa de Estudo do Mestrado e EII pela Bolsa Produtividade do CNPq.

REFERENCIAS

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

ANDRADE, J. C.; MANDARINO, J. M. G.; KUROZAWA, L. E.; IDA, E. I. The effect of thermal treatment of whole soybean flour on the conversion of isoflavones and inactivation of trypsin inhibitors. **Food chemistry**, 194, 1095-1101, 2016.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis (19th ed.). Arlington, VA: Association of Official Analytical Chemists. 2012.

BERGER, M.; RASOLOHERY, C. A.; CAZALIS, R.; DAYDÉ, J. Isoflavone accumulation kinetics in soybean seed cotyledons and hypocotyls: distinct pathways and genetic controls. **Crops Science**, v. 48, p. 700-708, 2008.

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

BRITZ, S. J. SCHOMBURG, C. J.; KENWORTHY, W. J. Isoflavones in seeds of field-grown soybean: variation among genetic lines and environmental effects. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 88, p. 827-832, 2011.

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

CHOI, M. S.; JUNG, U. J.; YEO, J.; KIM, M. J.; LEE, M. K. Genistein and daidzein prevent diabetes onset by elevating insulin level and altering hepatic gluconeogenic and lipogenic enzyme activities in non-obese diabetic (NOD) mice. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 24, p. 74–81, 2008.

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

FILIBERTO, A. C.; MUMFORD, S. L.; POLLACK, A. Z.; ZHANG, C.; YEUNG, E. H.; PERKINS, N. J.; WACTAWSKI-WENDE, J.; SCHISTERMAN, E. F. Habitual dietary isoflavone intake is associated with decreased C-reactive protein concentrations among healthy premenopausal women. **The Journal of Nutrition**, v. 143, p. 900–906, 2013.

GUO, X., LI, T., TANG, K., & LIU, R. H. Effect of germination on phytochemical profiles and antioxidant activity of mung bean sprouts (*Vigna radiata*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 60(44), 11050-11055, 2012.

GUO, X., LIU, R. H., FU, X., SUN, X., & TANG, K. Over-expression of l-galactono- γ -lactone dehydrogenase increases vitamin C, total phenolics and antioxidant activity in lettuce through bio-fortification. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, 114(2), 225-236, 2013.

HANDA, C. L.; COUTO, U. R.; VICENSOTI, A. H.; GEORGETTI, S. R.; IDA, E. I. Optimisation of soy flour fermentation parameters to produce β -glucosidase for bioconversion into aglycones. **Food chemistry**, 152, 56-65, 2014.

JIAO, C.; YANG, R.; ZHOU, Y.; GU, Z. Nitric oxide mediates isoflavone accumulation and the antioxidant system enhancement in soybean sprouts. **Food Chemistry**, 204, 373-380, 2016.

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

KIM E, KIM S, CHUNG J, CHI H, KIM J, CHUNG I. Analysis of phenolic compounds and isoflavones in soybean seeds (*Glycine max* (L.) Merrill) and sprouts grown under different conditions. **European Food Research Technology**, 222:201–8, 2006.

KUMARI, S.; CHANG, S. K. C. Effect of Cooking on Isoflavones, Phenolic Acids, and Antioxidant Activity in Sprouts of Prosoy Soybean (*Glycine max*). **Journal of Food Science**, v. 81, n. 7, p. C1679-C1691, 2016.

LEE, J. D.; HWANG, Y. H.; CHO, H. Y.; KIM, D. U.; CHUNG, M. G. Comparison of characteristics related with soybean sprouts between *Glycine max* and *G. Soja*. **Korean Journal of Crop Science**, v.47, p.189-198, 2002.

LEE, S. J.; AHN, J. K.; KHANH, T. D.; CHUN, S. C.; KIM, S. L.; RO, H. M.; SONG, H. K.; CHUNG, I. M. Comparison of isoflavone concentrations in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) sprouts grown under two different light conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 55, n. 23, p. 9415-9421, 2007.

DE LIMA, F. S., & IDA, E. I. Optimisation of soybean hydrothermal treatment for the conversion of β -glucoside isoflavones to aglycones. **LWT-Food science and Technology**, 56(2), 232-239, 2014.

LIU, K. Soybeans as a powerhouse of nutrients and phytochemicals. In: LIU, K. **Soybeans as Functional Foods and Ingredients**, Illinois: AOCS Press, cap. 1, 2004.

NIELSEN, I. L. F.; WILLIANSO, G. Review of the factors affecting bioavailability of soy isoflavones in humans. **Nutrition and Cancer-an International Journal**, 57(1), 1–10. 2007.

NOCTOR, G., MHAMDI, A., CHAOUCH, S., HAN, Y. I., NEUKERMANS, J., MARQUEZ - GARCIA, B. E. L. E. N.; FOYER, C. H. Glutathione in plants: an integrated overview . **Plant, Cell & Environment**, 35(2), 454-484, 2012.

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

PARK, M.-H.; JU, J.-W.; PARK, M.-J.; HAN, J.-S. Daidzein inhibits carbohydrate digestive enzymes in vitro and alleviates postprandial hyperglycemia in diabetic mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 712, p. 48–52, 2013.

PAUCAR-MENACHO, L. M.; BERHOW, M. A.; MANDARINO, J. M. G.; CHANG, Y. K.; MEJIA, E. G. de. Effect of time and temperature on bioactive compounds in germinated Brazilian soybean cultivar BRS 258. **Food Research International**, v.43, n 7, p. 1856-1865, 2010.

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

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

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

RANDHIR, R., LIN, Y. T., & SHETTY, K. Phenolics, their antioxidant and antimicrobial activity in dark germinated fenugreek sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors. **Asia Pacific journal of clinical nutrition**, 13(3), 295-307, 2004.

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

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

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

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

TSUKAMOTO, C.; SHIMADA, S.; IGITA, K.; KUDOU, S.; KOKUBUN, M.; OKUBO, K.; KITAMURA, K. Factors affecting isoflavone content in soybean seeds: changes in isoflavones, saponins, and composition of fatty acids at different temperatures during seed development. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.43, n.5, p.1184-1192, 1995.

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

VILLARES, A.; ROSTAGNO, M. A.; GARCÍA-LAFUENTE, A.; GUILLAMÓN, E.; MARTÍNEZ, J. A. Content and profile of isoflavones in soy-based foods as a function of the production process. **Food and Bioprocess Technology**, 4(1), 27-38, 2011.

YOSHIARA, L. Y.; MADEIRA, T. B.; DELAROZA, F.; SILVA, J. B.; IDA, E. I. Optimization of soy isoflavone extraction with different solvents using the simplex centroid mixture design. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 9, p. 978–986, 2012.

YUAN, M.; JIA, X.; DING, C.; ZENG, H.; DU L.; YUAN, S.; LIU, J. Effect of fluorescence light on phenolic compounds and antioxidant activities of soybeans (*Glycine max* L. Merrill) during germination. **Food Science and Biotechnology**, 24(5), 1859-1865, 2015.

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

WANG, H.J.; MURPHY, P.A. Isoflavone content in commercial soybean foods. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 42, p. 1666-1673, 1994.

WANG, L., WANG, H., LAI, Q., LI, T., FU, X., GUO, X., & LIU, R. H. The dynamic changes of ascorbic acid, tocopherols and antioxidant activity during germination of soya bean (*Glycine max*). **International Journal of Food Science and Technology**, 50(11), 2367-2374, 2015.

Tabela 1- Delineamento experimental 2³ do processo de germinação da soja BRS 257 e funções repostas.

Variáveis Originais e Codificadas				Funções repostas (µmol/g) em base seca							
Ensaio	x ₁ (X ₁ , h)	x ₂ (X ₂ °C)	x ₃ (X ₃ Dias)	β-Glicosídeos		Malonilglicosídeos			Agliconas		VITC (mg/100g)
				DAI	GEN	MDAI	MGLI	MGEN	ADAI	AGEN	
1	-1(0)	-1(25)	-1(1)	0,31 ± 0,00	0,31 ± 0,02	1,09 ± 0,03	0,43 ± 0,03	1,73 ± 0,09	0,00 ± 0,00	0,08 ± 0,00	25,83 ± 0,00
2	1(24)	-1(25)	-1(1)	0,33 ± 0,00	0,36 ± 0,00	1,05 ± 0,01	0,42 ± 0,00	1,68 ± 0,02	0,04 ± 0,02	0,07 ± 0,00	25,72 ± 0,00
3	-1(0)	1(35)	-1(1)	0,27 ± 0,01	0,25 ± 0,01	1,04 ± 0,01	0,44 ± 0,01	1,83 ± 0,06	0,00 ± 0,00	0,07 ± 0,01	25,82 ± 0,00
4	1(24)	1(35)	-1(1)	0,30 ± 0,00	0,26 ± 0,00	1,26 ± 0,00	0,46 ± 0,01	2,00 ± 0,02	0,03 ± 0,00	0,09 ± 0,00	102,67 ± 0,00
5	-1(0)	-1(25)	1(5)	0,20 ± 0,01	0,18 ± 0,00	1,28 ± 0,00	0,33 ± 0,04	1,79 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,09 ± 0,01	100,58 ± 0,00
6	1(24)	-1(25)	1(5)	0,25 ± 0,01	0,19 ± 0,01	1,72 ± 0,01	0,37 ± 0,00	2,09 ± 0,01	0,16 ± 0,00	0,25 ± 0,00	181,48 ± 0,00
7	-1(0)	1(35)	1(5)	0,21 ± 0,01	0,14 ± 0,00	1,32 ± 0,01	0,27 ± 0,04	1,64 ± 0,01	0,32 ± 0,01	0,74 ± 0,00	103,34 ± 0,00
8	1(24)	1(35)	1(5)	0,23 ± 0,01	0,19 ± 0,01	1,54 ± 0,01	0,45 ± 0,05	1,93 ± 0,01	0,11 ± 0,02	0,11 ± 0,00	247,34 ± 0,00
9	0(12)	0(30)	0(3)	0,27 ± 0,01	0,23 ± 0,01	1,54 ± 0,0	0,44 ± 0,04	2,01 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00	100,69 ± 0,00
10	0(12)	0(30)	0(3)	0,24 ± 0,01	0,2 ± 0,00	1,42 ± 0,03	0,42 ± 0,03	1,96 ± 0,07	0,08 ± 0,01	0,12 ± 0,01	103,58 ± 0,00
11	0(12)	0(30)	0(3)	0,23 ± 0,00	0,21 ± 0,01	1,27 ± 0,03	0,39 ± 0,03	1,83 ± 0,04	0,07 ± 0,00	0,11 ± 0,00	103,21 ± 0,00

Variáveis: X₁ (Fotoperíodo), X₂ (Temperatura) e X₃ (Tempo). Funções repostas: DAI (daidzina), GEN (genistina); MGLI (malonilglicetina), MDAI (malonildaidzina), MGEN (malonilgenistina); AcDAI (acetildaidzina), AcGLI (acetilglicetina), AcGEN (acetilgenistina); ADAI (daidzeína), AGLI (gliciteína), AGEN (genisteína) e VITC (vitamina C). As funções resposta MDAI e MGEN não foram explicadas pelo modelo. As funções resposta GLI, AGLI, AcDAI, AcGLI e AcGEN não foram detectadas em todos os ensaios.

Tabela 2- Teor de diferentes formas de isoflavonas e de vitamina C da soja.

Forma da Isoflavona	$\mu\text{mol/g}$ de amostra em base seca
β -Glicosídeos	
Daidzina	$0,39 \pm 0,02$
Glicitina	Nd
Genistina	$0,45 \pm 0,01$
Malonilglicosídeos	
Malonildaidzina	$1,05 \pm 0,04$
Malonilglicitina	$0,51 \pm 0,02$
Malonilgenistina	$1,64 \pm 0,00$
Agliconas	
Daidzeína	$0,1 \pm 0,01$
Gliciteína	Nd
Genisteína	$0,12 \pm 0,01$
Vitamina C (mg/100g de amostra)	$25,74 \pm 0,00$
Nd (não detectado).	

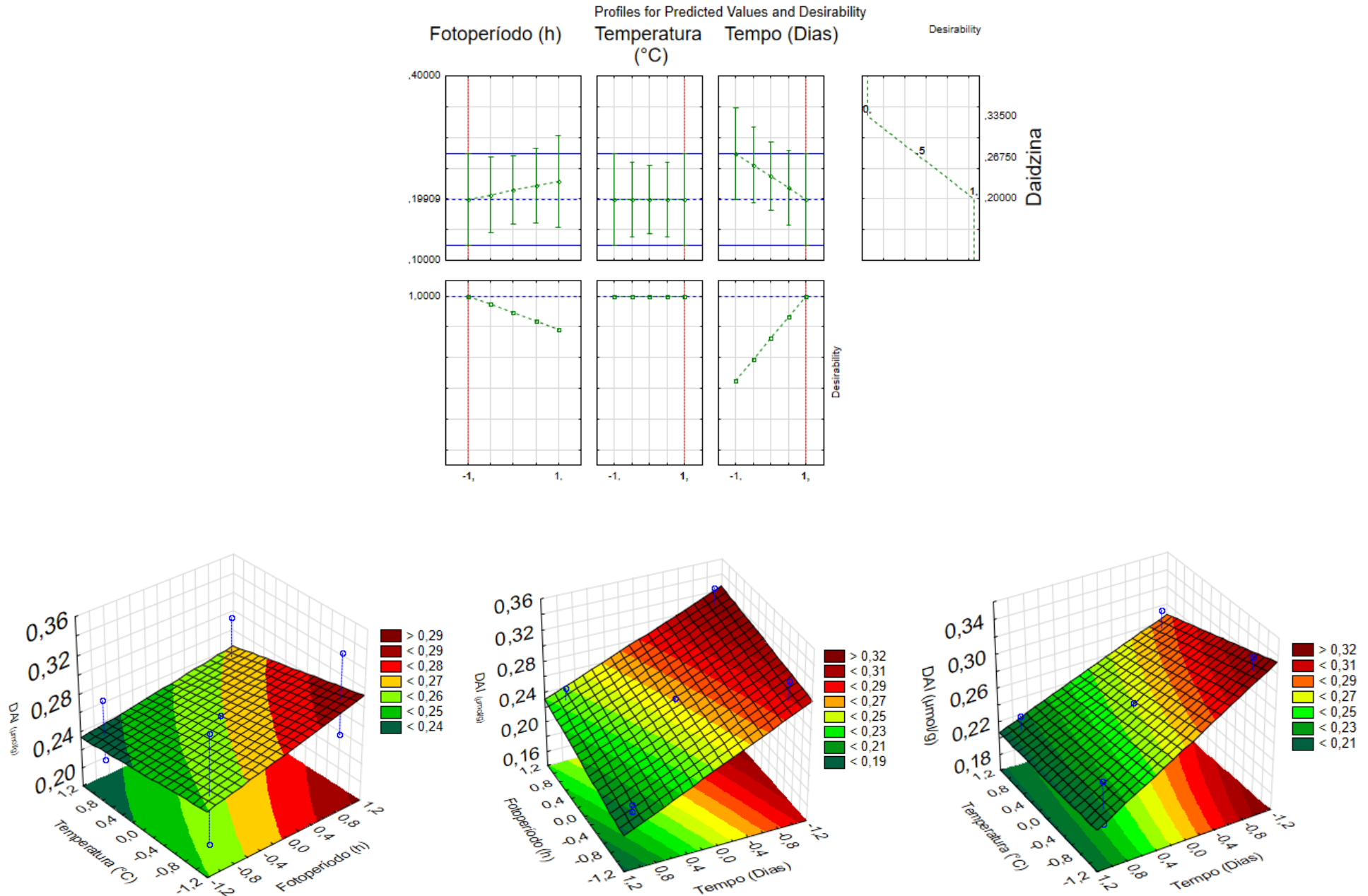


Figura 1 - Perfil de desejabilidade e superfície de resposta para Daidzina, sendo x_1 = Fotoperíodo (h), x_2 = Temperatura (°C) e x_3 = Tempo (Dias).

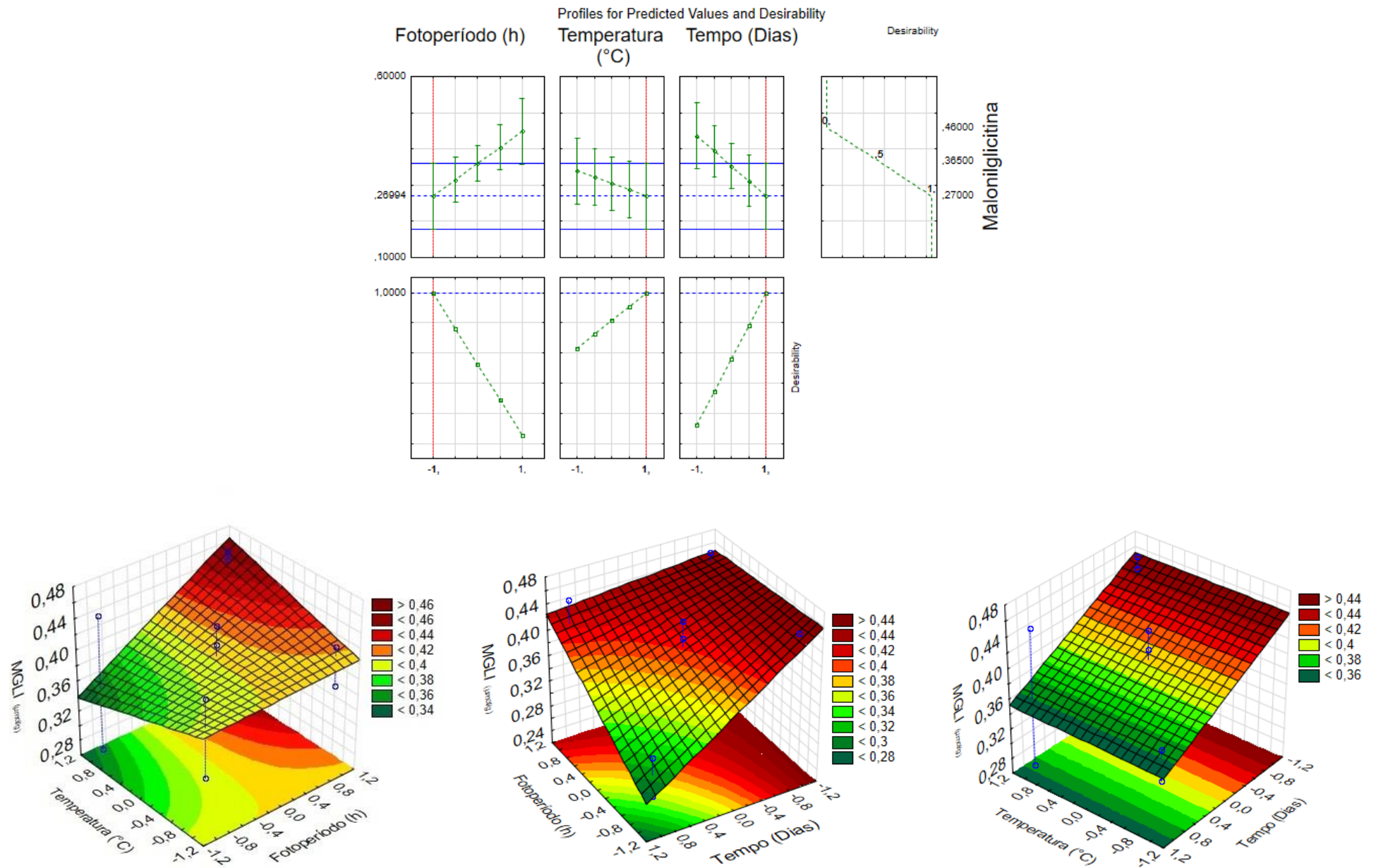


Figura 3 - Perfil de deseabilidade e superfície de resposta para Malonilgicitina, sendo x_1 = Fotorperíodo (h), x_2 = Temperatura (°C) e x_3 = Tempo (Dias).

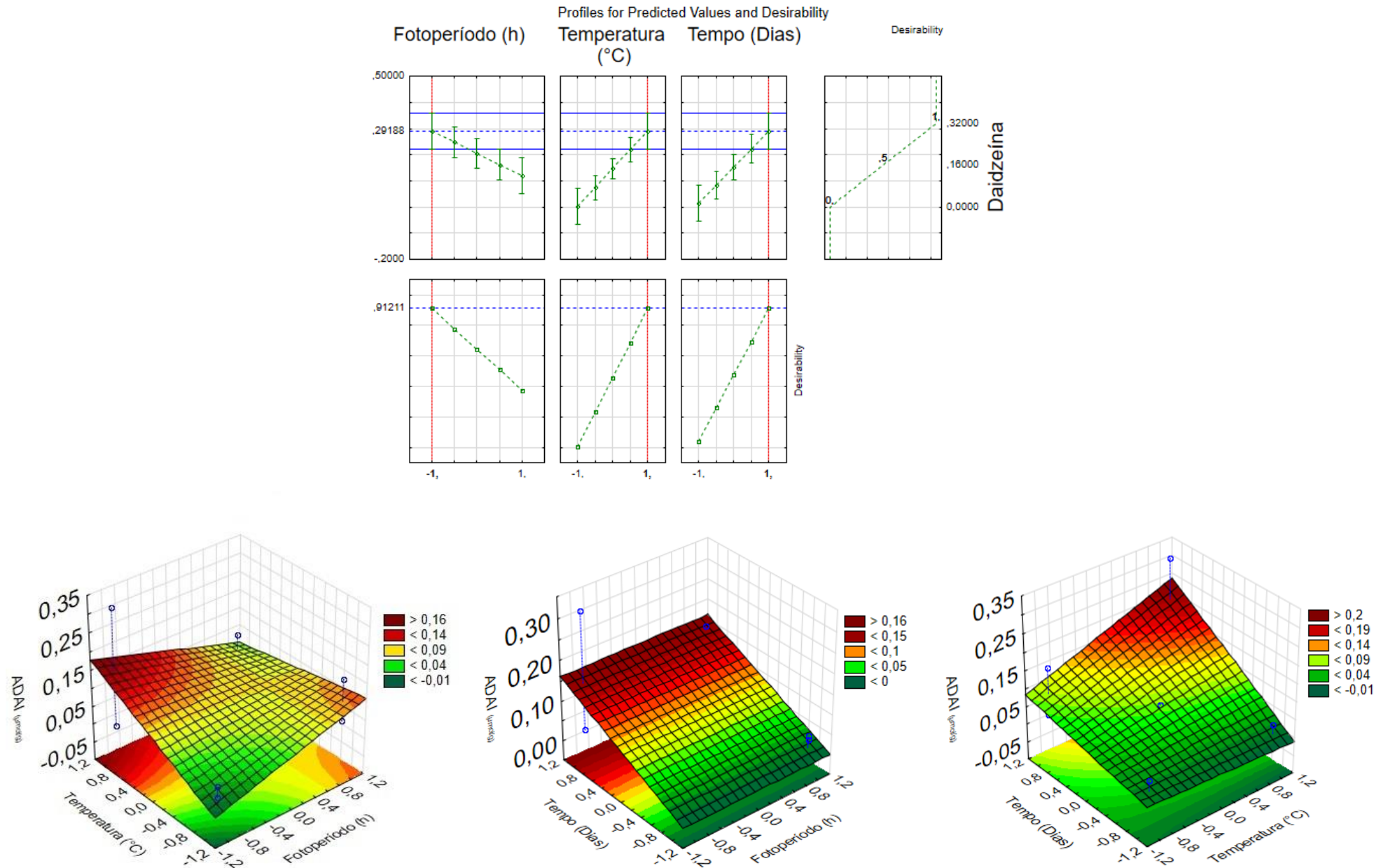


Figura 4 - Perfil de deseabilidade e superfície de resposta para Daidzeína, sendo x_1 = Fotorperíodo (h), x_2 = Temperatura (°C) e x_3 = Tempo (Dias).

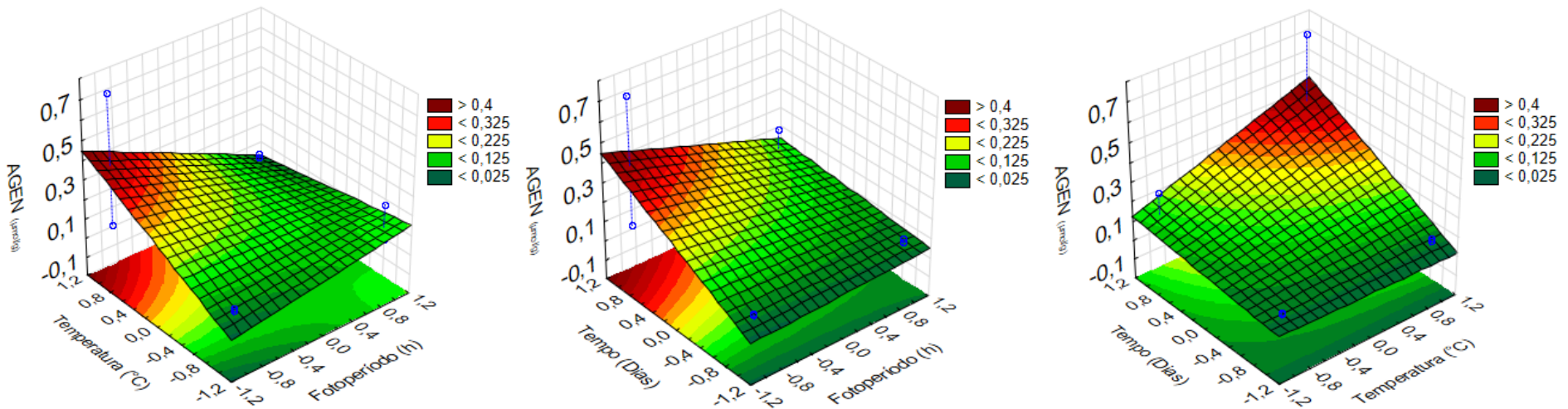
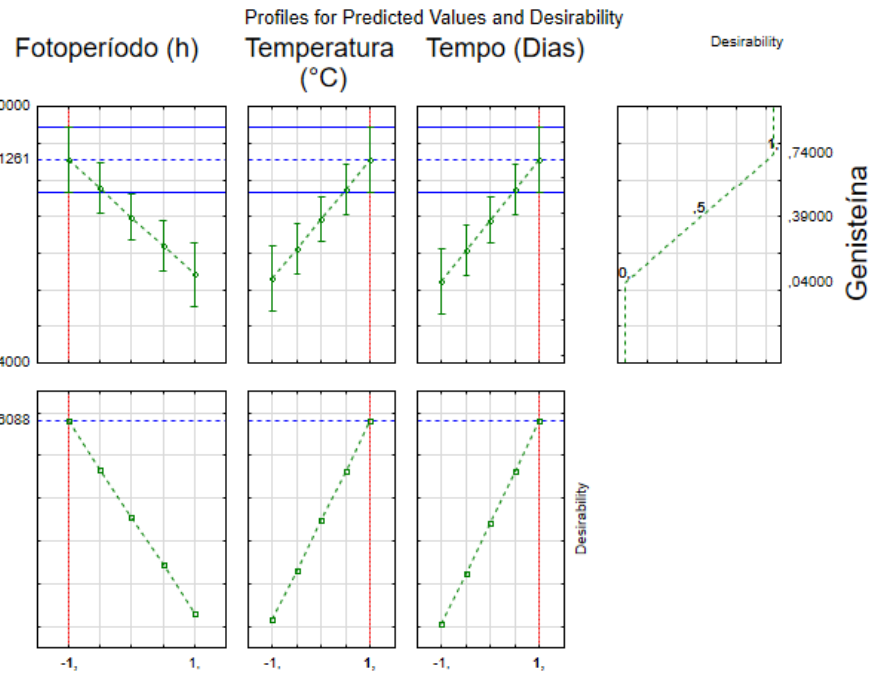


Figura 5 - Perfil de desejabilidade e superfície de resposta para Genisteína, sendo x_1 = Fotorperíodo (h), x_2 = Temperatura (°C) e x_3 = Tempo (Dias).

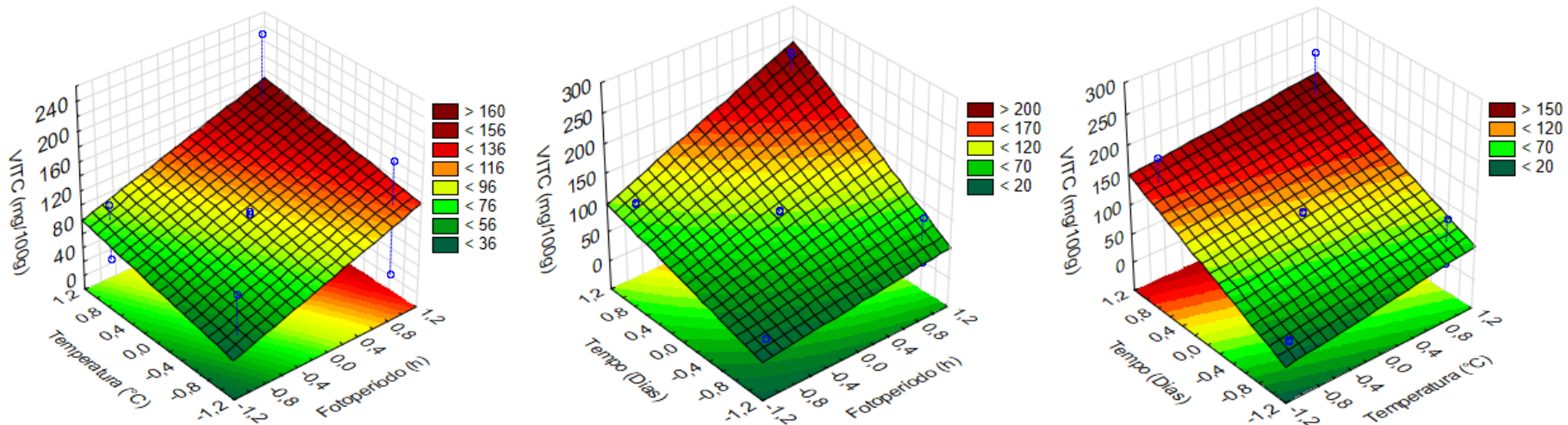
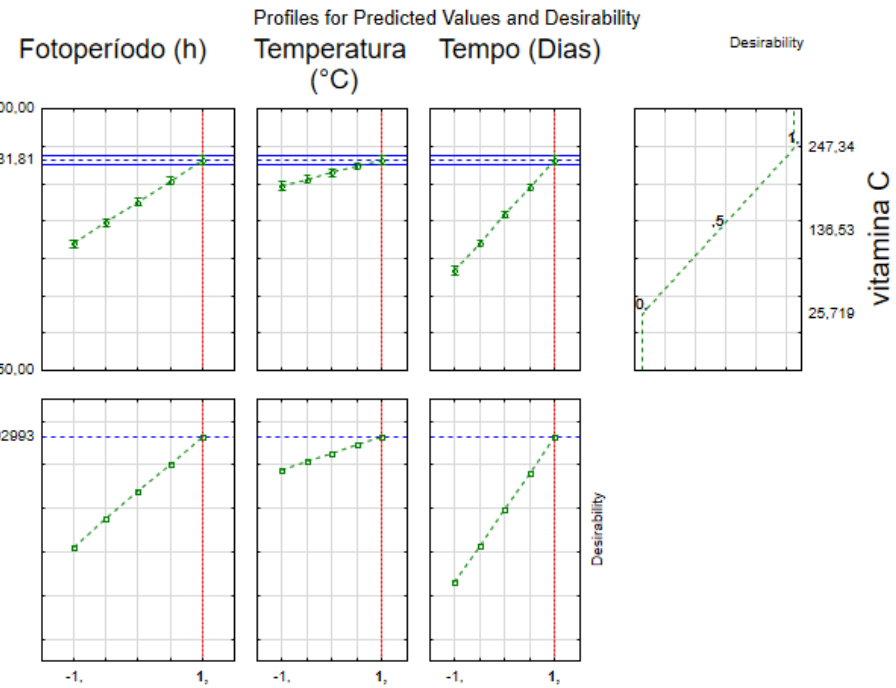


Figura 6 - Perfil de deseabilidade e superfície de resposta para vitamina C, sendo x_1 = Fotorperíodo (h), x_2 = Temperatura (°C) e x_3 = Tempo (Dias).

6 CONCLUSÃO

O fotoperíodo, temperatura e tempo de germinação da soja BRS 257 exerceram diferentes efeitos sobre o teor de daidzina, genistina, malonilglicitina, daidzeína e genisteína.

As isoflavonas β -glicosídeos (glicitina), acetilglicosídeos (acetildaidizina, acetilglicitina e acetilgenistina) e aglicona (gliciteína) não foram detectadas em todas as condições de germinação.

Em relação a soja não germinada, a soja germinada por 5 dias a 35°C e sem iluminação, o teor de β -glicosídeos (daidzina e genistina) e malonilglicosídeo (malonilglicitina) diminuiu em 1,8; 3,2 e 1,9 vezes, respectivamente, enquanto que o teor de agliconas (daidzeína e genisteína) aumentou em 3,2 e 6 vezes, respectivamente.

O fotoperíodo, temperatura e tempo de germinação e as interações apresentaram efeitos linear positivo e significativo sobre o teor de vitamina C da soja germinada.

O teor máximo de vitamina C ocorreu quando a soja foi germinada com fotoperíodo de 24 h, 35°C e 5 dias de germinação e foi 9,6 vezes superior a soja não germinada. Entretanto, quando a soja foi germinada sem iluminação à 35°C e 5 dias de germinação, ocorreu uma redução de 42% no teor de vitamina C em relação ao com iluminação de 24 h/dia de germinação.