



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

ALÉCIO QUINHONE JÚNIOR

**PARÂMETROS FÍSICOS E EFEITO DO TEMPO DE  
GERMINAÇÃO SOBRE O TEOR E FORMA DE  
ISOFLAVONAS DA SOJA GERMINADA**

ALÉCIO QUINHONE JÚNIOR

**PARÂMETROS FÍSICOS E EFEITO DO TEMPO DE  
GERMINAÇÃO SOBRE O TEOR E FORMA DE  
ISOFLAVONAS DA SOJA GERMINADA**

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

Orientador: Profa. Dra. Elza Louko Ida

Londrina  
2014

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

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

Q7p	<p>Quinhone Júnior, Alécio. Parâmetros físicos e efeito do tempo de germinação sobre o teor e forma de isoflavonas da soja germinada / Alécio Quinhone Júnior. – Londrina, 2014. 87 f. : il.</p> <p>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, 2014. Inclui bibliografia.</p> <p>1. Soja – Compostos orgânicos – Teses. 2. Soja – Produtos – Teses. 3. Sementes – Viabilidade – Teses. 4. Isoflavonas – Teses. 5. Soja – Brotos (Plantas) – Germinação – Teses. I. Ida, Elza louko. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. III. Título.</p> <p>CDU 664.6/.7</p>
-----	--

ALÉCIO QUINHONE JÚNIOR

**PARÂMETROS FÍSICOS E EFEITO DO TEMPO DE GERMINAÇÃO  
SOBRE O TEOR E FORMA DE ISOFLAVONAS DA SOJA  
GERMINADA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, nível Mestrado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.  
Orientador: Profa. Dra. Elza louko Ida

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Elza louko Ida  
UEL – Londrina – PR

---

Prof. Dr. Marcelo Alvares de Oliveira  
Embrapa/CNP soja – Londrina – PR

---

Prof. Louise Emy Kurozawa  
UEL – Londrina – PR

Londrina, 21 de março de 2014.

Dedico

*À Deus,  
por ter me dado forças para conduzir a  
conclusão do Mestrado. Aos meus pais Alécio  
Quinhone e Odila Vicente Quinhone e à minha  
noiva Ana Maria Liasch da Silva, por estarem  
sempre ao meu lado me incentivando e me  
compreendendo.*

## **AGRADECIMENTOS**

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Elza Louko Ida, pela orientação, apoio, respeito, incentivo, compreensão e valiosos ensinamentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/ CNPq pela concessão da Bolsa de Estudos de Mestrado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina pela oportunidade da realização do Mestrado

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, pela contribuição na minha formação acadêmica, profissional e pessoal, em especial aos professores Doutores Elizabeth Strapasson e Fábio Yamashita e Pós-Doutoranda Josemeyre Bonifácio da Silva, pela contribuição e acompanhamento durante a elaboração desta Dissertação.

À SL Alimentos pelo fornecimento das sementes BRS 284.

A todos os amigos que direta ou indiretamente me ajudaram na condução da minha Dissertação de Mestrado, em especial ao Fernando Sanches de Lima, Cíntia Ladeira Handa, Uenifer Couto e Aline Heloisa Vicensoti, por sempre estarem por perto me ajudando na condução dos experimentos.

QUINHONE JÚNIOR, Alécio. **Parâmetros físicos e efeito do tempo de germinação sobre o teor e forma de isoflavonas da soja germinada**. 2014. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

## RESUMO

A soja é a leguminosa mais plantada no mundo e contém elevado teor de isoflavonas. Estes compostos têm despertado interesse na indústria farmacêutica e de alimentos devido à associação com os benefícios à saúde humana. As isoflavonas da soja ocorrem como agliconas,  $\beta$ -glicosídeos, malonilglicosídeos e acetilglicosídeos, sendo que as agliconas apresentam maior atividade biológica. O tempo de germinação pode exercer diferentes efeitos conforme os componentes do broto de soja e as formas de isoflavonas. O objetivo deste trabalho foi avaliar os parâmetros físicos e efeito do tempo de germinação sobre o teor e forma de isoflavonas da soja BRS 284 germinada. O experimento foi conduzido utilizando o delineamento de blocos casualizados. As sementes de soja foram germinadas em rolos de papel de germinação a 35 °C, 100 % de umidade relativa e com luz natural por até 168 h. Os brotos de soja foram coletados a cada 24 h e avaliados quanto aos parâmetros físicos de comprimento, umidade, massa de 100 brotos, matéria seca de 100 brotos, rendimento e teor de isoflavonas. Em seguida, os componentes cotilédones, radícula e hipocótilo dos brotos foram separados e avaliados quanto ao teor de isoflavonas e os dados obtidos foram submetidos à análise de regressão. A semente de soja apresentou 89,9 % de cotilédones, 2,4 % de eixo embrionário e 7,7 % de casca, sendo que 84,2 % e 15,8 % das isoflavonas totais estavam presentes nos cotilédones e eixo embrionário, respectivamente. As sementes, cotilédones e o eixo embrionário apresentaram 26,0 %, 27,2 % e 29,4 % de  $\beta$ -glicosídeos, 72,9 %, 71,4 % e 70,0 % de malonilglicosídeos e 1,2 %, 1,4 % e 0,6 % de agliconas, respectivamente. O rendimento dos brotos de soja foi de 632,4 %. Nos brotos de soja, o efeito do tempo de germinação foi quadrático no comprimento, umidade, concentração de daidzina, genistina e genisteína; linear na massa de 100 brotos e concentração de malonildaidzina. A concentração de malonilglicetina manteve-se constante, enquanto que a glicetina e gliciteína não foram detectadas nos brotos germinados. Nos cotilédones, o efeito do tempo de germinação foi quadrático na concentração de daidzina e genistina; linear na concentração de malonildaidzina e malonilgenistina. A genisteína foi detectada somente nos cotilédones não germinados e germinados por 24 h, enquanto que a glicetina, malonilglicetina, daidzeína e gliciteína não foram detectadas. Nas radículas, o efeito do tempo de germinação foi quadrático na concentração de daidzina, glicetina, malonilgenistina e malonilglicetina; linear na concentração de malonildaidzina, enquanto que a genistina e a gliciteína não foram detectadas. No hipocótilo, o efeito do tempo de germinação foi cúbico na concentração de daidzina e genistina; quadrático na concentração de malonildaidzina, malonilgenistina e malonilglicetina e linear na concentração de genisteína, enquanto que a glicetina, daidzeína e gliciteína foram detectadas somente em alguns tempos de germinação.

**Palavras-chave:** Broto de soja. *Glycine max*. Aglicona. Moyashi. Plântula

QUINHONE JÚNIOR, Alécio. **Physical parameters and effect of germination time on the content and form of isoflavones in germinated soybeans**. 2014. 87 p. Dissertation (Master's Degree in Food Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

## ABSTRACT

Soy is the most cultivated legumes in the world and contains high levels of isoflavones. These compounds have attracted interest in the pharmaceutical and food industry due to association with human health benefits. The soy isoflavones are divided into aglycones,  $\beta$ -glucosides, malonylglucosides and acetylglucosides, and the aglycone exhibit higher biological activity. The germination time may exert distinct effects depending on the soybean sprout components or isoflavone forms. The aim of this study was to evaluate the physical parameters and effect of germination time on the content and form of isoflavones in BRS 284 germinated soybeans. A randomized complete block design with three replications was used. Seeds were germinated in germination paper rolls at 35 °C, relative humidity of 100 % and with natural light up to 168 h. The soybean sprouts were collected every 24 h and the physical parameters of length, moisture content, fresh weight, dry weight, yield and isoflavone contents. Then the cotyledons, radicle and hypocotyl of soybean sprouts were separated and the isoflavone content was evaluated and the data were subjected to regression analysis. The soybean seeds were composed of 89.9 % cotyledons, 2.4 % embryonic axis and 7.7 % seed coat and 84.2 % and 15.8 % of the total isoflavones were present in cotyledons and the embryonic axis, respectively. Seeds, cotyledons and the embryonic axis showed 26.0 %, 27.2 % and 29.4 % of  $\beta$ -glucosides, 72.9 %, 71.4 % and 70.0 % of malonylglucosides and 1.2 %, 1.4 % and 0.6 % of aglycones, respectively. The yield of soybean sprouts was 632.4 %. In soybean sprouts, the effect of germination time was quadratic on the length, moisture and daidzin, genistin and genistein content and linear on the fresh weight and malonyldaidzin content. The malonylglycitin content was constant, and glycitin and glycitein were not detected in the soybean sprouts. In cotyledons, the effect of germination time was quadratic on daidzin and genistin contents and linear on malonyldaidzin and malonylgenistin contents. Moreover, genistein was detected only in ungerminated cotyledons and cotyledons germinated for 24 h, and glycitin, malonylglycitin, daidzein and glycitein not were detected in cotyledons. In radicles, the effect of germination time was quadratic on daidzin, glycitin, malonylgenistin and malonylglycitin contents, and linear on malonyldaidzin content. Genistin and glycitein were not detected in radicles. In hypocotyls, the effect of germination time was cubic on daidzin and genistin contents, quadratic on malonyldaidzin, malonylgenistin and malonylglycitin contents and linear on genistein content and glycitin, daidzein and glycitein were detected only in a few points during germination process.

**Key words:** Soybean sprout. *Glycine max*. Aglycone. Moyashi. Seedling.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Série histórica de produção de soja (em milhões de ton) no Brasil entre as safras de 1976/1977 a 2012/2013 .....	15
<b>Figura 2</b> – Previsão de produção de soja (em milhões de ton) nos estados do Brasil na safra de 2012/2013 .....	16
<b>Figura 3</b> – Estrutura básica de (a) flavonoides e (b) isoflavonoides (b) .....	20
<b>Figura 4</b> – Diagrama parcial da rota dos fenil-propanoides .....	21
<b>Figura 5</b> – Estrutura química genérica das isoflavonas da soja .....	22
<b>Figura 6</b> – Estruturas da Genisteína, Daidzeína, Equol e Etradiol .....	26
<b>Figura 7</b> – Estrutura típica de uma semente de leguminosa .....	27
<b>Figura 8</b> – Preparo de material e sementes de soja para o processo de germinação da soja .....	34
<b>Figura 9</b> – Câmara de germinação e os blocos experimentais .....	34
<b>Figura 10</b> – Desenvolvimento da soja BRS 284 germinada .....	35
<b>Figura 11</b> – Componentes do broto de soja germinado por 168 h .....	36

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Composição química dos grãos de soja e suas partes estruturais.....	17
<b>Tabela 2</b> – Estrutura química das 12 isoflavonas da soja .....	22

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	13
2.1	OBJETIVO GERAL.....	13
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	14
3.1	ASPECTOS GERAIS E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA SOJA.....	14
3.2	ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA SEMENTE DE SOJA .....	16
3.3	CONSUMO E BENEFÍCIOS DA SOJA .....	18
3.3.1	Isoflavonas .....	19
3.4	Formação e Germinação da Semente de Soja.....	26
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	33
4.1	MATÉRIA PRIMA E REAGENTES .....	33
4.2	PREPARO DA AMOSTRA E PROCESSO DE GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE SOJA.....	33
4.3	PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS.....	36
4.3.1	Umidade .....	36
4.3.2	Extração e Quantificação de Isoflavonas por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE) .....	36
4.3.3	Medidas Físicas dos Brotos de Soja.....	37
4.4	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
<b>5</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	39
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	49
6.1	ARTIGO CIENTÍFICO 1: PARÂMETROS FÍSICOS E EFEITO DO TEMPO DE GERMINAÇÃO SOBRE O TEOR E FORMA DE ISOFLAVONAS DE BROTOS DE SOJA .....	50
6.2	ARTIGO CIENTÍFICO 2: TEOR DE DIFERENTES FORMAS DE ISOFLAVONAS DOS COMPONENTES DE SOJA E O EFEITO DO TEMPO DE GERMINAÇÃO SOBRE ESTES COMPOSTOS NOS COTILÉDONES E EIXO EMBRIONÁRIO.....	66
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES DA DISSERTAÇÃO</b> .....	87

## 1 INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é originária da região norte da China, seu cultivo iniciou-se há 5.000 anos, mas despertou interesse das indústrias mundiais somente a partir do século XX (LIU, 2004; CHANG; QIU, 2010). Esta leguminosa adquiriu grande importância econômica como *commodity* após a década de 1950 e atualmente os Estados Unidos e o Brasil são os maiores produtores mundiais de soja, entretanto de acordo com as projeções para safra de 2013/2014 o Brasil liderará o ranking de produção e, conforme estimativas de previsão de safra até 2022, o Brasil se consolidará como maior produtor mundial de soja (EMBRAPA, 2014a; USDA, 2014a).

As sementes de soja são compostas por 40 % de proteínas, 20 % de óleo, 35 %, de carboidratos e 5 % de cinzas (LIU, 1997). O principal uso da soja é a produção de farelo para alimentação animal, sendo que o subproduto desse processo é o óleo cru, do qual são produzidos o óleo refinado e a lecitina de soja (EMBRAPA, 2014b). A alta qualidade proteica e baixo teor de gordura saturada têm estimulado o consumo na forma de produtos como *miso*, *natto*, *tempeh*, extrato de soja, farinha de soja, flocos de soja, *snacks* e brotos de soja (LIU, 2004; RAGHUVANSHI; BISHT; 2010; CHANG; QIU, 2010; EMBRAPA, 2014a).

Em 1999, o FDA (Food and Drug Administration) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprovaram a alegação de que o consumo de 25 g de proteína de soja por dia, acompanhada de uma dieta com baixo conteúdo de gordura saturada e colesterol pode reduzir o risco de doenças cardíacas, concretizando a alegação que tal componente apresenta propriedades funcionais à saúde (DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 1999; BRASIL, 1999).

Além da alta qualidade da proteína a soja também possui isoflavonas, as quais podem ocorrer em quatro grupos e 12 formas distintas denominadas de agliconas (daidzeína, genisteína e gliciteína),  $\beta$ -glicosídeos (daidzina, genistina e glicitina), malonilglicosídeos (6"-O-malonildaizina, 6"-O-malonilgenistina e 6"-O-malonilglicitina) e acetilglicosídeos (6"-O-acetildaizina, 6"-O-acetilgenistina e 6"-O-acetilglicitina) (LIU, 2004). A soja é a única espécie vegetal que apresenta elevada quantidade de isoflavonas, variando de 0,12 mg a 4,61 mg de isoflavonas totais/g soja (CARRÃO-PANIZZI et al., 2009) e este teor é

determinado por fatores genéticos, ambientais e pelo processamento dos grãos (LIU, 2004; WANG, 2008).

O consumo de soja contendo isoflavonas está associado a benefícios à saúde humana como efeito protetor contra a perda óssea (ATTERITANO et al., 2009), prevenção de doenças cardiovasculares (CHAN et al., 2007), alívio dos sintomas da menopausa (WILLIAMSON-HUGHES et al., 2006) e efeito protetor contra o desenvolvimento de câncer de mama (WADA et al., 2013) e de próstata (DONG et al., 2013). Entretanto, a eficácia clínica de sua ação é dependente das propriedades farmacocinéticas, em particular da absorção e distribuição do tecido alvo, sendo que as agliconas apresentam maior absorção e atividade biológica (VITALE et al., 2013).

A germinação das sementes é um processo biológico natural complexo que pode ser utilizado para melhorar a qualidade sensorial (LIU, 2004) e o valor nutritivo (PAUCAR-MENACHO et al., 2010a; KIM et al., 2013) da soja, devido à redução no teor de substâncias indesejáveis como o ácido fítico (RIBEIRO; IDA; OLIVEIRA, 1999; RAMADAN, 2012), oligossacarídeos, (KIM et al., 2005; MARTÍN-CABREJAS et al., 2008) e inibidores de tripsina e atividade da lipoxigenase (PAUCAR-MENACHO et al., 2010a). Ainda, a germinação pode promover um aumento significativo no teor de vitaminas (AHMAD; PATHAK, 2000), ácido aspártico e glutâmico (MOSTAFA; RAHMA; RADY, 1987), fitosteróis e tocoferóis (SHI; NAM; MA, 2010), isoflavonas totais (LEE et al., 2007; PHOMMALTH et al., 2008a) e isoflavonas agliconas (KIM et al., 2005; YUAN et al., 2009; PAUCAR-MENACHO et al., 2010a; SHI; NAM; MA, 2010).

Na germinação ocorre o aumento da atividade da enzima  $\beta$ -glicosidase (RIBEIRO et al., 2006). Estas enzimas têm o potencial de modificar o perfil de isoflavonas das sementes de soja submetidas à germinação, convertendo os  $\beta$ -glicosídeos em agliconas (YUAN et al., 2009; PAUCAR-MENACHO et al., 2010a; YOSHIARA, 2012).

Os cotilédones da cultivar de soja BRS 257 germinada por 144 h a 35 °C, com 10 h de iluminação e 100 % de umidade relativa apresentaram 91 % de agliconas, em relação ao conteúdo total de isoflavonas. Nestas mesmas condições, foram detectadas apenas as isoflavonas agliconas nas radículas e hipocótilos, indicando que a germinação é um processo útil para a conversão de  $\beta$ -glicosídeos em agliconas (YOSHIARA, 2012). Entretanto, há necessidade de confirmar estes

estudos investigando se o mesmo fenômeno também ocorre com outras cultivares de soja.

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os parâmetros físicos e o efeito do tempo de germinação sobre o teor e forma de isoflavonas da soja BRS 284 germinada.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar os parâmetros físicos e o efeito do tempo de germinação por 168 h a 35 °C sobre o teor e forma de isoflavonas da soja BRS 284 germinada.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Caracterizar a semente de soja avaliando o percentual de seus componentes e o teor das diferentes formas de isoflavonas.

Avaliar o efeito do tempo de germinação sobre os parâmetros físicos de comprimento, umidade, massa de 100 brotos, matéria seca de 100 brotos e rendimento e o teor de isoflavonas dos brotos de soja BRS 284.

Avaliar o efeito do tempo de germinação sobre o teor das diferentes formas de isoflavonas no cotilédone, radícula e hipocótilo da soja germinada.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 ASPECTOS GERAIS E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA SOJA

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) pertence à família Fabaceae (Leguminosae), subfamília Papilionoideae, tribo Phaseoleae e gênero *Glycine*. Seu nome genérico *Glycine* deriva da palavra grega *glyks* (doce) (MISHRA; VERMA, 2010). É uma planta arbustiva produzida anualmente e com altura entre 0,50 a 1,25 m. Suas sementes são esféricas ou ovaladas, normalmente de coloração amarela, mas algumas podem apresentar a cor verde, castanho escura, preta arroxeada ou preta (LIU, 2004).

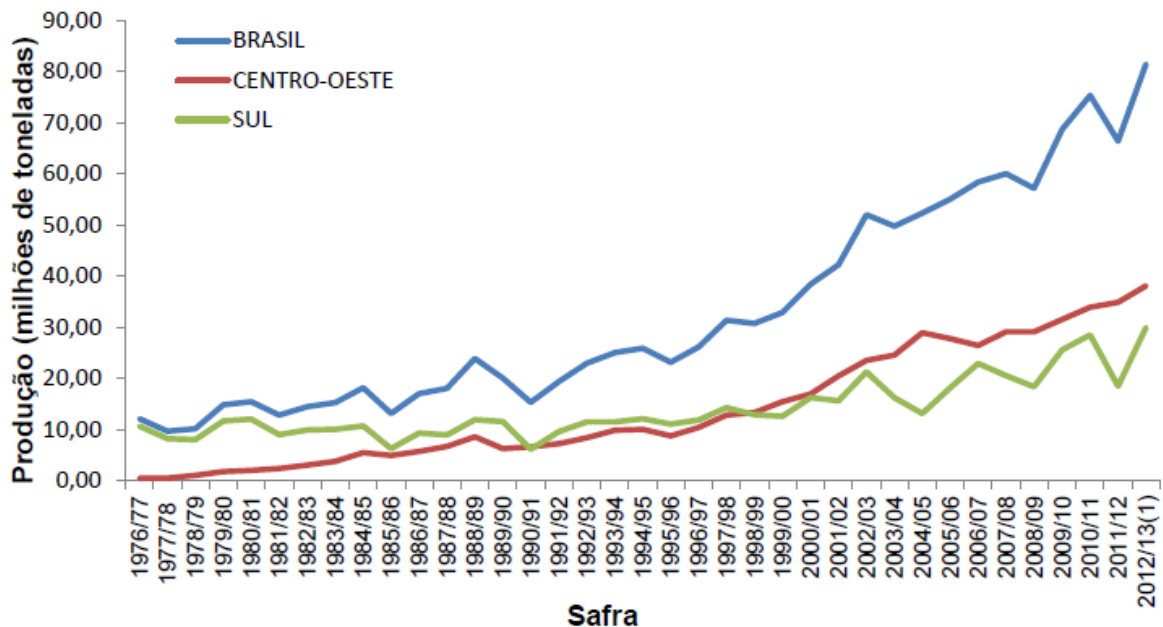
Evidências históricas e geográficas indicam que a soja é originária da região norte da China. Seu cultivo se iniciou há 5000 anos (LIU, 2004). Até meados do século XX, a China foi o maior produtor e exportador deste grão e, a partir da segunda década do século XX, a soja começou a despertar o interesse das indústrias devido ao elevado teor de óleo e proteína do grão. Na década de 1950, a produção se desenvolveu rapidamente nos Estados Unidos e Brasil, tornando-os os maiores produtores mundiais (CHANG; QIU, 2010; EMBRAPA, 2014a).

Em 1882 a soja chegou ao Brasil, trazida dos Estados Unidos, dando início a estudos sobre a adaptação desta espécie em várias regiões do país. Porém, somente na década de 1950, o plantio desta cultura foi incentivado pelo governo brasileiro. No final da década de 1960, o Brasil começou a tratar a soja como um produto comercial, pois este grão começou a ser uma opção para a safra de verão e, além disto, houve uma crescente demanda para alimentação de suínos e aves. Em 1966, a produção comercial de soja já era uma necessidade estratégica, com produção de aproximadamente 500 mil toneladas no país. O aumento expressivo do preço da soja no mercado mundial em meados da década de 1970 despertou ainda mais o interesse dos agricultores e do próprio governo, sendo assim, na década de 1970 a soja já tinha se consolidado como a principal cultura do agronegócio brasileiro (EMBRAPA, 2014c).

O Brasil se destacou em relação aos outros países, pois o escoamento da safra brasileira ocorre na entressafra americana, quando os preços atingem as maiores cotações. Assim, o país passou a investir em tecnologia para adaptação da cultura às condições brasileiras, processo liderado pela Empresa

Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA. Estes investimentos possibilitaram a "tropicalização" da soja, permitindo que o grão fosse cultivado com sucesso em regiões de baixas latitudes, entre o trópico de capricórnio e a linha do equador. Essa conquista dos cientistas brasileiros revolucionou a história mundial da soja e seu impacto começou a ser notado a partir do final da década de 80 e mais notoriamente na década de 90, quando os preços do grão começaram a cair (EMBRAPA, 2014c). A Figura 1 mostra a série histórica de produção de soja no Brasil entre as safras de 1976/1977 a 2012/2013.

**Figura 1** – Série histórica de produção de soja (em milhões de ton) no Brasil entre as safras de 1976/1977 a 2012/2013



(1) Previsão

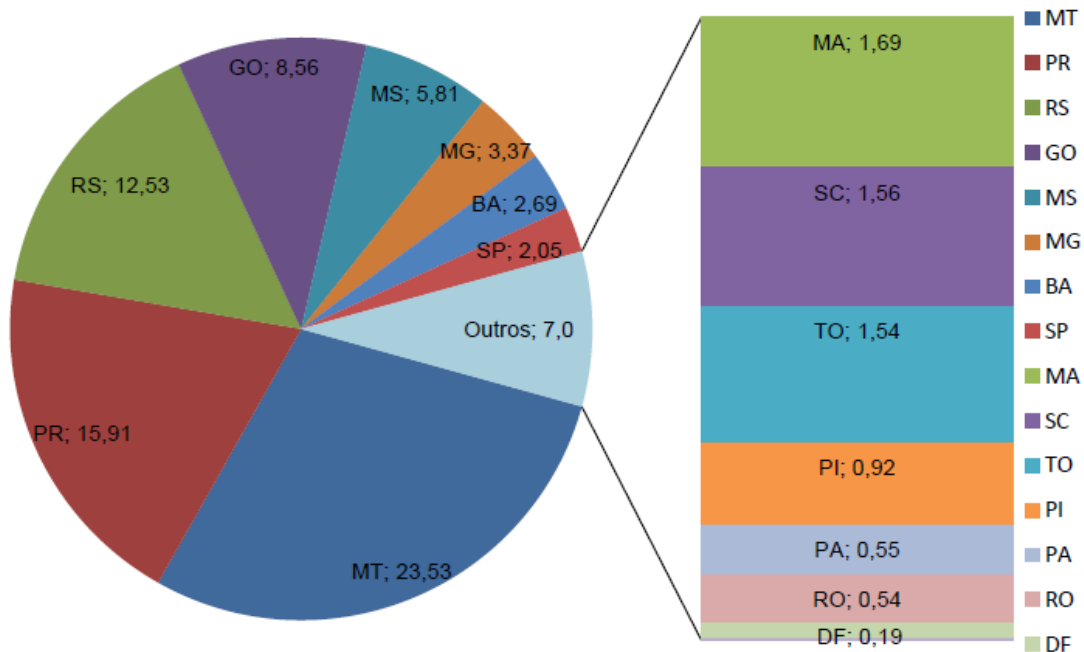
Fonte: CONAB, (2014a)

De acordo com dados do United States Department of Agriculture (USDA, 2014b), os EUA foram os maiores produtores de soja na safra de 2011/2012, com 84,19 milhões de toneladas de soja, seguido pelo Brasil, com produção de 66,50 milhões de toneladas e juntos, Brasil e EUA contribuem com mais de 60 % da produção mundial de soja. Entretanto, de acordo com as estimativas de produção para safra de 2012/13, a produção brasileira foi de 82,00 milhões de toneladas, apenas 600 mil toneladas a menos que os EUA e conforme as projeções para a safra de 2013/2014, o Brasil irá liderar o ranking de produção de soja, com 88,00 milhões de toneladas, contra 85,71 milhões de toneladas produzidas pelos EUA. Além disto, conforme estimativas de previsão de safra até

2022, o Brasil se consolidará como maior produtor mundial de soja, com total de 105,39 milhões de toneladas (USDA, 2014a), destacando ainda mais a importância desta cultura no agronegócio brasileiro.

No Brasil, o ranking de produção de soja segundo os estados (Figura 2) é liderado pelo Mato Grosso, com produção de 23,53 milhões de toneladas, seguido do Paraná, Rio Grande do Sul e Goiás, com produções de 15,91, 12,53, 8,56 milhões de toneladas, respectivamente, e estes quatro estados contribuíram com dois terços da produção total de soja do Brasil (CONAB, 2014b).

**Figura 2** – Previsão de produção de soja (em milhões de ton) nos estados do Brasil na safra de 2012/2013.



Fonte: CONAB, (2014b)

### 3.2 ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA SEMENTE DE SOJA

Em média, as sementes de soja contêm 8 % de casca, 90 % de cotilédone e 2 % de eixo embrionário, sendo que a composição do grão e de seus componentes é influenciada por diversos fatores como cultivar, época da semeadura, localização geográfica, condições climáticas e estresse ambiental (LIU, 1997).

Em relação à composição química, os grãos de soja são constituídos, em média, por 40 % de proteínas, 35 % de carboidratos, 20 % de

lipídios e 5 % de cinzas (Tabela 1). Considerando as estruturas individuais do grão, o cotilédone apresenta os maiores percentuais de proteína e lipídios, enquanto que a casca apresenta os menores percentuais destes componentes, mas apresenta o maior conteúdo de carboidratos. Uma vez que o cotilédone representa a maior parte de todo o grão é de se esperar que sua composição se aproxime muito da composição do grão inteiro (LIU, 1997).

**Tabela 1** – Composição química dos grãos de soja e suas partes estruturais

Componente	Percentual no grão inteiro	Composição química (% de matéria seca)			
		Proteína	Lipídios	Carboidratos	Cinzas
Cotilédone	90,0	43,0	23,0	29,0	5,0
Eixo embrionário	2,0	41,0	11,0	44,0	4,0
Casca	8,0	9,0	1,0	86,0	4,0
Grão inteiro	100,0	40,0	20,0	35,0	5,0

**Fonte:** Adaptado de Wolf e Cowan (1975)

As proteínas da soja são armazenadas nos cotilédones em estruturas denominadas de corpos proteicos, os quais apresentam de 2 a 20 µm de diâmetro (SGARBIERI, 1996). 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). Apesar de ser relativamente pobre em aminoácidos sulfurados (cisteína e metionina), seu conteúdo é suficientemente alto e atende às necessidades dos humanos. Além disso, apresenta alto conteúdo de lisina, aminoácido essencial deficiente na maioria dos cereais (MESSINA, 1997).

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

Apesar dos carboidratos representarem a segunda maior fração de componentes presentes na soja, seu valor econômico é menos importante do que o das proteínas e dos lipídios. Os carboidratos da soja podem ser divididos em duas classes: carboidratos insolúveis e solúveis. Os carboidratos insolúveis incluem a celulose, hemicelulose, pectina e pequenas quantidades de amido (LIU, 1997).

Dentre os carboidratos solúveis, a sacarose e os oligossacarídeos da família da rafinose (RFOs: rafinose, estaquiose e verbascose) são os mais abundantes, entretanto representam pequena parte do total de carboidratos (PETERBAUER; RICHTER, 2001).

O conteúdo de cinzas totais no grão de soja é de aproximadamente 5 %. Os minerais que estão presentes em maiores concentrações são o potássio, fósforo, magnésio, enxofre, cálcio, cloro e sódio, os quais apresentam valores médios que podem variar de 0,2 % a 2,1 %. Além destes minerais, estão presentes em menores concentrações o silício, ferro, zinco, manganês, cobre, molibdênio, flúor, cromo, selênio, cobalto, cádmio, chumbo, arsênio, mercúrio, e iodo com concentrações que podem variar de 0,01 a 140 ppm. Da mesma forma como os outros componentes, a concentração de minerais é influenciada por fatores genéticos e ambientais (LIU, 2004).

Também estão presentes na soja diversos outros constituintes, que, embora correspondam a uma pequena fração do total, apresentam importante papel funcional. Dentre eles podem-se citar as vitaminas (tiamina, riboflavina, niacina, ácido pantotênico, ácido fólico,  $\beta$ -caroteno e tocoferol), fitato e as isoflavonas (LIU, 1997), as quais serão apresentadas mais adiante.

### 3.3 CONSUMO E BENEFÍCIOS DA SOJA

Muito embora metade da soja produzida no Brasil seja exportada na forma de grão e a outra parcela seja utilizada para fabricação de óleo e ração animal (CONAB, 2014b), a soja é considerada um produto versátil, pois pode ser consumida na forma de produtos fermentados como *miso*, *shoyu*, *natto*, *tempeh*, *sufu* e extrato aquoso de soja fermentado ou como produtos não fermentados tais como farinha de soja integral e farinha de soja desengordurada, flocos de soja, extrato aquoso de soja, *snacks*, brotos de soja e óleo (LIU, 2004; CHANG; QIU, 2010; RAGHUVANSHI; BISHT; 2010; EMBRAPA, 2014a), bem como na indústria de bebidas, de carnes nas mais variadas formas, e, nos últimos anos, como fonte alternativa de combustível (EMBRAPA, 2014b).

Em 1999, o Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos EUA por meio do FDA (Food and Drug Administration) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprovaram a alegação de que o consumo de 25 g de proteína de

soja por dia acompanhada de uma dieta com baixo conteúdo de gordura saturada e colesterol pode reduzir o risco de doenças cardíacas, concretizando a alegação que tal componente apresenta propriedades funcionais (DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 1999; BRASIL, 1999).

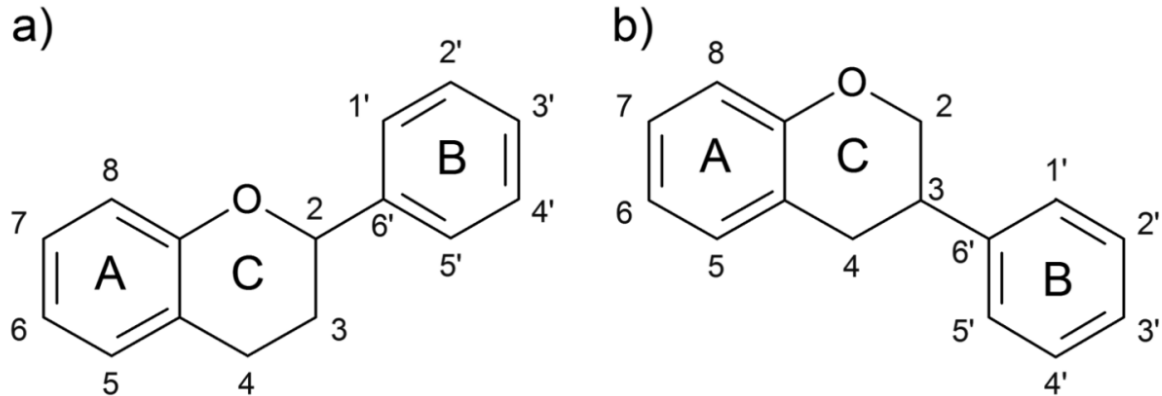
Os oligossacarídeos da soja, principalmente a rafinose e estaquiose muitas vezes são citados como açúcares que causam flatulência, pois os humanos não possuem a enzima  $\alpha$ -galactosidase, necessária para hidrolisá-los. Desta forma, chegam intactos no intestino grosso onde a microflora é capaz de utilizá-los, produzindo gases e ácidos que causam inchaço e diarreia. Entretanto, estes açúcares podem ser utilizados como prebióticos, pois estimulam o crescimento de bactérias benéficas à saúde humana, como as bifidobactérias, e estas produzem os ácidos graxos de cadeia curta, compostos benéficos às células do intestino grosso (ESPINOSA-MARTOS; RUPÉREZ, 2006; BOUHNİK et al, 2007; WOODMANSEY, 2007).

Além da alta qualidade de sua proteína e dos benefícios trazidos pelos carboidratos, a soja também possui isoflavonas, compostos antioxidantes que estão associados a benefícios à saúde humana, tais como efeito protetor contra a perda óssea em mulheres na pós-menopausa (ATTERITANO et al., 2009; WEI et al., 2012), prevenção de doenças cardiovasculares (CHAN et al., 2007), alívio dos sintomas da menopausa (WILLIAMSON-HUGHES et al., 2006) e efeito protetor contra o desenvolvimento de câncer de mama (WADA et al., 2013) e de próstata (DONG et al., 2013).

### 3.3.1 Isoflavonas

Os principais flavonoides conhecidos são as flavonas, flavonóis, flavanonas, flavanóis, isoflavonoides e antocianinas. Estes compostos apresentam a mesma estrutura básica (Figura 3), composta por dois anéis aromáticos ligados por uma cadeia alifática de três carbonos, a qual normalmente está condensada na forma de um pirano (WANG, 2008). De todos os flavonoides, três classes têm despertado maior interesse na área nutracêutica e de alimentos funcionais: as antocianinas, os flavanóis e as isoflavonas (VALLS et al., 2009).

**Figura 3** – Estrutura básica de (a) flavonoides e (b) isoflavonoides (b)

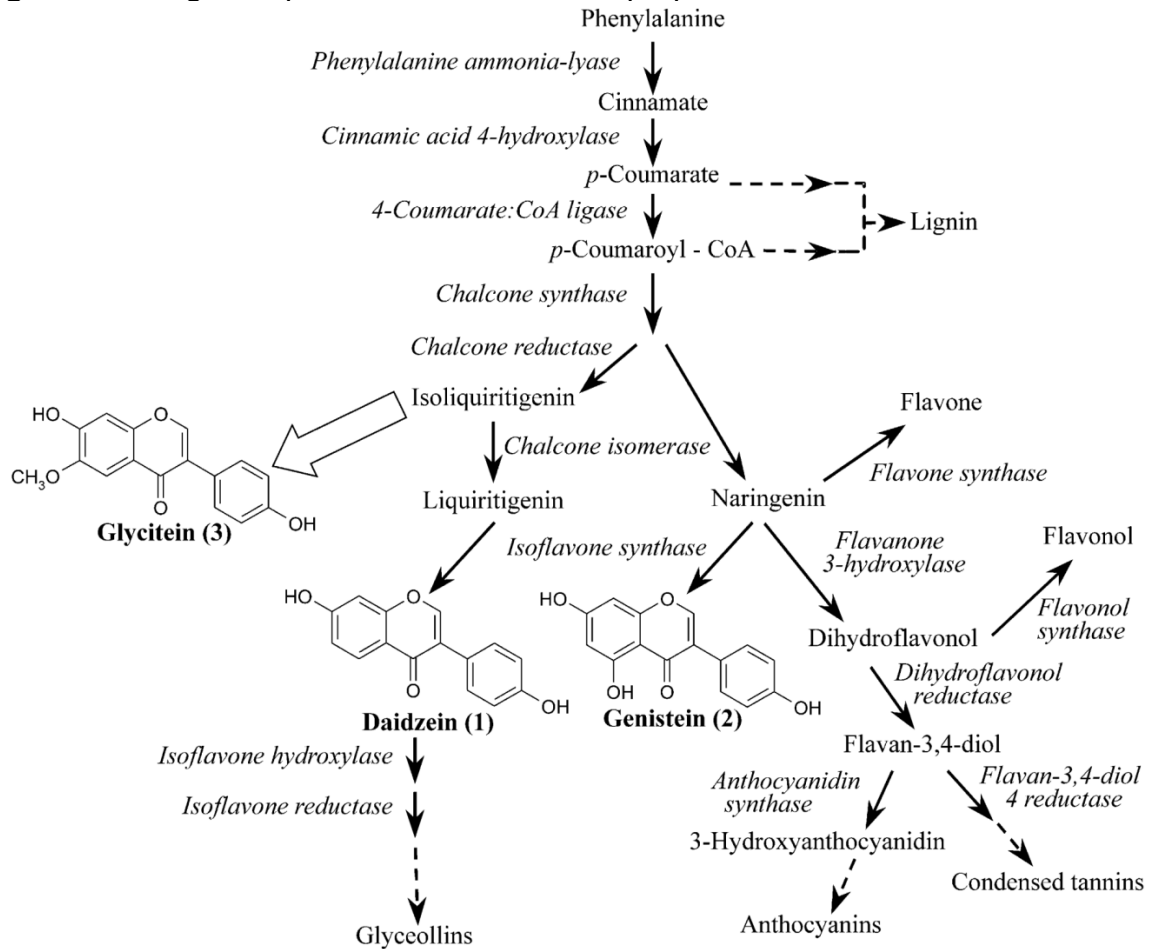


Fonte: Liu (2004).

As isoflavonas apresentam estrutura geral C6-C3-C6 e são caracterizadas por apresentarem estrutura polifenólica composta por dois anéis de benzeno (A e B) ligados por um anel heterocíclico C. A diferença básica entre as isoflavonas e as flavonas está na posição em que o anel B se liga ao anel C. Nas isoflavonas esta ligação ocorre no carbono três (Figura 3a). Ao todo já foram descritos mais de 1600 isoflavonoides e dentre as espécies vegetais mais estudadas as isoflavonas da soja tem merecido maior destaque (ANDERSEN; JORDHEIM, 2006).

Na soja, as isoflavonas daidzeína, genisteína e gliciteína são sintetizadas pela rota metabólica dos fenil-propanoides (Figura 4) e armazenadas nos vacúolos preferencialmente como  $\beta$ -glicosídeos e malonilglicosídeos (GRAHAM, 1991; KUDOU et al., 1991). A daidzeína é produzida como parte da via fenil-propanoide, após a atuação da enzima chalcona sintase, seguida de uma redução pela enzima chalcona redutase, uma enzima específica de leguminosas. A genisteína é produzida a partir da narigenina, um composto intermediário da via de produção de antocianinas e flavonoides. A síntese da gliciteína ainda não está bem esclarecida, entretanto especula-se que é derivada da isoliquiritigenina, um intermediário da síntese da daidzeína (LATUNDE-DADA et al., 2001). Em todos os casos, a reação de migração de um grupo aril para formação das isoflavonas é mediada pela enzima isoflavona sintase (JUNG et al., 2000; YU et al., 2003).

**Figura 4** – Diagrama parcial da rota dos fenil-propanoides.



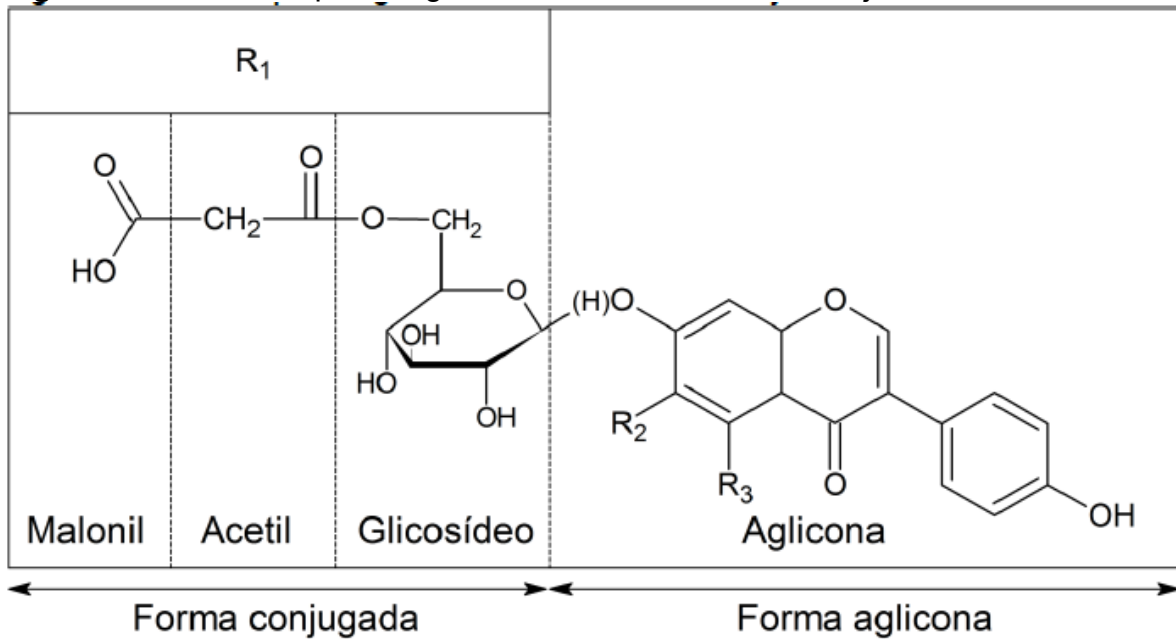
Setas tracejadas representam múltiplas etapas; seta larga representa etapas especulativas.  
**Fonte:** Yu et al. (2003).

Assim, as isoflavonas da soja e de seus produtos ocorrem em quatro grupos e 12 formas distintas: agliconas (daidzeína, genisteína e gliciteína),  $\beta$ -glicosídeos (daidzina, genistina e glicitina), malonilglicosídeos (6"-O-malonildaizina, 6"-O-malonilgenistina e 6"-O-malonilglicitina) e acetilglicosídeos (6"-O-acetildaizina, 6"-O-acetilgenistina e 6"-O-acetilglicitina) (LIU, 2004; WANG, 2008). Na Figura 5 e Tabela 2 estão apresentadas as 12 formas das isoflavonas encontradas na soja.

Muito embora os flavonoides sejam encontrados em várias famílias de plantas, as isoflavonas estão presentes em apenas poucas espécies. Além disso, a soja é a única espécie que apresenta altas quantidades desta substância variando de 0,12 mg a 4,61 mg de isoflavonas totais/g de grão (CARRÃO-PANIZZI et al., 2009). Segundo Gutierrez-Gonzalez et al. (2009), a faixa de concentração de isoflavonas nos grãos de soja é muito ampla, mesmo em linhagens geneticamente estáveis que crescem em ambiente controlado. Assim, a síntese e acúmulo das

isoflavonas dependem de inúmeros fatores bióticos e abióticos, tais como safra (WANG; MURPHY, 1994), temperatura, época, local de cultivo (TSUKAMOTO et al., 1995; BERGER et al., 2008) e carga de patógenos no local de cultivo (WEGULO et al., 2005). Após a colheita dos grãos, o tempo de armazenamento e as condições de processamento também influenciaram a concentração e perfil das isoflavonas (YUAN et al., 2009).

**Figura 5** – Estrutura química genérica das isoflavonas da soja



**Tabela 2** – Estrutura química das 12 isoflavonas da soja

Isoflavona	R1	R2	R3
Genisteína	H	H	OH
Daidzeína	H	H	H
Gliciteína	H	OCH <sub>3</sub>	H
Genistina	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub>	H	OH
Daidzina	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub>	H	H
Glicitina	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub>	OCH <sub>3</sub>	H
Acetilgenistina	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub> +COCH <sub>3</sub>	H	OH
Acetildaidzina	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub> +COCH <sub>3</sub>	H	H
Acetilglicitina	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub> +COCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H
Malonilgenistina	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub> +COCH <sub>2</sub> COOH	H	OH
Malonildaidzina	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub> +COCH <sub>2</sub> COOH	H	H
Malonilglicitina	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub> +COCH <sub>2</sub> COOH	OCH <sub>3</sub>	H

**Fonte:** Adaptado de Rostagno, Palma e Barroso (2005).

O conteúdo total de isoflavonas, bem como de suas formas individuais, pode ainda variar dentro da estrutura da própria semente. As isoflavonas são encontradas no eixo embrionário em concentrações de 5 a 25 vezes maiores do que nos cotilédones, enquanto que o tegumento apresenta quantidades desprezíveis

(LIU, 2004; RIBEIRO et al., 2006; YUAN et al., 2009). Além disto, a glicitina e seus derivados são encontrados somente no eixo embrionário (KUDOU et al., 1991; SILVA et al., 2012). Por outro lado, 80 % a 90 % das isoflavonas estão nos cotilédones, que representam cerca de 90 % da massa total do grão, enquanto que o eixo embrionário contém de 10 % a 20 % do total de isoflavonas e representa apenas 2 % da massa do grão (LIU, 1997).

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

O teor de isoflavonas dos alimentos a base de soja pode ser muito variável em função das características da matéria prima bem como de seu processamento. Um banco de dados do conteúdo de isoflavonas totais e de suas formas agliconas presentes em mais de 550 alimentos, com ou sem soja, foi disponibilizado pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2008). De acordo com esses dados, nota-se que os alimentos contendo soja se destacam em relação ao conteúdo de isoflavonas, podendo atingir valores de até 225 mg/100g de parte comestível do alimento e em base úmida, comprovando que a soja é uma ótima fonte de isoflavonas.

O potencial da soja como um ingrediente saudável para formulações de alimentos funcionais está sendo grandemente explorado pelas indústrias de alimentos. O efeito protetor das isoflavonas contra a osteoporose e sintomas de menopausa levou ao lançamento de vários produtos com soja tais como extrato de soja e análogos de produtos lácteos (VALLS et al., 2009). Entretanto, as isoflavonas em sua forma isoladas são reconhecidas pela legislação brasileira como medicamento fitoterápico, tendo obrigatoriedade de registro (ANVISA, 2014a; ANVISA, 2014b).

De acordo com a ANVISA (2014b): “[...] fitoterápicos são medicamentos obtidos a partir de plantas medicinais [...] empregando-se exclusivamente derivados de droga vegetal (extrato, tintura, óleo, cera, exsudato, suco, e outros)”. Desta forma, os dizeres de rotulagem e o material publicitário dos produtos à base de soja na área de alimentos não podem veicular qualquer alegação em função das isoflavonas, seja de conteúdo (“contém”), funcional, de saúde e terapêutica (prevenção, tratamento e cura de doenças). Além disto, de acordo com os requisitos adicionais que devem ser atendidos para o registro de novos alimentos, a soja ou produtos a base de soja devem apresentar laudo de análise do produto informando a quantidade de isoflavonas no produto pronto para consumo, sendo que a quantidade máxima permitida de isoflavonas é de 25 mg/dia. (ANVISA, 2014a; ANVISA 2014b).

Embora não sejam classificadas oficialmente como nutrientes, as isoflavonas apresentam papel tão importante quanto o de vitaminas e minerais (MESSINA; MESSINA; SETCHELL, 1994). Inicialmente, os estudos sobre as isoflavonas da soja estavam voltados para o conhecimento da atividade estrogênica (WONG; FLUX, 1962) e sobre a interferência deste composto no metabolismo mineral (MAGEE, 1963). Entretanto, estudos mais recentes demonstraram que as isoflavonas podem apresentar outros efeitos positivos como atividade antioxidante e antifúngica (FLEURY et al., 1992), atividade hipocolesterolêmica (MESSINA, 2000; GARDENER et al., 2001; WANGEN et al., 2001) e redução de ondas de calor e perda óssea decorrentes da pós-menopausa (LETHABY et al., 2007; MESSINA; WOOD, 2008) e efeito protetor contra o desenvolvimento de câncer de mama (WADA et al., 2013) e de próstata (DONG et al., 2013).

De acordo com Brouns (2002), mulheres asiáticas com comportamento alimentar tradicional, apresentaram melhores condições cardiovasculares e ósseas quando comparadas com as ocidentais. Tal característica pode ser decorrente da dieta rica em soja e conseqüentemente em isoflavonas. Segundo Lephart et al. (2004), as isoflavonas são fitoestrógenos que apresentam efeito tanto estrogênico quanto antiestrogênico devido a sua estrutura similar ao estradiol de mamíferos e, portanto, a sua ingestão pode ser desejável. As isoflavonas desempenham um importante papel na saúde humana, entretanto a eficácia clínica de sua ação é dependente das propriedades farmacocinéticas, em particular da absorção e distribuição do tecido alvo, sendo que as formas

conjugadas apresentam menor absorção no epitélio intestinal e menor atividade biológica quando comparadas às agliconas correspondentes (VITALE et al., 2013).

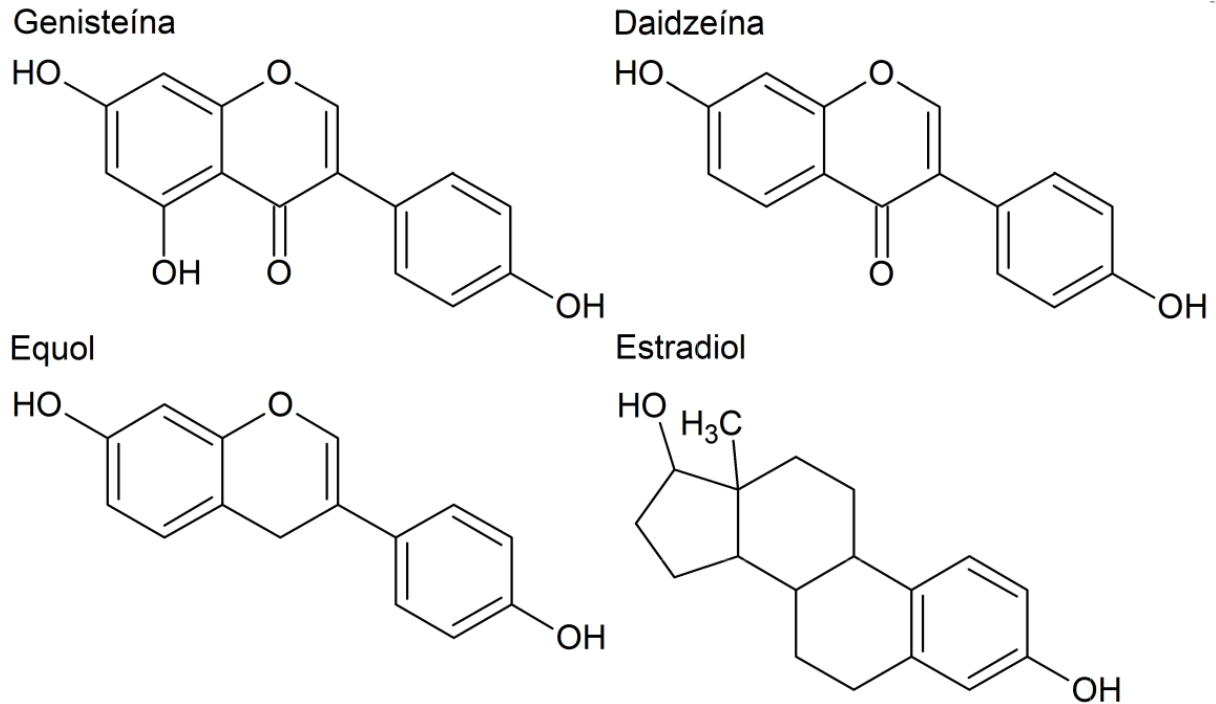
Na soja e em alimentos a base de soja, as isoflavonas estão presentes como uma mistura de malonilglicosídeos e  $\beta$ -glicosídeos. Após serem ingeridas, as isoflavonas são hidrolisadas pelas enzimas  $\beta$ -glicosidases do intestino e de bactérias liberando as agliconas (DAY et al., 1998; SETCHELL et al., 2002). As agliconas por sua vez podem ser absorvidas diretamente ou serem novamente metabolizadas pela microflora intestinal no intestino grosso formando outros compostos tais como equol e O-desmethylangolensin (O-DMA) (ATKINSON; FRANKENFELD; LAMPE, 2005). Mais recentemente também foi relatada em estudos com camundongos a formação de 5-hidroxi-equol a partir da genisteína, por meio da ação de bactérias estritamente anaeróbicas (MATTHIES et al. 2008).

O metabolismo decorrente da microflora intestinal desempenha um importante papel na disponibilidade e bioativação das isoflavonas. Segundo Setchell et al. (2002), o S-equol [7-hydroxy-3-(49-hydroxyphenyl)-chroman] é de longe o mais abundante e ativo metabólito intestinal da daidzeína, além disto estes pesquisadores observaram dois grupos de pessoas com capacidades distintas de produção do S-equol, e estas diferenças estão relacionadas ao tipo de bactérias intestinais presentes. Desta forma, a efetividade de suplementos a base de proteína de soja contra doenças cardiovasculares, osteoporose e sintomas da menopausa pode estar diretamente relacionada à habilidade de biotransformação das isoflavonas em equol.

Os fitoestrógenos e em particular as isoflavonas e seus metabólitos, apresentam uma grande similaridade estrutural com o hormônio feminino 1,7- $\beta$ -estradiol (Figura 6), desta forma podem ligar-se aos receptores de estrogênio alfa e beta e mimetizar a ação dos estrógenos nos tecidos alvo, exercendo vários benefícios quando usados em tratamentos de doenças hormônio-dependentes (VITALE et al., 2013). O S-equol apresenta maior afinidade aos receptores de estrogênio quando comparada à daidzeína (SETCHELL et al., 2002), entretanto, a capacidade de produção de S-equol a partir da daidzeína é muito variável entre a população adulta. Segundo Song et al. (2006), mulheres caucasianas produziram quantidades significativamente menores de S-equol do que mulheres asiáticas, após a ingestão de alimentos de soja contendo isoflavonas. Portanto, ainda são necessários mais estudos sobre metabolismo e biotransformação das isoflavonas

para obter uma maior compreensão destas substâncias na saúde humana. Entretanto, verifica-se que dietas contendo isoflavonas são atrativas.

**Figura 6** – Estruturas da Genisteína, Daidzeína, Equol e Estradiol



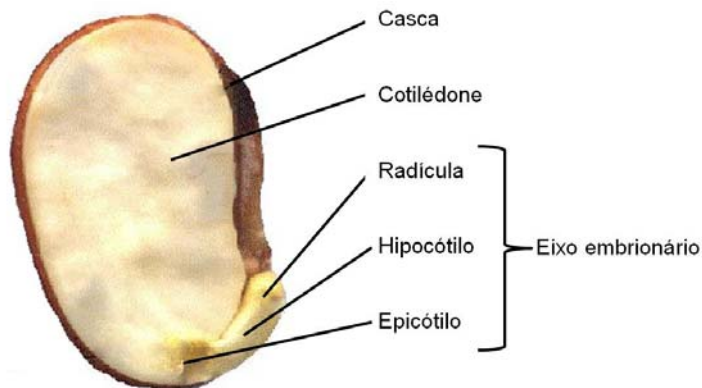
### 3.4 FORMAÇÃO E GERMINAÇÃO DA SEMENTE DE SOJA

A soja pertence ao grupo de plantas autógamas, ou seja, aquelas que realizam preferencialmente autofecundação (acima de 95 %). Este fenômeno ocorre quando o gameta masculino (pólen) fertiliza um gameta feminino (óvulo) da mesma planta, assim, do ponto de vista genético, a progênese é idêntica à planta mãe (MARCOS FILHO, 2005). A primeira divisão celular ocorre geralmente 32 h após a fertilização e dentro de sete dias inicia-se a formação das folhas cotiledonares. Entre 10 e 14 dias, inicia-se a formação das duas folhas primárias e, após estas atingirem seu máximo tamanho no embrião, inicia-se a formação das primeiras folhas trifoliadas. Durante este período, inicia-se o acúmulo das reservas de nutrientes nos cotilédones (KUMUDINI, 2010). O processo de desenvolvimento ou maturação da semente é controlado geneticamente e envolve uma sequência ordenada de alterações verificadas a partir da fecundação, até que as sementes se tornem indivíduos independentes da planta mãe e compreende um conjunto de etapas sucessivas de preparo para o sucesso da germinação. O desenvolvimento

também é caracterizado pela síntese e acúmulo de reservas, que posteriormente serão mobilizadas na germinação e emergência da planta, conduzindo a retomada do crescimento e à formação da plântula (MARCOS FILHO, 2005). Ainda nesta fase, as células do embrião sintetizam metabólitos secundários (PUEPPKE et al., 1998), dentre eles as isoflavonas (BERGER et al., 2008).

A semente da soja madura apresenta aparência típica de uma semente de leguminosa (Figura 7). É composta por um embrião bem desenvolvido e pela casca. O embrião, por sua vez apresenta dois cotilédones e o eixo embrionário, que pode ainda ser subdividido em radícula, hipocótilo e epicótilo. Os cotilédones são responsáveis pelo armazenamento de substâncias de reserva. As partes do eixo embrionário são difíceis de serem diferenciadas, por isso frequentemente o conjunto radícula, hipocótilo e epicótilo é denominado de eixo embrionário radícula-hipocótilo ou simplesmente eixo embrionário (MARCOS FILHO, 2005).

**Figura 7** – Estrutura típica de uma semente de leguminosa



**Fonte:** Adaptado de Tnau Agritech Portal (2012)

Durante a germinação, o epicótilo dá origem à parte aérea da planta atuando como gema apical, a radícula origina o sistema radicular e o hipocótilo é responsável pela ligação entre radícula e epicótilo (MARCOS FILHO, 2005). A casca envolve todo o embrião e contém uma estrutura denominada de hilo, a qual apresenta forma e cor variada. Em uma das extremidades do hilo está presente a micrópila, uma estrutura pequena proveniente da formação do grão e que é recoberta por uma cutícula quando este atinge a maturidade (VERNETTI, 1983; MENEZES et al., 1997; KUMUDINI, 2010; UNIVERSITY OF MINNESOTA, 2012).

A germinação é um processo biológico natural e complexo que ocorre em todas as plantas superiores e que envolve reações catabólicas, como

hidrólise de substâncias de reserva, e anabólicas para produção de novas células do embrião (METIVIER, 1979). Tal fenômeno tem início quando há condições adequadas para o crescimento tais como umidade, temperatura e fornecimento de nutrientes e termina quando se inicia o alongamento do eixo embrionário (BEWLEY; BLACK, 1994). Assim, o eixo embrionário retoma o desenvolvimento que tinha sido interrompido na maturação fisiológica da semente e, conseqüentemente, há o rompimento do tegumento pela radícula em desenvolvimento (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000). O processo de germinação inclui inúmeros eventos tais como hidratação de proteínas, mudanças na estrutura subcelular, respiração, síntese de macromoléculas e alongamento celular. As substâncias de reserva presentes nos cotilédones são hidrolisadas e usadas no desenvolvimento e crescimento do eixo embrionário (GARCÍA; PRIMO, 1993; BEWLEY; BLACK, 1994; SANGRONIS; MACHADO, 2007).

O processo de germinação pode ser dividido em três etapas principais: embebição, processo bioquímico preparatório e emergência propriamente dita, os quais podem ocorrer concomitantemente (BEWLEY; BLACK, 1994). Na embebição da semente, a difusão de quantidades consideráveis de água para dentro das sementes é fundamental para o reestabelecimento das atividades metabólicas que foram perdidas após a maturidade da semente. A água contribui para o amolecimento do tegumento, intensifica a velocidade respiratória, favorece as trocas gasosas, induz a síntese e atividade de enzimas e fito-hormônios e auxilia significativamente na digestão translocação e assimilação das reservas e crescimento subsequente. A embebição é essencial, pois devido ao período de repouso ocorrido após a maturação fisiológica, os tecidos estão dessecados. O início das atividades hidrolíticas é proporcionado por enzimas sintetizadas durante a maturação da semente. Já a síntese “de novo” de hidrolases envolve a atuação do mecanismo de síntese de proteinases, concomitantemente à recuperação do metabolismo oxidativo, processos sincronizados e ativados durante a embebição (MARCOS FILHO, 2005).

No processo bioquímico preparatório, ocorre a ativação da respiração, digestão de reservas e translocação e assimilação dos nutrientes. Com a respiração celular, ocorre a liberação de energia química acumulada em moléculas como carboidratos e lipídios. Esta energia liberada é utilizada para as diversas atividades metabólicas da célula. Os carboidratos, lipídios e proteínas não podem

ser transportados de uma célula para outra até os pontos de crescimento do embrião e nem serem utilizados para formação de novo protoplasma e paredes celulares antes de serem simplificados, portanto, é necessário que ocorra a hidrólise destas substâncias por meio de enzimas, com conseqüente transformação em moléculas solúveis e difusíveis, caracterizando a etapa da digestão de reservas (MARCOS FILHO, 2005).

A translocação das reservas digeridas para o eixo embrionário, principalmente como sacarose, aminoácidos e compostos fosforados, ocorre durante a etapa de embebição da semente. Em sementes de soja, a germinação é acompanhada por decréscimos nos teores de proteínas e matéria seca dos cotilédones e acréscimos no eixo embrionário. Em seguida, as reservas simplificadas, translocadas para os pontos de crescimento, são reorganizadas em substâncias mais complexas para formação do protoplasma e paredes celulares. Este processo demanda uma grande quantidade água e de energia liberada pela respiração, com isto, são criadas as condições para a retomada do crescimento do embrião. Vale ressaltar que este processo não se deve ao novo acúmulo de substâncias, mas sim da redistribuição das reservas armazenadas anteriormente (MARCOS FILHO, 2005).

O crescimento do embrião é marcado pela protusão da raiz primária, a qual pode ser decorrente tanto da divisão quanto do alongamento celular, mas em geral, o alongamento precede a divisão. No início do alongamento, há uma ativa preparação das paredes celulares para a síntese de novos compostos e praticamente não há acúmulo de matéria seca. Posteriormente, há um rápido alongamento com acréscimos significativos tanto de massa de matéria úmida quanto de matéria seca do eixo embrionário, acompanhados pela rápida mobilização de nutrientes dos cotilédones para a raiz primária. A síntese de proteínas é essencial à geminação e ocorre após a embebição da semente (MARCOS FILHO, 2005).

O primeiro sinal de que o processo de germinação se completou é normalmente observado pelo aumento do comprimento e da massa de matéria úmida da radícula. Em leguminosas como a soja, há um considerável crescimento da radícula antes da ruptura da casca (BEWLEY; BLACK, 1994).

Durante o processo de germinação da soja, ocorrem aumentos significativos na concentração de componentes biologicamente ativos das sementes, como lecitinas (BAU et al., 1994), saponinas (PAUCAR-MENACHO et al., 2010a;

PAUCAR-MENACHO et al., 2010b; DIA et al., 2012), fitosteróis (CHANDRASISI et al., 1990; SHI; NAM; MA, 2010). Neste processo, também se verifica a ativação das enzimas por simples hidratação (LABOURIAU, 1983), assim há uma diminuição de galactosil oligossacarídeos como a rafinose e estaquiose devido a reativação da enzima  $\alpha$ -galactosidase (CHANDRASIRI et al., 1987; MARTÍN-CABREJAS et al., 2008) e redução na concentração de ácido fítico e aumento no teor de fósforo total devido a ativação das enzimas fitases (LABOURIAU, 1983; RIBEIRO; IDA; OLIVEIRA, 1999).

Alimentos produzidos a partir de soja germinada podem ainda apresentar aumento significativo de vitaminas como o ácido ascórbico, riboflavina e tiamina (BATES; MATTHEWS, 1975; AHMAD; PATHAK, 2000); aumento de ácido aspártico e ácido glutâmico, responsáveis por características sensoriais desejáveis em brotos de soja (MOSTAFA; RAHMA; RADY, 1987); redução da atividade da lipoxigenase, e redução do sabor de feijão cru com consequente melhora das qualidades sensoriais (AHMAD; PATHAK, 2000; PAUCAR-MENACHO et al., 2010a); aumento da extração de proteína (CHIARELLO et al., 2006); e mudança no perfil de isoflavonas com consequente aumento do teor de agliconas (CHIARELLO et al., 2006; YUAN et al., 2009; PAUCAR-MENACHO et al., 2010a; YOSHIARA, 2012)

Durante a germinação da semente de soja, as isoflavonas desempenham um importante papel, pois são exsudadas pelas raízes para a rizosfera e funcionam como moléculas sinalizadoras para a indução de genes *nod* durante a simbiose entre leguminosas e bactérias fixadoras de nitrogênio do gênero *Rhizobium* (GRAHAN, 1991; FERGUSON; MATHESIUS, 2003; SUZUKI et al., 2006; SUGIYAMA; SHITAN; YAZAKI, 2007; WESTON; MATHESIUS, 2013). Além disto, atuam como precursoras de fitoalexinas durante a interação da planta com micro-organismos patogênicos, impedindo o ataque destes últimos (DIXON; FERRERIA, 2002; LOZOVAYA et al., 2007).

Há diversos fatores que podem influenciar o conteúdo de isoflavonas, tais como parte estrutural do broto de soja e tempo, temperatura e iluminação durante a germinação. Zhu et al. (2005) avaliaram o efeito da germinação no conteúdo de isoflavonas em duas cultivares de soja e constataram que o conteúdo total de isoflavonas aumentou gradualmente durante a maceração dos grãos sendo que ao final desta etapa, atingiu-se o máximo teor de daidzeína e genisteína. Entretanto, no início da germinação, o conteúdo total de isoflavonas

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

Ribeiro et al. (2006) avaliaram a influência do tempo de germinação sobre o perfil das isoflavonas e atividade da  $\beta$ -glicosidase em radículas e cotilédones cultivar de soja BRS 213 germinadas por 72 h a 25 °C. Nas radículas germinadas por 72 h foi observado um aumento de 3,3 vezes na atividade de  $\beta$ -glicosidase e uma redução de 6,3 vezes no conteúdo total de isoflavonas, enquanto que houve uma redução de 5 a 10 vezes na concentração de malonilglicosídeos, daidzina e genistina. Entretanto, não houve uma variação significativa na concentração de daidzeína e a genisteína e a gliciteína foram detectadas somente em alguns tempos de germinação. Por outro lado, nos cotilédones germinados por 72 h, observou-se um aumento de 2,3 vezes na atividade de  $\beta$ -glicosidase e um aumento de 2,4, 2,6 e 3,3 vezes na concentração de isoflavonas totais, malonilgenistina e malonildaizina, respectivamente, enquanto que não houve variação significativa na concentração de genistina e daidzina e a genisteína foi a única aglicona presente no cotilédone, sendo detectada apenas em 0 h e 6 h de germinação.

Chiarello et al. (2006) investigaram a influência do tratamento térmico e germinação sobre o perfil de isoflavonas em extrato aquoso de soja e observaram uma redução de 1,1 vezes no conteúdo total de isoflavonas e aumento de 7,0 vezes no conteúdo total de agliconas após 168 h de germinação a 22 °C e ausência de luz. Nestas mesmas condições, observaram também um aumento de 1,4 vezes na extração de proteína, indicando que a germinação é um processo interessante para a produção de extrato aquoso de soja com maior teor de agliconas.

Phommalth et al. (2008b) observaram, após 168 h de germinação, um aumento de 1,4 e 2,9 vezes no teor de isoflavonas totais para as cultivares Aga3 e Pungsannamulkong, respectivamente. Entretanto, após este período, a concentração diminuiu. Estes mesmos autores também observaram um aumento no teor de isoflavonas totais nos cotilédones e diminuição no teor de isoflavonas totais nos hipocótilos após germinação por 168 h.

Yuan et al. (2009) observaram uma diminuição na concentração de  $\beta$ -glicosídeos e um aumento na concentração de agliconas após a germinação da soja por 120 h na presença de luz natural e condições não controladas de temperatura. Entretanto, os malonilglicosídeos apresentaram as maiores concentrações durante o processo de germinação. Observaram também um aumento no teor de agliconas e diminuição dos malonilglicosídeos durante a noite, caracterizando um ritmo circadiano.

Paucar-Menacho et al. (2010b) avaliaram a influência do tempo e temperatura sobre diversos compostos bioativos na cultivar de soja BRS 133 germinadas e concluíram que estes dois fatores apresentaram influência significativa no perfil de isoflavonas. Estes pesquisadores observaram que as maiores concentrações de isoflavonas totais (453,1 mg/100 g) em farinha desengordurada de soja germinada da cultivar BRS 133 foram obtidas em baixos tempos de germinação (12 h a 21 h) e em temperaturas de 18 °C a 25 °C. Já as maiores concentrações de agliconas foram alcançadas em tempos de germinação variando de 63 h a 72 h e temperaturas entre 30 °C a 32 °C, com ponto ótimo (90,3 mg/100g) em 63 h de germinação e 30 °C.

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

Yoshiara (2012) observou diferenças entre o perfil de isoflavonas nas diferentes partes de sementes de soja da cultivar BRS 257 germinada por 168 h a 35 °C e presença de luz natural. Para os hipocótilos e radículas, a máxima concentração de agliconas ocorreu após 72 h de germinação (0,55 mg/g e 1,53 mg/g, em base seca), já para os cotilédones, a máxima concentração de agliconas (0,89 mg/g) foi obtida após 120 h, enquanto que para os epicótilos (0,96 mg/g) após 168 h de germinação.

Assim, destaca-se a importância de se investigar o processo de germinação de soja visando principalmente às alterações no perfil de isoflavonas de soja germinada cujo produto poderia beneficiar à saúde do consumidor.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATÉRIA PRIMA E REAGENTES

A cultivar de soja tipo convencional BRS 284 (safra 2011/12), desenvolvida pela Embrapa Soja em Londrina – PR foi cedida pela SL Alimentos (Londrina-PR) e utilizada para o processo de germinação. Segundo a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA, 2010), esta cultivar é indicada para processamento industrial e apresenta tamanho de semente médio (14,6 g/100 sementes) e teor de proteína e lipídios de 38,7 % e 20,4 %, respectivamente. Foram utilizados os seguintes padrões individuais de isoflavonas: daidzina, genistina, glicitina, daidzeína, genisteína, gliciteína (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA), acetildaidzina, acetilgenistina, acetilglicitina, malonildaidzina, malonilgenistina e malonilglicitina (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japão). Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico ou específicos para cromatografia.

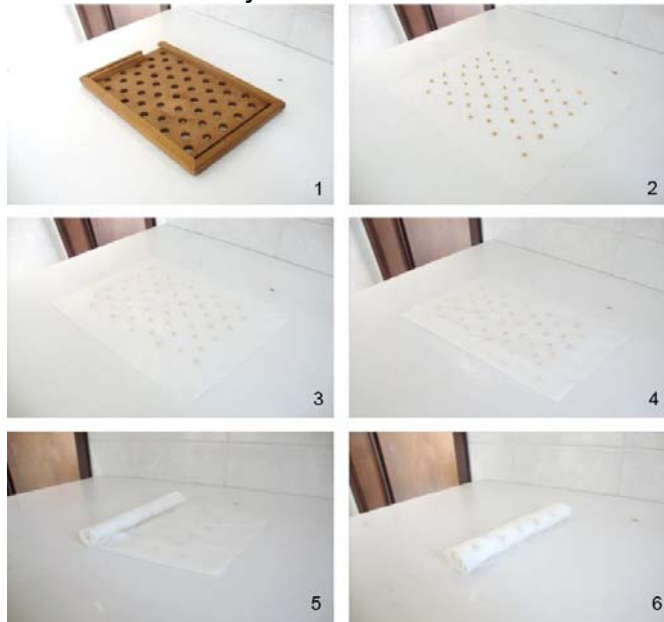
### 4.2 PREPARO DA AMOSTRA E PROCESSO DE GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE SOJA

Para eliminação de grãos danificados, manchados ou qualquer material estranho, as sementes de soja foram previamente selecionadas e em seguida submetidas à germinação em papel de germinação (dimensões de 37,5 cm x 28,2 cm, Germitest). Cinquenta sementes foram dispostas, com auxílio de placas perfuradas, sobre dois papéis de germinação previamente umedecidos com água destilada. Em seguida, as sementes foram cobertas com outro papel de germinação umedecido, a borda inferior foi dobrada e o conjunto enrolado longitudinalmente para formar os rolos (Figura 8).

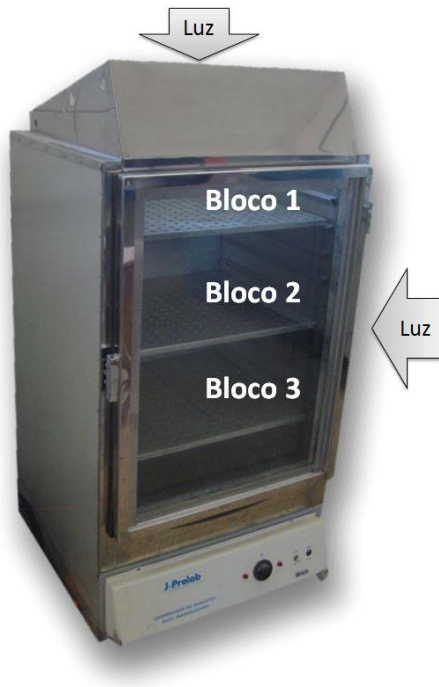
Para cada tempo de germinação (24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 144 h, 168 h), foram montados 45 rolos, os quais foram divididos em três blocos e colocados ao acaso em câmara de germinação (modelo Mangelsdorf, J. Prolab – São José dos Pinhais, PR) (Figura 9).

O processo de germinação foi realizado conforme descrito por Yoshiara et al. (2012a). Foi utilizado um período máximo de 168 h, com luz natural, temperatura constante de 35 °C ( $\pm 1$  °C) e 100 % de umidade (Figura 10). Para o estudo dos brotos de soja e os componentes hipocótilo e radícula, foi considerado o

**Figura 8** – Preparo de material e sementes de soja para o processo de germinação da soja



**Figura 9** – Câmara de germinação e os blocos experimentais

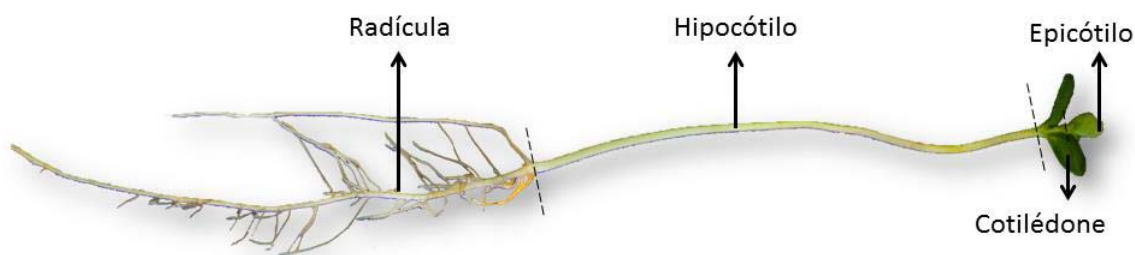


**Figura 10** – Desenvolvimento da soja BRS 284 germinada



tempo de germinação a partir de 48 h devido ao seu aparecimento. A temperatura utilizada foi baseada em estudos anteriores, onde foi obtida alta concentração de agliconas na cultivar de soja BRS 257 (YOSHIARA, 2012). As sementes de soja foram coletadas em cada tempo de germinação e uma quantidade suficiente para as análises foi separada manualmente entre os componentes cotilédones, radícula e hipocótilo (Figura 11). Os brotos de soja foram submetidos às análises físicas (comprimento, massa de 100 brotos, matéria seca de 100 brotos). Em seguida, os brotos de soja e seus componentes foram liofilizados até peso constante, triturados em moinho de facas (modelo A-11, Ika) e armazenados em sacos de polietileno a - 22 °C até o momento das análises. A determinação das diferentes formas de isoflavonas nos brotos de soja e seus componentes foi realizada em triplicata. Quando necessário, as sementes inteiras ou os componentes das sementes não germinadas foram utilizadas para comparação.

**Figura 11** – Componentes do broto de soja germinado por 168 h



### 4.3 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS

#### 4.3.1 Umidade

O teor de umidade das amostras liofilizadas foi realizado em estufa a 105 °C (IAL, 2008) para expressar os resultados em base seca.

#### 4.3.2 Extração e Quantificação de Isoflavonas por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE)

As amostras liofilizadas e moídas foram desengorduradas com *n*-hexano (1:10, m/v) à temperatura ambiente por 1 h com agitação contínua e rotativa de 200 rpm em mesa agitadora orbital, seguida por filtração à vácuo antes da extração de isoflavonas. Em seguida, 2 mL de solução extratora (água, etanol e acetona, 1:1:1, v/v/v) foram adicionados em 100 mg de amostra desengordurada e agitados em vórtex a cada 15 min por 1 h à temperatura ambiente. Logo após, a mistura foi colocada em banho ultrassônico por 15 min à temperatura ambiente conforme a metodologia descrita por Yoshiara et al. (2012b). Em seguida, o extrato foi centrifugado (4° C, 794 x *g*, 15 min; Eppendorf centrifuge 580R, Hamburg, Alemanha) e o sobrenadante filtrado em membradas hidrofílicas de PVDF com tamanho de poro de 0,22 µm (Millex-GV, Millepore, Billerica, MA, EUA) e, então, aplicado no cromatógrafo líquido de ultra eficiência.

A separação e quantificação das isoflavonas por CLUE foi realizada de acordo com metodologia descrita por Handa et al. (2014), utilizado o cromatógrafo UPLC® (Acquity UPLC® System, Waters, EUA), equipado com injetor automático de amostras, bomba quaternária, forno com temperatura controlada de

35 °C e detector com arranjo de diodos (DAD), controlado pelo software Empower 3. A eluição das amostras foi conduzida em coluna de fase reversa Acquity™ UPLC BEH 18 (50 mm x 2,1 mm diâmetro interno; 1,7 µm de diâmetro de partícula; Waters), com fase móvel constituída de um sistema gradiente binário, com fase inicial de 90 % de solução aquosa de ácido acético pH 3 (solvente A) e 10 % de acetonitrila (solvente B). Em 8 min de eluição, foi atingida uma proporção de 0 % do solvente A e 100 % do solvente B, retornando às condições iniciais em 9 min. O tempo total de corrida foi de 10 min. A vazão da fase móvel foi de 0,7 mL/min e o sistema de detecção foi constituído por um detector com arranjo de diodos (DAD Waters), ajustado ao comprimento de onda de 260 nm. Para cada amostra, foram realizadas três corridas cromatográficas.

A curva de calibração (área do pico x concentração de isoflavona) foi construída de acordo com Handa et al. (2014) utilizando soluções padrões de daidzina, genistina, glicitina malonildaidzina, malonilgenistina, malonilglicitina, acetildaidzina, acetilgenistina, acetilglicitina, genisteína e gliciteína (0,100, 0,025, 0,006 e 0,002 mg/mL) e daidzeína (0,100, 0,025, 0,006, 0,002 e 0,001 mg/mL). As soluções padrões de cada forma de isoflavona foram injetadas em triplicata para obtenção dos cromatogramas correspondentes. A identificação de cada forma de isoflavona nos cromatogramas foi realizada por comparação dos espectros de absorção e tempos de retenção dos seus respectivos padrões. A quantificação foi realizada com base na curva de calibração da respectiva forma de isoflavonas. Os resultados das diferentes formas de isoflavonas e da somatória de todas as formas de isoflavonas foram expressos em µmol da respectiva forma de isoflavona g<sup>-1</sup> de amostra em base seca e desengordurada.

#### 4.3.3 Medidas Físicas dos Brotos de Soja

Para quantificar a massa de 100 sementes, estas foram coletadas aleatoriamente e pesadas em balança analítica. Para determinar o percentual de cada componente da semente, foram utilizados 100 g de sementes e os seus componentes (cotilédone, eixo embrionário e casca) foram separados manualmente, e pesados em balança analítica.

Para as análises físicas de comprimento, massa de 100 brotos e matéria seca de 100 brotos, foram utilizadas amostras de 20 brotos por bloco. Para

medir o comprimento dos brotos, foi utilizado o software Foxit Reader versão 6.0. Assim, os brotos foram fotografados e o comprimento total foi determinado pela medida entre a extremidade da raiz até a extremidade do epicótilo e expresso em centímetros. Para determinar a massa de 100 brotos, foi utilizada balança analítica e os resultados expressos em gramas por 100 brotos. Para determinação da umidade e da matéria seca, os brotos foram liofilizados até peso constante, triturados em moinho de facas (marca Ika, modelo A-11) e em seguida submetidos à análise de umidade em estufa a 105 °C. O rendimento dos brotos de soja germinados foi calculado pela relação entre a massa de 100 brotos e a massa de 100 sementes e multiplicado por 100. Todas as análises físicas foram realizadas em triplicata.

#### 4.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para o processo de germinação, foi utilizado o delineamento experimental de blocos completos casualizados com três replicatas em cada tempo de germinação. Os resultados das diferentes formas de isoflavonas na semente de soja e seus componentes foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Os resultados das análises físicas e diferentes formas de isoflavonas dos brotos de soja e seus componentes foram submetidos à análise de regressão entre tempo de germinação e umidade, comprimento dos brotos, massa de 100 brotos, matéria seca de 100 brotos, teor das diferentes formas de isoflavonas com auxílio do software Statistica 10.0 (STATSOFT, INC. 2011) e utilizando todos os dados experimentais.

## REFERÊNCIAS

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.

ANDERSEN, O. M.; JORDHEIM, M. The Antocianins. In: ANDERSEN, O.; MARKHAM, K. (Eds.). **Flavonoids. Chemistry, Biochemistry and Applications**. Boca Ratón: CRC Press, 2006. p. 471-551.

ANVISA. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos**. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/novos\\_alimentos.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/novos_alimentos.htm)>. Acesso em: 4 fev. 2014a.

ANVISA. **Sistema de perguntas e respostas – FAQ**. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br/faqdinamica/index.asp?Secao=Usuario&usersecoes=36&userassunto=136>>. Acesso em: 4 fev. 2014b.

ATKINSON, C.; FRANKENFELD, C. L.; LAMPE, J. W. Gut bacterial metabolism of the soy isoflavone daidzein: exploring the relevance to human health. **Experimental Biology and Medicine (Maywood)**, v. 230, n. 3, p. 155-170, 2005.

ATTERITANO, M.; MAZZAFERRO, S.; FRISINA, A.; CANNATA, M. L.; BITTO, A.; D'ANNA, R.; SQUADRITO, F.; MACRÌ, I.; FRISINA, N.; BUEMI, M. Genistein effects on quantitative ultrasound parameters and bone mineral density in osteopenic postmenopausal women. **Osteoporos International**, v. 20, n. 11, p. 1947-1954, 2009.

BATES, R. P.; MATTHEWS, R. F. Ascorbic Acid and  $\beta$ -carotene in Soybeans as Influenced by Maturity, Sprouting, Processing and Storage. **Florida State horticultural society**, v. 88, p. 266-271, 1975.

BAU, H.-M.; VILLAUME, C.; CHANDRASIRI, V.; NICOLASAND, J.P.; MÉJEAN, L. Effects of germination on composition and nutritive-value of soybean seeds in rat. **Sciences des aliments**, v. 14, n. 5, p. 683-689, 1994.

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

BEWLEY, J. D.; BLACK, A. M. **Seeds - Physiology of development and germination**. New York: Plenum Press. 2<sup>a</sup>ed., 1994. 445 p.

BOUHNİK, Y.; RASKINE, L.; CHAMPION, K.; ANDRIEUX, C.; PENVEN, S.; JACOBS, H.; SIMONEAU, G.. Pro-longed administration of low-dose inulin stimulates the growth of bifidobacteria in humans. **Nutrition Research**, v. 27, n. 4, p. 187-193. 2007.

BRASIL. Resolução nº19, de 30 de abril de 1999. Regulamento Técnico de procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem. **Diário Oficial da União, Brasília, DF, nº 41-E, 03 maio 1999. Seção 1, p. 11**

BROUNS, F. Soya isoflavones: a new and promising ingrediente for the health food sector. **Food Research International**, v. 35, n. 2, p. 187-193, 2002.

CARRAO-PANIZZI, M. C.; BERHOW, M.; MANDARINO, J. M. G.; OLIVEIRA, M. C. N. de. Environmental and genetic variation of isoflavone content of soybean seeds grown in Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 11, p. 1444-1451, 2009.

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

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

CHAN, Y-H.; LAU, K-K.; YIU, K-H.; LI, S-W.; CHAN, H-T.; TAM, S.; SHU, X-O.; LAU, C-P.; TSE, H-F. Isoflavone intake in persons at high risk of cardiovascular events: implications for vascular endothelial function and the carotid atherosclerotic burden. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 86, p. 938-945, 2007.

CHANDRASIRI, V.; BAU, H. M.; VILLAUME, C.; GIANNANGELI, F.; LORIENT, D.; MEJEAN, L. Effet de la germination de la graine de soja sur la composition et la valeur nutritionnelle de sa farine. **Science des aliments**, v. 7, n. 8, p. 139-150, 1987.

CHANDRASIRI, V.; BAU, H.M.; VILLAUME C.; GIANNANGELI F.; MÉJEAN. L. Effect of germinated and heated soybean meals on plasma cholesterol and triglycerides in rats. **Reproduction Nutrition Development**, v. 30, p. 611-618, 1990.

CHANG, L.-J.; QIU, R.-Z. The Origin and History of Soybean. In: SINGH, G. **The soybean botany, production and uses**. Wallingford: CABI, 2010. p. 1-24.

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

CONAB. **Indicadores da Agropecuária**. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11\\_03\\_31\\_11\\_13\\_07\\_ia-mar-2011..pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_03_31_11_13_07_ia-mar-2011..pdf)>. Acesso em: 4 fev. 2014b.

CONAB. **Séries históricas**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1252&t=2>>. Acesso em: 4 fev. 2014a.

DAY, A. J.; DU PONT, M. S.; RIDLEY, S.; RHODES, M.; RHODES, M. J.; MORGAN, M. R.; WILLIAMSON, G. Review of the factors affecting bioavailability of soy isoflavones in humans. **Nutrition and Cancer**, v. 57, n. 1, p. 1-10, 1998.

DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. U.S. Food and Drug Administration. Food labeling: health claims, soy protein and coronary heart disease. **Federal Register**, v. 64, n. 206, p. 57699-57733, 1999.

DIA, V. P.; GOMEZ, T.; VERNAZA, G.; BERHOW, M.; CHANG, Y. K.; MEJIA, E. G. Bowman-Birk and Kunitz protease inhibitors among antinutrients and bioactives modified by germination and hydrolysis in Brazilian soybean cultivar BRS 133. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 30, n. 32, p. 7886-7894, 2012.

DIXON, R. A.; FERRERIA, D. Genestein. **Phytochemistry**, v. 60, n. 3, p. 205-211, 2002.

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.

EMBRAPA. **A Soja**. Disponível em:

<[http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op\\_page=22&cod\\_pai=16](http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=22&cod_pai=16)>. Acesso em: 4 fev. 2014a.

EMBRAPA. **Cultivares de soja: Regiões sul e central do Brasil 1010/2011**. 1ª ed., Londrina: Embrapa Soja, 2010. 62 p.

EMBRAPA. **No Brasil**. Disponível em:

<[http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?cod\\_pai=13&op\\_page=113](http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?cod_pai=13&op_page=113)>. Acesso em: 4 fev. 2014c.

EMBRAPA. **Soja: alimentação e saúde e novos usos**. Disponível em:

<<http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2010/maio/4a-semana/soja-alimentacao-e-saude-e-novos-usos/>> Acesso em: 4 fev. 2014b.

ESPINOSA-MARTOS, I.; RUPÉREZ, P. Soybean oligosaccharides: Potential as new ingredients in functional food. **Nutrición Hospitalaria**, v. 21, n. 1, p. 92-96, 2006.

FERGUSON, B. J.; MATHESIUS, U. Signaling interactions during nodule development. **Journal of Plant Growth Regulator**, v. 22, p. 47-72, 2003.

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.

FLEURY, Y.; WELTI, D. H.; PHILLIPPOSIAN, G.; MAGNOLATO, D. Soybean (Malonyl) Isoflavones: Characterization and Antioxidant Properties, In: HUANG, M.-T.; HO, C.-T.; LEE, C.Y. **Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health**, Washington: American Chemical Society, 1992. v. 2, p. 98-113.

GARCÍA, P.; PRIMO, A. Germinación de las semillas. In: AZCON, J.; AZCÓN-BIETO, J.; TALÓN, M. **Fisiología y bioquímica vegetal**, 1ªed. Espana: MacGraw-Hill, 1993. p. 539.

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

GRAHAN, T. L. Flavonoid and isoflavonoid distribution in developing soybean seedling tissues and in seed and root exudates. **Plant Physiology**, v. 95, p. 594-603, 1991.

GUTIERREZ-GONZALEZ, J. J.; WU, X.; ZHANG, J.; LEE, J. D.; ELLERSIECK, M.; SHANNON, J. G.; YU, O.; NGUYEN, H. T.; SLEPER, D. A. Genetic control of soybean seed isoflavone content: importance of statistical model and epistasis in complex traits. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 119, n. 6, p. 1069-1083, 2009.

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

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.

JUNG, W.; YU, O.; LAU, S.-M. C.; O'KEEFE, D. P.; ODELL, J.; FADER, G.; MCGONIGLE, B. Identification and expression of isoflavona synthase, the key enzyme for biosynthesis of isoflavones in legumes. **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 208-212, 2000.

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

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

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

KUMUDINI, S. Soybean growth and development. In: SINGH, G. **The soybean botany, production and uses**. Wallingford: CABI, 2010. p. 48-73.

LABOURIAU, L. G. **A germinação das sementes**. Washington: Secretaria Geral da Organização dos Estados Americanos, 1983. 171 p.

LATUNDE-DADA, A. O.; CABELLO-HURTADO, F.; CZITTRICH, N.; DIDIERJEAN, L.; SCHOPFER, C.; HERTKORN, N.; WERCK-REICHART, D.; EBEL, J. Flavonoid 6-hydroxylase from soybean (*Glycine max*L.), a novel plant P-450 monooxygenase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 1685-1688, 2001.

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.

LEPHART, E. D.; SETCHELL, K. D.; HANDA, R. J.; LUND, T. D. Behavioral effects of endocrine-disrupting substances: phytoestrogens. **Institute for Laboratory Animal Research Journal**, v. 45, n. 4, p. 443-454, 2004.

LETHABY, A.; BROWN, J.; MARJORIBANKS, J.; KRONENBERG, F.; ROBERTS, H.; EDEN, J. Phytoestrogens for vasomotor menopausal symptoms. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 4, 2007. CD001395.

LIU, K. **Soybeans as functional foods and ingredients**, Champaign: AOCS Press, 2004. 331 p.

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

LOZOVAYA, V. V.; LYGIN, A. V.; ZERNOVA, O. V.; ULANOV, A. V.; LI, S.; HARTMAN, G. L.; WIDHOLM, J. M. Modification of phenolic metabolism in soybean hairy roots through down regulation of chalcone synthase or isoflavone synthase. **Planta**, v. 225, n. 3, p. 665-679, 2007.

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

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq, 2005. 495 p.

MARTÍN-CABREJAS, M. A.; DÍAZ, M. F.; AGUILERA, Y.; BENÍTEZ, V.; MOLLÁ, E.; ESTEBAN, R. M. Influence of germination on the soluble carbohydrates and dietary fibre fractions in non-conventional legumes. **Food Chemistry**, v. 107, n. 3, p. 1045-1052, 2008.

MATTHIES, A.; CLAVEL, T.; GUTSCHOW, M.; ENGST, W.; HALLER, D.; BLAUT, M.; BRAUNE, A. Conversion of daidzein and genistein by an anaerobic bacterium newly isolated from the mouse intestine. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 15, p. 4847-4852, 2008.

MENEZES, N. L. de; GARCIA, D. C.; RUBIN, S. de A. L.; BERNARDI, G. E. Caracterização de vagens e sementes de soja. **Ciência Rural**, v. 27, n. 3, p. 387-391, 1997.

MESSINA, M. J. Soyfoods: Their role in disease prevention and treatment. In: LIU, K. S. **Soybeans Chemistry, Technology, and Utilization**. New York: Chapman & Hall, 1997. 532 p.

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

- MESSINA, M.; MESSINA, V.; SETCHELL, K. D. R. **The Simple Soybean and Your Health**. New York: Avery Publishing Group, 1994. 260 p.
- MESSINA, M.; WOOD, C. Soy isoflavones, estrogen therapy, and breast cancer risk: Analysis and commentary. **Nutrition Journal**, v. 7, p. 1-11, 2008.
- METIVIER, J. R. Dormência e germinação. In: FERRI, M.G. (Coord.) **Fisiologia Vegetal**. Sao Paulo: EDUSP, 1979. p 343-392. v. 2
- MISHRA, S. K.; VERMA, V. D. Soybean genetic resources. In: SINGH, G. **The soybean botany, production and uses**. Wallingford: CABI, 2010. p. 74-91.
- MOSTAFA, M .M.; RAHMA, E.H.; RADY, A.H. Chemical and nutritional changes in soybean during germination. *Food Chemistry*, v. 23, n. 4, p. 257-275, 1987.
- PARK, Y. K.; AGUIAR, L. C.; ALENCAR, S. M.; MASCARENHAS, H. A. A.; SCAMPARINI, A. R. P. Avaliação do teor de isoflavonas em soja brasileira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas**, v. 3, n. 3, p. 156-160, 2001.
- 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, 2010a.
- PAUCAR-MENACHO, L. M.; BERHOW, M. A.; MANDARINO, J. M. G.; MEJIA, E. G.; CHANG, Y. K. Optimisation of germination time and temperature on the concentration of bioactive compounds in Brazilian soybean cultivar BRS 133 using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 119, p. 636-642, 2010b
- PETERBAUER, T. R.; RICHTER, A. Biochemistry and physiology of raffinose family oligosaccharides and galactosil cyclitols in seeds. **Seed Science Research**, v. 11, p. 185-197, 2001.
- PHOMMALTH, S.; JEONG, Y-S.; KIM, Y-H.; HWANG, Y-H. Effect of light treatment on Isoflavone content of germinated soybean seeds. , v. 56, p. 10123-10128, 2008a.
- 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, 2008b.
- PUEPPKE, S. G.; BOLANOS-VASQUEZ, M. C.; WERNER, D.; BECFERTE, M. P.; PROME, J. C.; KRISHNAN, H. B. Release of flavonoids by the soybean cultivars McCall and Peking and their perception as signals by the nitrogen-fixing symbiont *Sinorhizobium fredii*. **Plant Physiology**, v. 117, p. 599-608, 1998.
- RAGHUVANSHI, R. S.; BISHT, K. Uses of soybean: Products and preparation. In: SINGH, G. **The soybean botany, production and uses**. Wallingford: CABI, 2010. p. 404-426.
- RAMADAN E. A. Effect of Processing and Cooking Methods on the Chemical Composition, Sugars and Phytic Acid of Soybeans. **Food and Public Health**. v. 2, p. 11-15, 2012.

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

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

ROSTAGNO, M. A.; PALMA, M.; BARROSO, C. G. Short-term stability of soy isoflavones extracts: Sample conservation aspects. **Food Chemistry**, v. 93, n. 3, p. 557-564, 2005.

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

SETCHELL, K. D.; BROWN, N. M.; LYDEKING-OLSEN E. The clinical importance of the metabolite equol - a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. **Journal of Nutrition**, v. 132, n. 12, p.3577-3584, 2002.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos**: propriedades de degradao, modificao. São Paulo: Varela, 1996. 517 p.

SHI, H.; NAM, P.; MA, A. Comprehensive Profiling of Isoflavones, Phytosterols, Tocopherols, Minerals, Crude Protein, Lipid, and Sugar during Soybean (*Glycine max*) Germination. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 4970-4976, 2010.

SILVA, C. E. da; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; MANDARINO, J. M. G.; LEITE, R. S.; MNACO, A. P. do A. Teores de isoflavonas em grãos inteiros e nos componentes dos grãos de diferentes cultivares de soja (*Glycine max* (L.) Merrill). **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 2, p. 150-156. 2012.

SONG, K. B.; ATKINSON, C.; FRANKENFELD, C. L.; JOKELA, T.; WAHALA, K.; THOMAS, W. K.; LAMPE, J. W. Prevalence of daidzein-metabolizing phenotypes differs between Caucasian and Korean American women and girls. **Journal of Nutrition**, v. 136, n. 5, p. 1347-1351, 2006.

STATSOFT, INC. (2011). STATISTICA (data analysis software system), version 10. [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com).

SUGIYAMA, A.; SHITAN, N.; YAZAKI, K. Involvement of a soybean ATP-binding cassette-type transporter in the secretion of genistein, a signal flavonoid in legume-Rhizobium symbiosis. **Plant Physiology**, v. 144, p. 2000-2008, 2007.

SUZUKI, H.; TAKAHASHI, S.; WATANABE, R.; FUKUSHIMA, Y.; FUJITA, N.; NOGUCHI, A.; YOKOYAMA, R.; NISHITANI, K.; NISHINO, T.; NAKAYAMA, T. An isoflavone conjugate-hydrolyzing  $\beta$ -glucosidase from the roots of soybean (*Glycine max*) seedlings: purification, gene cloning, phylogenetics, and cellular localization. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 40, p. 30251-30259, 2006.

TNAU AGRITECH PORTAL. **About Seed**. Disponível em:  
<<http://agritech.tnau.ac.in/seed/seedconcepts.html#about>>. Acesso em 2 set. 2012.

TSUKAMOTO, C.; SHIMADA, S.; IGITA, K.; KUDOU, S.; KOKUBUN, M.; OKUBO, K.; KITAMURA, K.. Factors Affecting Isoflavone Content in Soybean Seeds: Changes in Isoflavones, Saponins, and Composition of Fatty Acids at Different Temperatures during Seed Development. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n. 5, p.1184-1192, 1995.

UNIVERSITY OF MINNESOTA. **Soybean Growth and Development & Management Information for Replant Decisions**. Disponível em:  
<<http://www.extension.umn.edu/distribution/cropsystems/components/5701a.html>>. Acesso em: 2 set 2012.

USDA. **Circular Series WAP 09-13**. Disponível em:  
<<http://www.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf>>. Acesso em: 4 fev. 2014b.

USDA. **Commodity Markets and the USDA Agricultural Projections to 2020**. Disponível em:  
<[http://www.ciat.cgiar.org/work/latinamerica/Documents/Commodity\\_Markets\\_and\\_the\\_USDA\\_Agricultural\\_projections\\_to\\_2020.pdf](http://www.ciat.cgiar.org/work/latinamerica/Documents/Commodity_Markets_and_the_USDA_Agricultural_projections_to_2020.pdf)> Acesso em 4 fev. 2014a.

USDA. **USDA database for the isoflavone content of selected foods-release 2.0**. 2008. Disponível em:  
<[http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/12354500/Data/isoflav/Isoflav\\_R2.pdf](http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/12354500/Data/isoflav/Isoflav_R2.pdf)>. Acesso em: 10 jul. 2012.

VALLS, J.; MILLÁN, S.; MARTÍ, M. P.; BORRÀSA, E.; AROLA, L. Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 7143-7172, 2009.

VERNETTI, F. de J. **Produção de sementes de soja**. I. Caracterização de cultivares. Pelotas: EMBRAPA/UFPEl, 1983. 36p.

VITALE, D. C.; PIAZZA, C.; MELILLI, B.; DRAGO, F.; SALOMONE, S. Isoflavones: estrogenic activity, biological effect and bioavailability. **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 38, n. 1, p. 15-25, 2013.

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.; 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.

- WANGEN, K. E.; DUNCAN, A. M.; XU, X. KURZER, M. S. Soy isoflavones improve plasma lipids in normocholesterolemic and mildly hypercholesterolemic postmenopausal women. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, n. 2, p. 225-231, 2001.
- WEGULO, S. N.; YANG, X.-B.; MARTINSON, C. A.; MURPHY, P. A. Effects of wounding and inoculation with *Sclerotinia sclerotiorum* on isoflavone concentrations in soybean. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 85, p. 749-760, 2005.
- WEI, P.; MING L.; YAN C.; DE-CAI C., Systematic review of soy isoflavone supplements on osteoporosis in women, **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 5, n. 3, p. 243-248, 2012.
- WESTON, L. A.; MATHESIUS, U. Flavonoids: their structure, biosynthesis and role in the rhizosphere, including allelopathy. **Journal of Chemical Ecology**, v. 39, n. 2, p. 283-297, 2013.
- WILLIAMSON-HUGHES, P. S.; FLICKINGER, B. D.; MESSINA, M. J.; EMPIE, M. W. Isoflavone supplements containing predominantly genistein reduce hot flash symptoms: a critical review of published studies. **Menopause**, v. 13, n. 5, p. 831-839, 2006.
- WOLF, W. J.; COWAN, J. C. (Ed.). **Soybeans as a food source**. 2ed. Cleveland: CRC Press, 1975. 120 p.
- WONG, E.; FLUX, D.S. Estrogenic activity of red clover isoflavones and some of their degradation products, **Journal of Endocrinology**, v. 24, p. 341-348, 1962.
- WOODMANSEY, E. J. Intestinal bacteria and ageing. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, p. 1178-1186, 2007.
- XU, B. J.; CHANG, S. K. C. Total phenolics, phenolic acids, isoflavonoids, and anthocyanins and antioxidant properties of yellow and black soy beans as affected by thermal processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 7165-7175, 2008.
- YOSHIARA, L. Y. **Isoflavonoides e  $\beta$ -glicosidase de soja: germinação, otimização da extração, hidrólise e conversão em agliconas e atividade antioxidante**. 2012. 200 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
- 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. 63, n. 8 9, p. 978-986, 2012b.
- YOSHIARA, L. Y.; MADEIRA, T. B.; RIBEIRO, M. L. L.; MANDARINO, J. M. G.; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; IDA, E. I.  $\beta$ -glucosidase activity of soybean (*Glycine max*) embryonic axis germinated in the presence or absence of light. **Journal of Food Biochemistry**, v. 36, n. 6, 2012a

YU, O.; SHI, J.; HESSION, A. O.; MAXWELL, C. A.; MCGONIGLE, B.; ODELL, J. T. Metabolic engineering to increase isoflavone biosynthesis in soybean seed. **Phytochemistry**, v. 63, n. 7, p. 753-763, 2003.

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

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

## **6 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os Resultados e Discussão foram descritos na forma de dois artigos científicos conforme seguem. Os manuscritos foram traduzidos para o inglês e formatados para submissão nos periódicos Food Chemistry e Journal of Agricultural and Food Chemistry.

## 6.1 ARTIGO CIENTÍFICO 1: PARÂMETROS FÍSICOS E EFEITO DO TEMPO DE GERMINAÇÃO SOBRE O TEOR E FORMA DE ISOFLAVONAS DE BROTOS DE SOJA

Submetido no Food Chemistry.

### PARÂMETROS FÍSICOS E O EFEITO DO TEMPO DE GERMINAÇÃO SOBRE O TEOR E FORMA DE ISOFLAVONAS DE BROTOS DE SOJA

Quinhone Júnior, A<sup>a</sup>, Ida, E. I<sup>a,b</sup>

**RESUMO:** O objetivo deste trabalho foi avaliar os parâmetros físicos e o efeito do tempo de germinação sobre o teor e formas de isoflavonas dos brotos de soja da cultivar BRS 284. As sementes foram germinadas por 168 h a 35 °C e os brotos coletados em intervalos de 24 h. Foram avaliados os parâmetros físicos e teor de diferentes formas de isoflavonas das sementes e dos brotos de soja e os dados submetidos à análise de regressão. A semente de soja apresentou 26,0 % de  $\beta$ -glicosídeos, 72,9 % de malonilglicosídeos e 1,2 %, de agliconas. O rendimento dos brotos de soja foi de 632,4 % após 168 h de germinação. O efeito do tempo de germinação foi quadrático no comprimento, umidade e na concentração de daidzina, genistina e genisteína, linear na massa úmida e na concentração de malonildaidzina. A matéria seca e a concentração de malonilglicetina mantiveram-se constantes e a glicetina e gliciteína não foram detectadas nos brotos.

**Palavras chave:** Broto de soja. Agliconas. Moyashi. Plântula.

### INTRODUÇÃO

Durante a domesticação da soja, os chineses gradualmente transformaram as sementes de soja em várias formas de alimentos mais versáteis, saborosos e digestíveis, dentre estes, os mais populares são o tofu, molho, pasta e brotos de soja (LIU, 2008). Os brotos, muitas vezes conhecidos como *moyashi*, são considerados como alimentos saudáveis e naturais em inúmeras partes do mundo (MWIKYA et al., 2001). O broto de soja é uma importante fonte vegetal, rica em nutrientes, disponível durante todo ano e consumida por milhares de anos em países como Coréia, China e Japão (LEE et al., 2002). O aumento da demanda por brotos

---

<sup>a</sup> Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, 86057-970, Londrina, PR, Brasil

<sup>b</sup> Autor correspondente. Tel.: +55 43 3371 5971; fax: +55 43 3371 4080. E-mail: elida@uel.br (E.I. Ida).

de soja tem sido atribuído pelo interesse renovado pelos alimentos funcionais (KIM et al, 2005).

A germinação das sementes é um processo biológico natural complexo que envolve reações catabólicas, como hidrólise de substâncias de reserva, e anabólicas como síntese de enzimas e reparo dos constituintes celulares para produção de novas células do embrião (METIVIER, 1979; ABDUL-BAKI, 1980). Este processo pode ser utilizado para melhorar a qualidade sensorial (LIU, 2008) e o valor nutritivo (PAUCAR-MENACHO et al., 2010a; KIM et al., 2013) das sementes de soja, pois reduz o teor de substâncias indesejáveis como o ácido fítico (RIBEIRO; IDA; OLIVEIRA, 1999; RAMADAN, 2012), oligossacarídeos (KIM et al., 2005; MARTÍN-CABREJAS et al., 2008), inibidores de tripsina e atividades das lipoxigenases (PAUCAR-MENACHO et al., 2010a). Ainda, a germinação pode promover um aumento significativo no teor de vitaminas como o ácido ascórbico, riboflavina e tiamina (AHMAD; PATHAK, 2000), fitosteróis e tocoferóis (SHI; NAM; MA, 2010), isoflavonas (KIM et al., 2006; LEE et al., 2007; PHOMMALTH et al., 2008b) ou as isoflavonas agliconas (KIM et al., 2005; YUAN et al., 2009; PAUCAR-MENACHO et al., 2010a; SHI; NAM; MA, 2010).

A soja é a única espécie vegetal comestível que contém teor elevado de isoflavonas, e estas ocorrem em quatro classes químicas distintas denominadas de agliconas (daidzeína, genisteína e gliciteína),  $\beta$ -glicosídeos (daidzina, genistina e glicitina), malonilglicosídeos (6"-O-malonildaizina, 6"-O-malonilgenistina e 6"-O-malonilglicitina) e acetilglicosídeos (6"-O-acetildaizina, 6"-O-acetilgenistina e 6"-O-acetilglicitina) somando 12 formas diferentes de isoflavonas (LIU, 2004). No desenvolvimento da semente de soja, as isoflavonas daidzeína, genisteína e gliciteína são sintetizadas pela rota metabólica fenilpropanoide e armazenadas nos vacúolos como isoflavonas  $\beta$ -glicosídeos e isoflavonas malonilglicosídeos (GRAHAM, 1991; KUDOU et al., 1991). Na semente de soja, os malonilglicosídeos contribuem com 68,0 % a 93,0 % do total de isoflavonas, seguida dos  $\beta$ -glicosídeos com 7,0 % a 33,0 %. Entretanto, as isoflavonas agliconas e acetilglicosídeos estão em baixas concentrações ou ausentes (TSUKAMOTO et al., 1995; PAUCAR-MENACHO et al., 2010a). A concentração de isoflavonas na semente de soja pode variar conforme a cultivar e safra (WANG; MURPHY, 1994; BERGER et al., 2008), época e local de cultivo (TSUKAMOTO et al., 1995), carga de patógenos no cultivo (WEGULO et al., 2005) e presença de eliciadores (AL-TAWAHA et al., 2005).

A ingestão de isoflavonas está associada a benefícios à saúde humana tais como efeito protetor contra a perda óssea em mulheres na pós-menopausa (ATTERITANO et al., 2009), prevenção de doenças cardiovasculares (CHAN et al., 2007), alívio dos sintomas da menopausa (WILLIAMSON-HUGHES et al., 2006) e efeito protetor contra o desenvolvimento de câncer de mama (WADA et al., 2013) e de próstata (DONG et al., 2013).

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os parâmetros físicos e o efeito do tempo de germinação até 168 h a 35 °C sobre o teor e formas de isoflavonas dos brotos de soja da cultivar BRS 284.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **MATÉRIA PRIMA E REAGENTES.**

A semente de soja tipo convencional BRS 284 (safra 2011/12) foi cedida por uma empresa especializada da região e utilizada como matéria prima. Esta cultivar apresenta tamanho médio de 14,60 g 100 sementes<sup>-1</sup>, 38,7 % de proteína, 20,4 % de lipídios e é indicada para processamento industrial (EMBRAPA, 2010). Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de pureza analítica e de diferentes procedências.

### **DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DO PROCESSO DE GERMINAÇÃO**

Antes da germinação, as sementes de soja foram selecionadas eliminando as sementes danificadas, manchadas ou materiais estranhos. No processo de germinação foram utilizadas duas folhas de papel de germinação (dimensões de 37,5 cm x 28,2 cm, Germitest) previamente umedecidas com água destilada. Com auxílio de uma placa perfurada foram colocadas 50 sementes. Em seguida, as sementes foram cobertas com outro papel de germinação umedecido e a borda inferior foi dobrada e o conjunto enrolado longitudinalmente para formar os rolos.

Para avaliar o efeito do tempo de germinação da semente de soja sobre as características físicas e o teor das diferentes formas de isoflavonas nos brotos de soja foi utilizado o delineamento experimental de blocos completos

casualizados com três repetições. Foram utilizados 15 rolos para cada bloco e tempo de germinação de 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 144 h e 168 h. O processo de germinação foi realizado em câmara de germinação (modelo Mangelsdorf, J. Prolab - São José dos Pinhais, PR, BR), a 35 °C ( $\pm 1$  °C), com luz natural e 100 % de umidade até 168 h conforme Yoshiara et al. (2012a). O efeito do tempo de germinação sobre os parâmetros físicos e teor das diferentes formas de isoflavonas foi considerado somente a partir de 48 h de germinação, onde foi possível observar o início da formação do broto de soja. Para cada tempo de germinação, os rolos foram coletados ao acaso e os brotos de soja (Figura 1) avaliados quanto os parâmetros físicos. Em seguida, os brotos de soja foram liofilizados até peso constante, triturados em moinho de facas (modelo A-11, Ika), mantidos em sacos de polietileno e armazenados a -22 °C até a quantificação do teor das isoflavonas. A semente de soja não germinada foi utilizada para comparação.

#### PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS

Para as medidas dos parâmetros físicos foram utilizados 20 brotos de soja por bloco e para cada tempo de germinação. Para medir o comprimento, os brotos foram fotografados e medidos utilizando o software Foxit Reader versão 6.0. O comprimento total foi determinado pela medida entre a extremidade da raiz até a extremidade do epicótilo e expresso em centímetros. Para determinar a massa de 100 brotos foi utilizada balança analítica e os resultados expressos em gramas por 100 brotos. Para determinação da umidade e matéria seca, os brotos foram liofilizados até peso constante, triturados em moinho de facas (modelo A-11, Ika) e o teor de umidade da amostra liofilizada determinado pelo método de estufa a 105 °C. O rendimento dos brotos de soja foi calculado pela relação entre a massa de 100 brotos e massa de 100 sementes, multiplicado por 100. Todas as medidas físicas foram realizadas em triplicata.

**Figura 1** – Desenvolvimento da soja BRS 284 germinada



A quantificação de isoflavonas foi realizada em triplicata por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE) conforme descrito por Handa et al. (2014). As amostras liofilizadas e moídas foram desengorduradas com *n*-hexano (1:10, m/v) por 1 h à temperatura ambiente por agitação contínua e rotativa seguida por filtração à vácuo. A extração de isoflavonas foi realizada em triplicata com 0,1 g de amostra desengordurada com 2 mL de solução extratora solução extratora contendo água, etanol e acetona (1:1:1, v/v/v) como descrito por Yoshiara et al. (2012b). As diferentes formas de isoflavonas e a somatória de todas as formas de isoflavonas foram expressas em  $\mu\text{mol}$  da respectiva forma de isoflavona  $\text{g}^{-1}$  de amostra em base seca e desengordurada.

#### ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos parâmetros físicos de umidade e comprimento dos brotos, massa de 100 brotos, matéria seca de 100 brotos e teor das diferentes formas de isoflavonas foram submetidos à análise de regressão para construção de modelos matemáticos utilizando todos os dados experimentais com o software Statistica 10.0 (STATSOFT, INC. 2011).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### PERFIL DE ISOFLAVONAS DA SEMENTE DE SOJA

Nas sementes de soja, a daidzina, genistina e glicitina representaram 7,1 %, 15,7 % e 3,2 % do total de isoflavonas, respectivamente (Tabela 1). Resultados similares para daidzina, genistina e glicitina foram descritos por Paucar-Menacho et al. (2010a) para a cultivar de soja BRS 258 que apresentou 7,0 %, 10,0 % e 3,0 %, respectivamente. Entretanto, Tsukamoto et al. (1995) observaram que do total de isoflavonas de sete variedades de soja, o percentual de  $\beta$ -glicosídeos foi entre 7,0 % e 33,0 % e a daidzina e genistina representaram, em média, 12,0 % e 4,0 %, respectivamente. Porém, Ribeiro et al. (2007) observaram que a soma de daidzina e genistina em 18 cultivares de soja representou 31,0 % do total de isoflavonas. Segundo Gutierrez-Gonzalez et al. (2009), a faixa de concentração de isoflavonas nos grãos de soja é muito ampla, mesmo em linhagens geneticamente estáveis que crescem em ambiente controlado. Assim, a síntese e acúmulo das isoflavonas dependem de inúmeros fatores bióticos e abióticos, tais como safra (WANG; MURPHY, 1994), época e local de cultivo (TSUKAMOTO et al., 1995) e carga de patógenos no local de cultivo (WEGULO et al., 2005).

Na soja BRS 284 (Tabela 1), observa-se uma predominância de malonilglicosídeos, sendo que as formas malonildaidzina, malonilgenistina e malonilglicitina representam 17,5 %, 47,2 % e 8,2 % do total de isoflavonas, respectivamente. O mesmo foi observado por Tsukamoto et al. (1995) em sete variedades de soja, cujo percentual de malonilglicosídeos em relação ao total de isoflavonas variou entre 67,0 % e 93,0 %, sendo que a malonildaidzina e a malonilgenistina representaram, em média 44,0 % e 41,0 %, respectivamente. As isoflavonas malonildaidzina e malonilgenistina predominaram em 18 cultivares de soja, e juntas contribuíram com 65,0 % do total de isoflavonas (RIBEIRO et al., 2007). A cultivar de soja BRS 258 apresentou, em relação ao total de isoflavonas, 26,0 %, 33,0 % e 10,0 % de malonildaidzina, malonilgenistina e malonilglicitina, respectivamente (PAUCAR-MENACHO et al., 2010a).

**Tabela 1** – Perfil de isoflavonas da soja BRS 284

Forma de isoflavona	Concentração ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ )	%
$\beta$ -Glicosídeos	2,273 $\pm$ 0,249	26,0%
Daidzina	0,618 $\pm$ 0,030	7,1%
Genistina	1,376 $\pm$ 0,192	15,7%
Glicitina	0,279 $\pm$ 0,031	3,2%
Malonilglicosídeos	6,381 $\pm$ 0,315	72,9%
Malonildaidzina	1,530 $\pm$ 0,124	17,5%
Malonilgenistina	4,132 $\pm$ 0,088	47,2%
Malonilglicitina	0,718 $\pm$ 0,109	8,2%
Agliconas	0,104 $\pm$ 0,004	1,2%
Daidzeína	nd	nd
Genisteína	0,104 $\pm$ 0,004	1,2%
Gliciteína	nd	nd
<b>Isoflavonas Totais</b>	<b>8,757 <math>\pm</math> 0,566</b>	<b>100,0%</b>

nd: não detectado

A genisteína foi a única aglicona detectada na soja BRS 284 (Tabela 1), e contribuiu com apenas 1,2 % do total de isoflavonas. As agliconas daidzeína e gliciteína e os acetilglicosídeos não foram detectados nesta cultivar de soja. As isoflavonas agliconas e os acetilglicosídeos de sete variedades de soja não foram detectados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (TSUKAMOTO et al., 1995). As isoflavonas daidzeína e genisteína apresentaram baixas concentrações em 18 cultivares de soja e, somadas, contribuíram com apenas 2,0 % do total de isoflavonas (RIBEIRO et al., 2007). Entretanto, Kim et al. (2005) observaram que as cultivares de soja Shinpaldal-2, Seoritae e Seomoktae apresentaram 3,0 %, 5,0 % e 12,0 % de isoflavonas agliconas em relação ao total de isoflavonas. Na cultivar de soja BRS 258, as agliconas representaram 11,0 % do total de isoflavonas, sendo que a daidzeína, genisteína e gliciteína contribuíram com 3,0 %, 7,0 % e 1,0 %, respectivamente (PAUCAR-MENACHO et al., 2010a).

#### EFEITO DO TEMPO DE GERMINAÇÃO SOBRE OS PARÂMETROS FÍSICOS DOS BROTOS DE SOJA

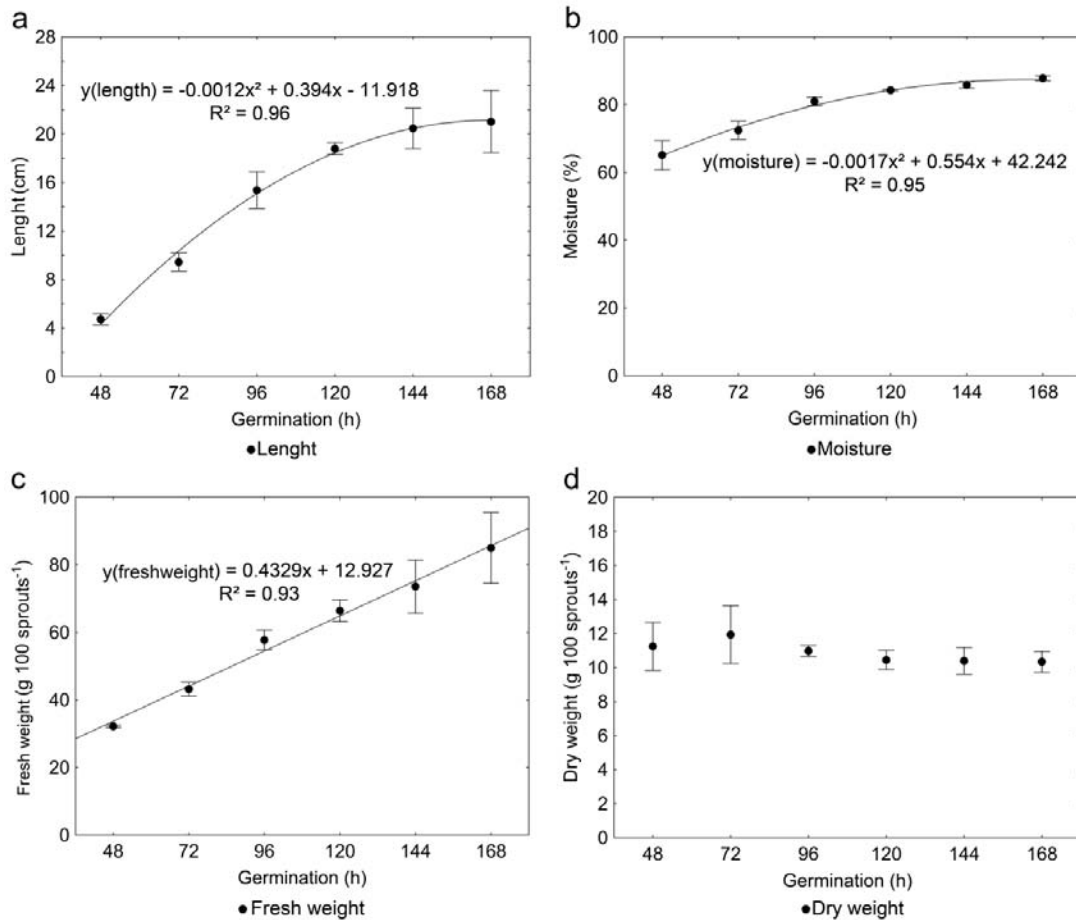
A massa de 100 sementes da soja BRS 284 foi de 13,44 g, cujo valor está próximo ao relatado pela Embrapa (2010). A análise de regressão do efeito do tempo de germinação sobre o comprimento dos brotos de soja BRS 284

(Figura 2a) indicou que o modelo quadrático apresentou um ótimo ajuste ( $R^2=0,96$ ,  $p<0,01$ ) aos dados experimentais. Assim, observa-se que o comprimento dos brotos de soja aumentou 4,0 vezes entre 48 h ( $4,72 \pm 0,46$  cm) e 120 h ( $18,79 \pm 0,49$  cm) e em seguida apresentou uma tendência de estabilização até 168 h ( $21,01 \pm 2,57$  cm). Este pequeno crescimento a partir de 120 h pode ser devido a menor disponibilidade de reservas nutritivas nesse período. Segundo Oliveira et al. (2013), o tempo de germinação e a frequência de irrigação influenciaram o tamanho dos brotos de soja, sendo que os brotos de soja da cultivar BRS 216 germinados por 120 h, 144 h e 168 h a  $27,5 \pm 5,1$  °C e irrigados a cada 4 h apresentaram 8,59 cm, 13,11 cm e 15,72 cm de comprimento, respectivamente. Entretanto, o comprimento de brotos de soja germinados por 72 h e 120 h a 25 °C e sem luz foi de apenas 1,86 cm e 3,84 cm, respectivamente (YUN et al., 2013). Estas diferenças no comprimento dos brotos podem ser atribuídas às diferenças entre cultivares e condições de germinação.

A análise de regressão do efeito do tempo de germinação sobre o percentual de umidade dos brotos de soja BRS 284 (Figura 1b) indicou que o modelo quadrático apresentou um ótimo ajuste ( $R^2=0,95$ ,  $p<0,01$ ) aos dados experimentais, sendo que o percentual de umidade dos brotos de soja aumentou com a germinação, atingindo maior valor de  $87,8 \pm 0,8$  % em 168 h. O teor de umidade de 82,0 % foi observado em brotos de soja germinado por 168 h a 25 °C (SHI; NAM; MA, 2010), enquanto que o teor de umidade de 90,9 %, 91,6 % e 82,2 % foi observado em feijão mungo-verde, mungo-preto e guandu-anão germinados por 144 h, respectivamente e o teor de 95,8 % em brotos de feijão comercial (*moyashi*) (MACHADO et al., 2009).

A análise de regressão do efeito do tempo de germinação na massa de 100 brotos (Figura 1c) indicou que o modelo linear apresentou um bom ajuste ( $R^2=0,93$ ,  $p<0,01$ ) aos dados experimentais, com aumento de 2,6 vezes na massa entre 48 h e 168 h de germinação. Considerando a massa inicial de 100 sementes de 13,44 g, o rendimento médio dos brotos em 120 h, 144 h e 168 h foi de 494,2 %, 547,3 % e 632,4 %, respectivamente. Entretanto, Oliveira et al. (2013) obtiveram menores rendimentos para brotos de soja BRS 216, ou seja, de 143,0 %, 172,0 % e 257,0 % após 120 h, 144 h e 168 h de germinação com irrigação e a 25 °C, respectivamente.

**Figura 2** – Efeito tempo de germinação sobre os parâmetros físicos de 100 brotos de soja BRS 284: (a) comprimento, (b) umidade, (c) massa e (d) matéria seca.



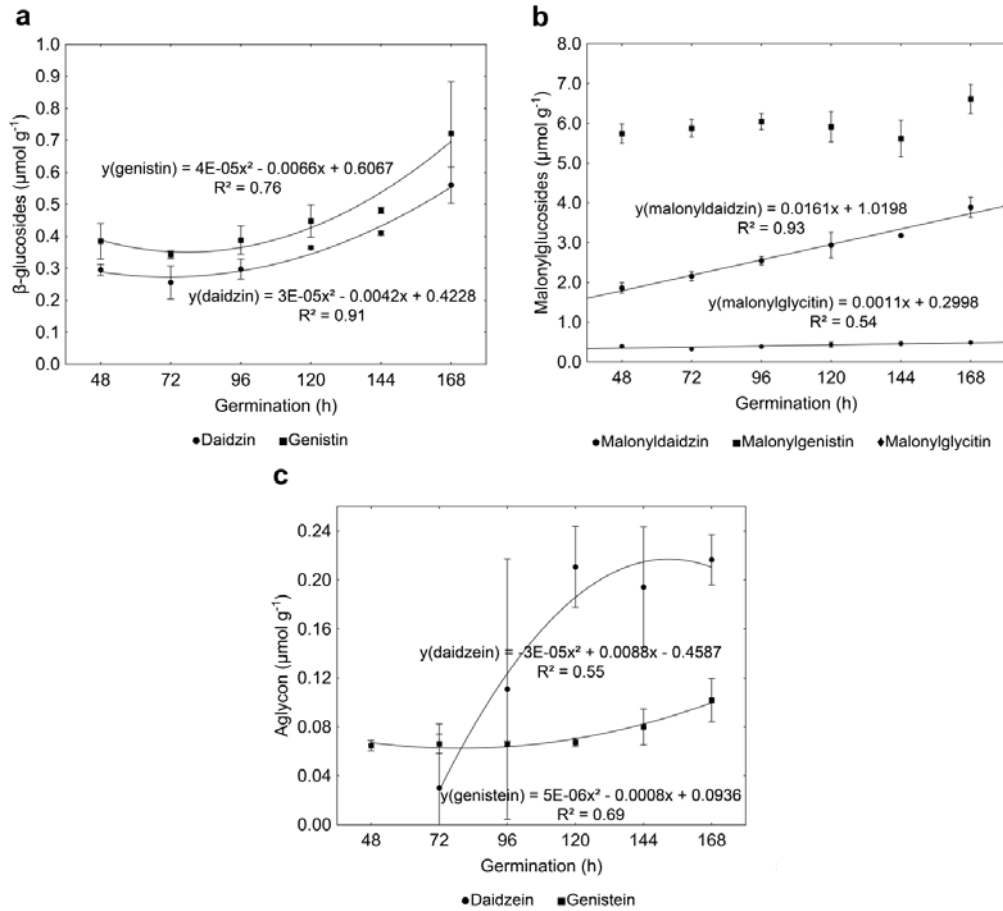
Por outro lado, a matéria seca de 100 brotos ( $p > 0,05$ ) manteve-se constante ( $10,89 \pm 0,63 \text{ g } 100 \text{ brotos}^{-1}$ ) ao longo do tempo de germinação e, portanto os modelos linear, quadrático ou cúbico não se ajustaram aos dados experimentais (Figura 2d). Entretanto, segundo Phommalth et al. (2008b), a massa de matéria seca de 100 brotos de soja das cultivares Aga3 e Pungsannamulkong diminuiu com o tempo de germinação e apresentou valores de 5,40 g e 9,40 g, respectivamente, após 168 h de germinação. A matéria seca de brotos de soja das cultivares Seoritae, Seomokatae e Shinpaldal-2 germinadas por 96 h a 20 °C diminuiu 14,3 %, 10,3 % e 11,8 %, respectivamente, cuja redução foi atribuída ao consumo de proteínas, lipídios e oligossacarídeos na germinação, sem o fornecimento de novos nutrientes (KIM et al., 2005).

## EFEITO DO TEMPO DE GERMINAÇÃO SOBRE A CONCENTRAÇÃO DAS DIFERENTES FORMAS DE ISOFLAVONAS NOS BROTOS DE SOJA

A análise de regressão do efeito do tempo de germinação na concentração das isoflavonas daidzina ( $R^2=0,91$ ,  $p<0,01$ ) e genistina ( $R^2=0,76$ ,  $p<0,01$ ) nos brotos de soja indicou que o modelo quadrático se ajustou aos dados experimentais (Figura 3a), enquanto que a glicitina foi detectada apenas na semente sem germinar. A concentração mínima de daidzina e genistina foi de  $0,256 \pm 0,030 \mu\text{mol g}^{-1}$  e  $0,343 \pm 0,013 \mu\text{mol g}^{-1}$  em 72 h de germinação, e aumentou 2,2 e 2,1 vezes entre 72 h e 168 h. Entretanto, em relação às sementes não germinadas, houve redução de 1,1 e 1,9 vezes na concentração de daidzina e genistina após 168 h de germinação, respectivamente. Assim, comparando as sementes com os brotos germinados por 168 h, observou-se uma redução de 1,8 vezes no teor total de  $\beta$ -glicosídeos. Paucar-Menacho et al. (2010a) observaram uma redução de 1,1, 1,1 e 1,7 vezes na concentração de daidzina, genistina e glicitina, respectivamente na cultivar de soja BRS 258 germinada por 72 h a 25 °C (PAUCAR-MENACHO et al., 2010a). Porém, Shi, Nam e Ma (2010) observaram que a concentração das isoflavonas daidzina e genistina aumentou 2,8 e 1,8 vezes após 168 h de germinação de uma cultivar de soja a 25 °C e presença de luz. Kim et al. (2006) observaram aumento médio de 179 vezes na concentração de  $\beta$ -glicosídeos em sete cultivares de soja germinados por 120 h a 25 °C e com luz, entretanto, este elevado aumento pode ser devido a baixa concentração destas isoflavonas na semente sem germinar ( $0,003 \mu\text{mol g}^{-1}$ ), ou seja, de aproximadamente 800 vezes menor do que a concentração de  $\beta$ -glicosídeos da soja BRS 284.

A isoflavona glicitina não foi detectada no broto de soja germinada até 168 h. O mesmo foi observado por Phommalth et al. (2008a) em duas variedades de soja germinadas por 168 h e sob diferentes exposições à luz ultravioleta. Entretanto, Shi, Nam e Ma (2010) verificaram que a concentração de glicitina reduziu gradualmente durante a germinação, não sendo detectada após 144 h. Paucar-Menacho et al. (2010b) não constataram a presença de glicitina para cultivar de soja BRS 133 germinada por até 72 h em diferentes temperaturas. Entretanto, em três cultivares de soja germinada por 96 h a 20 °C a concentração de glicitina representou 2,0 %, 3,0 % e 7,0 % do total de isoflavonas, para as cultivares Seoritae, Seomoktae e Shinpaldal-2, respectivamente (KIM et al., 2005).

**Figura 3** – Efeito tempo de germinação brotos de soja BRS 284 sobre a concentração de (a)  $\beta$ -glicosídeos, (b) malonilglicosídeos e (c) agliconas.



A análise de regressão do efeito do tempo de germinação na concentração de malonildaidzina ( $R^2=0,93$ ,  $p<0,01$ ) nos brotos de soja (Figura 3b) indicou que o modelo linear apresentou um bom ajuste aos dados experimentais, com aumento de 2,1 vezes na concentração de malonildaidzina entre 48 h e 168 h de germinação. Por outro lado, concentração de malonilglicitina ( $R^2=0,54$ ,  $p<0,01$ ) indicou que o modelo linear apresentou um baixo ajuste aos dados experimentais, uma vez que a concentração desta isoflavona manteve constante entre 48 h e 168 h com média de  $0,420 \pm 0,059 \mu\text{mol g}^{-1}$ . Porém, a concentração de malonilgenistina indicou que os modelos linear, quadrático ou cúbico não se ajustaram aos dados experimentais (Figura 3b).

Em relação às sementes não germinadas, a concentração de malonildaidzina e malonilgenistina aumentou 2,5 e 1,6 vezes após 168 h de germinação, enquanto que a concentração de malonilglicitina diminuiu 1,5 vezes após 168 h de germinação. Assim, em relação às sementes, a concentração do total de malonilglicosídeos aumentou 1,7 vezes após 168 h de germinação. Kim et al.

(2006) observaram um aumento médio de 110 e 33 vezes na concentração de malonilglicosídeos de sete cultivares de soja germinados com e sem luz por 120 h a 25 °C, respectivamente. Entretanto, a concentração de malonildaidzina, malonilgenistina e malonilglicitina diminuiu 7,7, 2,0 e 1,4 vezes após 168 h de germinação a 25 °C e presença de luz (SHI; NAM; MA, 2010).

A análise de regressão do efeito do tempo de germinação nos brotos de soja sobre a concentração de daidzeína ( $R^2=0,55$ ,  $p<0,01$ ) indicou que o modelo quadrático apresentou um baixo ajuste aos dados experimentais (Figura 3c). Este fato pode ser atribuído a daidzeína que foi detectada somente a partir de 72 h de germinação e apresentou a máxima concentração entre 120 h e 168 h de germinação, com média de  $0,210 \pm 0,012 \mu\text{mol g}^{-1}$ . Entretanto, concentração de genisteína ( $R^2=0,69$ ,  $p<0,01$ ) indicou que o modelo quadrático apresentou um ajuste satisfatório aos dados experimentais (Figura 3c), cuja concentração mínima foi de  $0,066 \pm 0,001 \mu\text{mol g}^{-1}$  entre 48 h e 120 h, seguido de aumento de 1,5 vezes entre 120 h e 168 h de germinação. Shi, Nam e Ma (2010) relataram que a concentração de daidzeína e de genisteína aumentou 6,6 e 4,5 vezes, respectivamente, entre 48 h e 168 h de germinação a 25 °C e na presença de luz. Porém, a concentração de gliciteína não foi detectada durante todo processo de germinação da soja BRS 284.

Em relação às sementes não germinadas, a concentração de genisteína dos brotos de soja diminuiu 1,6 vezes em 48 h, retornando a concentração inicial em 168 h de germinação. Assim, após 168 h de germinação, o teor total de agliconas dos brotos de soja representou 2,5 % do total de isoflavonas e foi 3,1 vezes maior do que nas sementes não germinadas. Kim, Lee e Chee (2004) relataram que após 168 h de germinação, a concentração de genisteína dos brotos de soja aumentou 1,2, 1,8 e 3,1 vezes em relação à semente não germinada, para as cultivares Junjari, Myoungjoonamul-kong e Chinese black-soybean, respectivamente, enquanto que a concentração da daidzeína aumentou 3,5, 9,0 e 6,2 vezes, respectivamente. Segundo Kim et al, (2006), nenhuma isoflavonas aglicona foi detectada em sementes de sete cultivares de soja sem germinar, entretanto, após a germinação por 120 h a 25 °C, com e sem luz, o teor médio de agliconas foi de  $0,558 \mu\text{mol g}^{-1}$  e  $0,383 \mu\text{mol g}^{-1}$ , respectivamente, sendo que o total de agliconas representaram 18,0 % e 29,0 % do total de isoflavonas nos brotos de soja germinados com e sem luz, respectivamente. A gliciteína não foi detectada no

broto de soja BRS 284 germinado, sendo que o mesmo foi observado por Shi, Nam e Ma (2010) em brotos de soja germinados por 168 h a 25 °C.

Assim, foi observado que a semente de soja BRS 284 apresentou 26,0 % de  $\beta$ -glicosídeos, 72,9 % de malonilglicosídeos e 1,2 %, de agliconas. Os brotos de soja apresentaram comprimento de  $21,01 \pm 2,57$  cm, umidade de  $87,8 \pm 0,8$  %, massa de 100 brotos de  $84,99 \pm 10,51$  g e rendimento de 632,4 % após 168 h de germinação. A matéria seca dos brotos foi constante entre 48 h e 168 h, com média de  $10,89 \pm 0,63$  g 100 brotos<sup>-1</sup>. Comparando as sementes com os brotos germinados por 168 h, observou-se uma redução de 1,8 vezes no total de  $\beta$ -glicosídeos, aumento de 1,7 vezes no total de malonilglicosídeos e aumento de 3,1 vezes no total de agliconas.

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi parcialmente financiado pela Fundação Araucária de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná/Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq (PRONEX). AQJr e EII agradecem ao CNPq, respectivamente pela Bolsa de Estudo do Mestrado e Bolsa Produtividade.

## REFERÊNCIAS

- ABDUL-BAKI, A. A. Biochemical aspects of seed vigor. **Horticultural Science**, v. 5, n. 6, p. 765-771, 1980.
- 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.
- ATTERITANO, M.; MAZZAFERRO, S.; FRISINA, A.; CANNATA, M. L.; BITTO, A.; D'ANNA, R.; SQUADRITO, F.; MACRÌ, I.; FRISINA, N.; BUEMI, M. Genistein effects on quantitative ultrasound parameters and bone mineral density in osteopenic postmenopausal women. **Osteoporos International**, v. 20, n. 11, p. 1947-1954, 2009.
- BERGER, M.; RASOLOHERY, C. A.; CAZALIS, R.; DAYDÉ, J. Isoflavone accumulation kinetics in soybean seed cotyledons and hypocotyls: distinct pathways and genetic controls. **Crop Science**, v. 48, p. 700-708, 2008.
- CHAN, Y-H.; LAU, K-K.; YIU, K-H.; LI, S-W.; CHAN, H-T.; TAM, S.; SHU, X-O.; LAU, C-P.; TSE, H-F. Isoflavone intake in persons at high risk of cardiovascular events: implications for vascular endothelial function and the carotid atherosclerotic burden. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 86, p. 938-945, 2007.

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.

EMBRAPA. **Cultivares de soja: Regiões sul e central do Brasil 1010/2011**. 1ª ed., Londrina: Embrapa Soja, 2010. 62 p.

GRAHAN, T. L. Flavonoid and isoflavonoid distribution in developing soybean seedling tissues and in seed and root exudates. **Plant Physiology**, v. 95, p. 594-603, 1991.

GUTIERREZ-GONZALEZ, J. J.; WU, X.; ZHANG, J.; LEE, J. D.; ELLERSIECK, M.; SHANNON, J. G.; YU, O.; NGUYEN, H. T.; SLEPER, D. A. Genetic control of soybean seed isoflavone content: importance of statistical model and epistasis in complex traits. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 119, n. 6, p. 1069-1083, 2009.

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

KIM, E. H.; KIM, S. H.; CHUNG, J. I.; CHI, H. Y.; KIM, J. A.; CHUNG, I. M. Analysis of phenolic compounds and isoflavones in soybean seeds (*Glycine max*(L.) Merrill) and sprouts grown under different conditions. **European Food Research and Technology**, v. 222, p. 201-208, 2006.

KIM, E. M.; LEE, K. J.; CHEE, K-M. Comparison in isoflavone contents between soybean and soybean sprouts of various soybean cultivars. **Korean Journal of Nutrition**, v. 37, n. 1, p. 45-51, 2004.

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

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

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

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.

LIU, K. **Soybeans as functional foods and ingredients**, Champaign: AOCS Press, 2004. 331 p.

LIU, K. Food use of whole soybeans. In: LAWRENCE, A. J.; WHITE, P. J.; GALLOWAY, R. **Soybeans Chemistry, Production, Processing, and Utilization**, Urbana: AOCS Press, 2008. p. 441-482.

MACHADO, A. L.; BARCELOS, M. F.; TEIXEIRA, A. H.; NOGUEIRA, D. A. Avaliação de componentes químicos em brotos de fabaceae para o consumo humano. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, p. 1071-1078, 2009.

MARTÍN-CABREJAS, M. A.; DÍAZ, M. F.; AGUILERA, Y.; BENÍTEZ, V.; MOLLÁ, E.; ESTEBAN, R. M. Influence of germination on the soluble carbohydrates and dietary fibre fractions in non-conventional legumes. **Food Chemistry**, v. 107, n. 3, p. 1045-1052, 2008.

MWIKYA, S. M.; CAMP, J. V.; RODRIGUEZ, R.; HUYGHEBAERT, A. Effects of sprouting on nutrient and antinutrient composition of kidney beans (*Phaseolus vulgaris* var. Rose coco). **European Food Research and Technology**, v. 212, p. 188–191, 2001.

OLIVEIRA, M. A.; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; MANDARINO, J. M.; LEITE, R. S. Produção de brotos de soja utilizando a cultivar BRS 216: caracterização físico-química e teste de aceitabilidade. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 16, p. 34-41, 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, 2010a.

PAUCAR-MENACHO, L. M.; BERHOW, M. A.; MANDARINO, J. M. G.; MEJIA, E. G.; CHANG, Y. K. Optimisation of germination time and temperature on the concentration of bioactive compounds in Brazilian soybean cultivar BRS 133 using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 119, p. 636-642, 2010b

PHOMMALTH, S.; JEONG, Y-S.; KIM, Y-H.; HWANG, Y-H. Effect of light treatment on Isoflavone content of germinated soybean seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 10123-10128, 2008a.

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, 2008b.

RAMADAN E. A. Effect of Processing and Cooking Methods on the Chemical Composition, Sugars and Phytic Acid of Soybeans. **Food and Public Health**. v. 2, p. 11-15, 2012.

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

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

SHI, H.; NAM, P.; MA, A. Comprehensive Profiling of Isoflavones, Phytosterols, Tocopherols, Minerals, Crude Protein, Lipid, and Sugar during Soybean (*Glycine max*) Germination. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 4970-4976, 2010.

TSUKAMOTO, C.; SHIMADA, S.; IGITA, K.; KUDOU, S.; KOKUBUN, M.; OKUBO, K.; KITAMURA, K.. Factors Affecting Isoflavone Content in Soybean Seeds: Changes in Isoflavones, Saponins, and Composition of Fatty Acids at Different Temperatures during Seed Development. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n. 5, p.1184-1192, 1995.

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.; 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.

WEGULO, S. N.; YANG, X.-B.; MARTINSON, C. A.; MURPHY, P. A. Effects of wounding and inoculation with *Sclerotinia sclerotiorum* on isoflavone concentrations in soybean. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 85, p. 749-760, 2005.

WILLIAMSON-HUGHES, P. S.; FLICKINGER, B. D.; MESSINA, M. J.; EMPIE, M. W. Isoflavone supplements containing predominantly genistein reduce hot flash symptoms: a critical review of published studies. **Menopause**, v. 13, n. 5, p. 831-839, 2006.

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. 63, n. 8 9, p. 978-986, 2012b.

YOSHIARA, L. Y.; MADEIRA, T. B.; RIBEIRO, M. L. L.; MANDARINO, J. M. G.; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; IDA, E. I.  $\beta$ -glucosidase activity of soybean (*Glycine max*) embryonic axis germinated in the presence or absence of light. **Journal of Food Biochemistry**, v. 36, n. 6, 2012a

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

YUN, J.; LI, X.; FAN, X.; LI, W.; JIANG, Y. Growth and quality of soybean sprouts (*Glycine max* L. Merrill) as affected by gamma irradiation. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 82, p. 106-111, 2013.

## 6.2 ARTIGO CIENTÍFICO 2: TEOR DE DIFERENTES FORMAS DE ISOFLAVONAS DOS COMPONENTES DE SOJA E O EFEITO DO TEMPO DE GERMINAÇÃO SOBRE ESTES COMPOSTOS NOS COTILÉDONES E EIXO EMBRIONÁRIO

Submetido no Journal of Agricultural and Food Chemistry

### TEOR DE DIFERENTES FORMAS DE ISOFLAVONAS DOS COMPONENTES DE SOJA E O EFEITO DO TEMPO DE GERMINAÇÃO SOBRE ESTES COMPOSTOS NOS COTILÉDONES E EIXOS EMBRIONÁRIOS

Quinhone Júnior, A<sup>a</sup>, Ida, E. I<sup>a,b</sup>

**RESUMO:** O objetivo deste trabalho foi avaliar o teor das diferentes formas de isoflavonas dos componentes da soja BRS 284 e o efeito do tempo de germinação sobre o teor destes compostos no cotilédone e eixo embrionário (radícula e hipocótilo). As sementes foram germinadas por 168 h a 35 °C e coletadas em intervalos de 24 h. O teor das diferentes formas de isoflavonas na semente, cotilédone, radícula e hipocótilo foi determinado por cromatografia líquida de ultra eficiência e os dados submetidos à análise de regressão. A concentração de isoflavonas totais do eixo embrionário foi 7,1 vezes maior do que nos cotilédones. O cotilédone e o eixo embrionário da soja apresentaram 26,0 %, 27,2 % e 29,4 % de  $\beta$ -glicosídeos, 72,9 %, 71,4 % e 70,0 %, de malonilglicosídeos e 1,2 %, 1,4 % e 0,6 %, de agliconas, respectivamente. No cotilédone, o tempo de germinação apresentou efeito quadrático na concentração de daidzina e genistina e efeito linear na concentração de malonildaidzina e malonilgenistina, enquanto que a genisteína foi detectada apenas nas sementes não germinadas e germinadas por 24 h e a glicitina, malonilglicitina, daidzeína e gliciteína não foram detectadas. Na radícula, o tempo de germinação apresentou efeito quadrático na concentração de daidzina, glicitina, malonilgenistina e malonilglicitina e efeito linear na concentração de malonildaidzina, enquanto que a genistina e a gliciteína não foram detectadas. No hipocótilo, o tempo de germinação apresentou efeito cúbico na concentração de daidzina e genistina, quadrático na concentração de malonildaidzina, malonilgenistina e malonilglicitina e linear na concentração de genisteína, entretanto, a glicitina, daidzeína e gliciteína foram detectadas em alguns tempos de germinação.

**Palavras chave:** Broto de soja. Hipocótilo. Agliconas. Radícula.

---

<sup>a</sup> Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, 86057-970, Londrina, PR, Brasil

<sup>b</sup> Autor correspondente. Tel.: +55 43 3371 5971; fax: +55 43 3371 4080. E-mail: elida@uel.br (E.I. Ida)

## INTRODUÇÃO

As pesquisas envolvendo a soja (*Glycine max* (L.) Merrill) e seus derivados têm merecido destaque nas últimas décadas devido ao seu potencial efeito benéfico na saúde humana, tais como efeito protetor contra a perda óssea em mulheres na pós-menopausa (ATTERITANO et al., 2009), prevenção de doenças cardiovasculares (CHAN et al., 2007), alívio dos sintomas da menopausa (WILLIAMSON-HUGHES et al., 2006) e efeito protetor contra o desenvolvimento de câncer de mama (WADA et al., 2013) e de próstata (DONG et al., 2013).

As isoflavonas da soja ocorrem nas formas de agliconas (daidzeína, genisteína e gliciteína),  $\beta$ -glicosídeos (daidzina, genistina e glicitina), malonilglicosídeos (6"-O-malonildaizina, 6"-O-malonilgenistina e 6"-O-malonilglicitina) e acetilglicosídeos (6"-O-acetildaizina, 6"-O-acetilgenistina e 6"-O-acetilglicitina) (LIU, 2004). Durante a formação da semente de soja, as agliconas são sintetizadas pela rota metabólica dos fenil-propanoides e armazenadas nos vacúolos preferencialmente como  $\beta$ -glicosídeos e malonilglicosídeos (GRAHAM, 1991; KUDOU et al., 1991), enquanto que as agliconas e os acetilglicosídeos estão ausentes ou em baixas concentrações (TSUKAMOTO et al., 1995; PAUCAR-MENACHO et al., 2010).

A concentração de isoflavonas na soja é muito variável, pois a síntese e acúmulo destes compostos são regulados por múltiplos fatores ambientais e genéticos (HOECK et al., 2000; MEBRAHTU et al., 2004). A concentração das diferentes formas de isoflavonas pode ainda variar conforme os componentes da semente. O eixo embrionário pode apresentar concentração de isoflavonas de 5 a 25 vezes maior do que nos cotilédones, enquanto que a casca é praticamente isenta de isoflavonas (KUDOU et al., 1991; RIBEIRO et al., 2006; YUAN et al., 2009).

Durante a domesticação da soja, os chineses gradualmente transformaram as sementes de soja em várias formas de alimentos mais versáteis, saborosos e digestíveis como o tofu, molho, pasta, extrato e brotos de soja (LIU, 2008). O broto de soja, o qual é produzido após 6 a 7 dias de germinação, é uma importante fonte vegetal, rica em nutrientes, disponível durante todo ano e que é tradicionalmente consumida em países orientais como Coreia, Japão e China (LEE et al., 2002). Entretanto, o interesse renovado por alimentos saudáveis e funcionais tem aumentado a demanda por brotos de soja no ocidente (KIM et al., 2005).

O processo de germinação da soja pode ser utilizado para melhorar a qualidade sensorial (LIU, 2004) e o valor nutritivo (PAUCAR-MENACHO et al., 2010; KIM et al., 2013) devido a redução no teor de substâncias indesejáveis como o ácido fítico (RIBEIRO; IDA; OLIVEIRA, 1999; RAMADAN, 2012), oligossacarídeos, (KIM et al., 2005; MARTÍN-CABREJAS et al., 2008) e inibidores de tripsina e atividade da lipoxigenase (PAUCAR-MENACHO et al., 2010). Ainda, a germinação pode promover um aumento significativo no teor de vitaminas (AHMAD; PATHAK, 2000), fitosteróis e tocoferóis (SHI; NAM; MA, 2010), isoflavonas (LEE et al., 2007; PHOMMALTH et al., 2008) e isoflavonas agliconas (KIM et al., 2005; YUAN et al., 2009; PAUCAR-MENACHO et al., 2010; SHI; NAM; MA, 2010).

O tempo de germinação pode exercer diferentes efeitos conforme os componentes do broto de soja e as formas de isoflavonas. Assim, foi observado que em cotilédones de soja germinada por 72 h, o teor de  $\beta$ -glicosídeos não variou significativamente, enquanto que o teor de malonilglicosídeos aumentou com a germinação, porém nas radículas, ocorreu uma redução no teor de malonilglicosídeos e  $\beta$ -glicosídeos (RIBEIRO et al., 2006). Por outro lado, foi observada em cotilédones e hipocótilos germinados por 120 h uma diminuição na concentração de malonilglicosídeos e  $\beta$ -glicosídeos e um aumento na concentração de agliconas (YUAN et al., 2009). Entretanto, a biotransformação das diferentes formas de isoflavonas nos componentes da soja em função do tempo de germinação ainda não foi totalmente explorada.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o teor das diferentes formas de isoflavonas dos componentes da soja BRS 284 e o efeito do tempo de germinação até 168 h sobre estes compostos no cotilédone e eixo embrionário (radícula e hipocótilo).

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **MATÉRIA PRIMA E REAGENTE**

A semente de soja tipo convencional BRS 284 (safra 2011/12) foi cedida por uma empresa especializada da região e utilizada como matéria prima. Segundo a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA, 2010), esta cultivar é indicada para processamento industrial e apresenta tamanho médio de

14,6 g 100 sementes<sup>-1</sup> e teor de proteína e lipídios de 38,7 % e 20,4 %, respectivamente. Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de pureza analítica e de diferentes procedências.

#### DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DO PROCESSO DE GERMINAÇÃO

As sementes de soja foram previamente selecionadas eliminando as sementes danificadas, manchadas ou materiais estranhos. No processo de germinação foram utilizadas duas folhas de papel de germinação (dimensões de 37,5 cm x 28,2 cm, Germitest) previamente umedecidas com água destilada. Com auxílio de uma placa perfurada foram colocadas 50 sementes. Em seguida, as sementes foram cobertas com outro papel de germinação umedecido e a borda inferior foi dobrada e o conjunto enrolado longitudinalmente para formar os rolos.

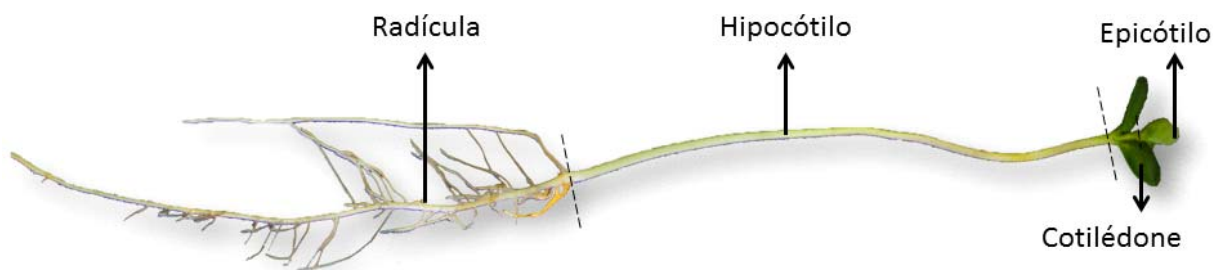
Para avaliar o efeito do tempo de germinação da soja sobre as diferentes formas de isoflavonas no cotilédone e eixo embrionário foi utilizado o delineamento experimental de blocos completos casualizados com três repetições. Foram utilizados 15 rolos para cada bloco e tempo de germinação. A germinação foi realizada na câmara de germinação (modelo Mangelsdorf, J. Prolab - São José dos Pinhais, PR, BR), a 35 °C ( $\pm 1$  °C), com luz natural e 100 % de umidade por 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 144 h e 168 h conforme Yoshiara et al. (2012a). O efeito do tempo de germinação na concentração das diferentes formas de isoflavonas do eixo embrionário da semente de soja foi considerado somente a partir de 48 h de germinação, onde foi possível observar a radícula e hipocótilo e separá-los manualmente. Em cada tempo de germinação os cotilédones, radículas e hipocótilos (Figura 1) foram separados manualmente e em quantidade suficiente para análises. A casca e o epicótilo das sementes germinadas foram descartados. Os componentes foram identificados, liofilizados até peso constante, triturados em moinho de facas (modelo A-11, Ika), mantidos em sacos de polietileno e armazenados a -22 °C até o momento da análise. Os componentes das sementes não germinadas foram utilizados para comparação.

## PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS

O teor de umidade das amostras liofilizadas foi determinado pelo método de estufa de secagem a 105 °C. Para determinar o percentual de cada componente da semente sem germinar (cotilédone, eixo embrionário e casca), foram utilizados 100 g de sementes cujos componentes (cotilédone, eixo embrionário e casca) foram separados manualmente e pesados em balança analítica e os resultados expressos em %. Estes componentes também foram analisados quanto ao teor das diferentes formas de isoflavonas.

A quantificação de isoflavonas foi realizada em triplicata por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE) conforme descrito por Handa et al. (2014). As amostras liofilizadas e moídas foram desengorduradas com *n*-hexano (1:10, m/v) por 1 h à temperatura ambiente por agitação contínua e rotativa seguida por filtração à vácuo. A extração de isoflavonas foi realizada em triplicata com 0,1 g de amostra desengordurada com 2 mL de solução extratora solução extratora contendo água, etanol e acetona (1:1:1, v/v/v) como descrito por Yoshiara et al. (2012b). As diferentes formas de isoflavonas e a somatória de todas as formas de isoflavonas foram expressas em  $\mu\text{mol}$  da respectiva forma de isoflavona  $\text{g}^{-1}$  de amostra em base seca e desengordurada.

**Figura 1** – Componentes da semente de soja germinada por 168 h.



## ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados das diferentes formas de isoflavonas na semente de soja e seus componentes foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Foram realizadas também, as análises de regressão com o software Statistica 10.0 (STATSOFT, INC. 2011),

utilizando todos os dados experimentais, entre o tempo de germinação e teor das diferentes formas de isoflavonas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### TEOR DAS DIFERENTES FORMAS DE ISOFLAVONAS NOS COMPONENTES DA SEMENTE DE SOJA

A semente de soja tipo convencional BRS 284 apresentou 89,9 % de cotilédones, 2,4 % de eixo embrionário e 7,7 % de casca. Estes resultados foram similares aos descritos por Yuan et al. (2009) para a cultivar de soja amarela que apresentou 89,8 % de cotilédones, 2,3 % de eixo embrionário e 7,9 % de casca. Entretanto, a soja BRS 213, descrita por Ribeiro et al. (2006) apresentou 86,8 % de cotilédones, 3,2 % de eixo embrionário e 10,0 % de casca. Segundo Phommalth et al. (2008) a proporção dos componentes da semente de soja depende do seu tamanho, sendo que as sementes médias e pequenas apresentam o percentual de eixo embrionário e casca maior do que as sementes grandes.

A soja BRS 284 (Tabela 1) apresentou  $8,757 \pm 0,566 \mu\text{mol}$  de isoflavonas totais  $\text{g}^{-1}$  de soja em base seca. A concentração de isoflavonas nos grãos de soja pode variar conforme fatores bióticos e abióticos como safra (WANG; MURPHY, 1994; BERGER et al., 2008), época de plantio e local de cultivo (TSUKAMOTO et al., 1995), carga de patógenos no local de cultivo (WEGULO et al., 2005) e presença de eliciadores (ZHANG et al., 2006).

**Tabela 1** – Teor de isoflavonas ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ ) em sementes, cotilédones e eixo embrionário da soja BRS 284<sup>a</sup>

Isoflavona	Semente	Cotilédone	Eixo embrionário
$\beta$ -glicosídeo	2,273 $\pm$ 0,249 a	2,056 $\pm$ 0,067 a	15,819 $\pm$ 1,284 b
Daidzina	0,618 $\pm$ 0,030 a	0,464 $\pm$ 0,019 a	5,059 $\pm$ 0,340 b
Genistina	1,376 $\pm$ 0,192 a	1,592 $\pm$ 0,048 a	2,459 $\pm$ 0,288 b
Glicitina	0,279 $\pm$ 0,031 a	nd	8,301 $\pm$ 0,656 b
Malonilglicosídeos	6,381 $\pm$ 0,315 a	5,401 $\pm$ 0,185 a	37,701 $\pm$ 2,550 b
Malonildaidzina	1,530 $\pm$ 0,124 a	1,134 $\pm$ 0,034 a	12,715 $\pm$ 0,961 b
Malonilgenistina	4,132 $\pm$ 0,088 a	4,267 $\pm$ 0,152 a	6,405 $\pm$ 0,372 b
Malonilglicitina	0,718 $\pm$ 0,109 a	nd	18,581 $\pm$ 1,217 b
Aglicona	0,104 $\pm$ 0,004 a	0,109 $\pm$ 0,002 a	0,324 $\pm$ 0,029 b
Daidzeína	nd	nd	0,223 $\pm$ 0,022
Genisteína	0,104 $\pm$ 0,004 a	0,109 $\pm$ 0,002 a	0,101 $\pm$ 0,008 a
Gliciteína	nd	nd	nd
Total de isoflavonas	8,757 $\pm$ 0,566 a	7,565 $\pm$ 0,254 a	53,844 $\pm$ 3,863 b

a Média  $\pm$  desvio padrão; nd: não detectado; valores com letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes a um nível de significância de 5 % pelo teste de Tukey.

A concentração das diferentes formas de isoflavonas da soja BRS 284 (Tabela 1) variou conforme os seus componentes ( $p < 0,05$ ) sendo que a concentração do total de isoflavonas no eixo embrionário foi 7,1 vezes maior do que no cotilédone. Estes resultados estão próximos ao descrito por Yuan et al. (2009) cuja concentração do total de isoflavonas no eixo embrionário foi 7,8 vezes maior do que no cotilédone. Entretanto, Silva et al. (2012) descreveram uma faixa mais ampla em quatro cultivares de soja, cuja concentração do total de isoflavonas no eixo embrionário foi de 6,5 a 15,5 vezes maior do que no cotilédone. Além disto, Berger et al. (2008) observaram que o teor do total de isoflavonas no cotilédone foi dependente das condições do meio ambiente, enquanto que no eixo embrionário o genótipo exerceu maior influência.

Na casca da soja BRS 284 não foi detectada nenhuma forma de isoflavonas e o mesmo também foi observado por Kudou et al. (1991) e Silva et al. (2012). Assim, considerando o percentual de cada componente da soja, observou-se que 84,2 % e 15,8 % do total de isoflavonas estão presentes no cotilédone e eixo embrionário, respectivamente. Resultados similares foram observados por Tsukamoto et al. (1995). Porém, na soja BRS 213, a distribuição de isoflavonas no cotilédone e eixo embrionário foi de 51,8 % e 48,2 %, respectivamente (RIBEIRO et al., 2006). Estas diferenças na concentração e distribuição de isoflavonas nos diferentes componentes de soja podem ser atribuídas a diferenças de cultivares, condições de cultivo (WANG; MURPHY, 1994; BERGER et al., 2008), tamanho da

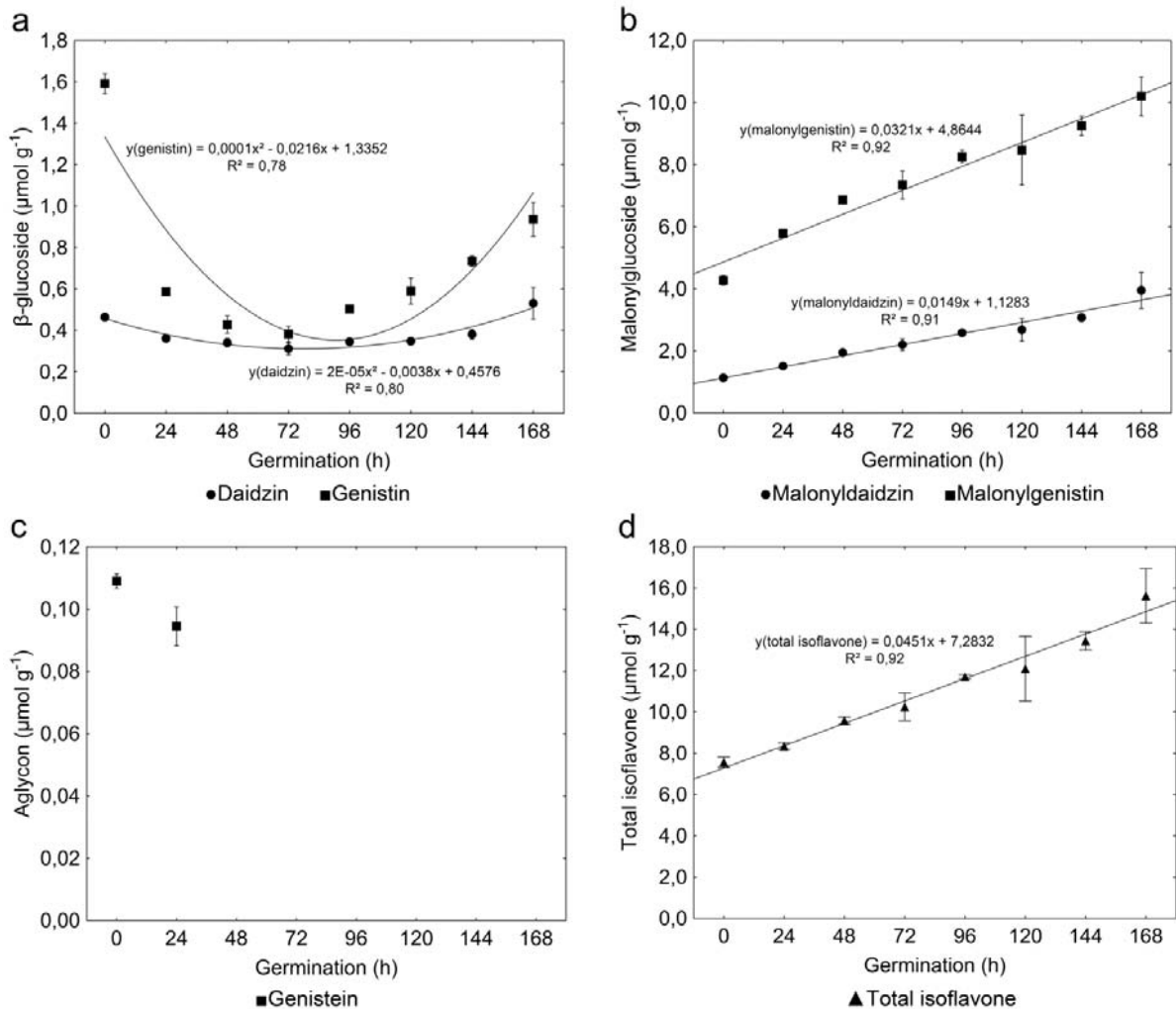
semente (LEE et al., 2008), método de extração e quantificação (KUDOU et al., 1991) e outros fatores.

Na soja BRS 284, o cotilédone e eixo embrionário apresentaram proporções similares de isoflavonas  $\beta$ -glicosídeos, malonilglicosídeos e agliconas (Tabela 1), sendo que em relação ao total de isoflavonas, a semente, cotilédone e eixo embrionário apresentaram 26,0 %, 27,2 % e 29,4 % de  $\beta$ -glicosídeos; 72,9 %, 71,4 % e 70,0 % de malonilglicosídeos e 1,2 %, 1,4 % e 0,6 % de agliconas, respectivamente. Na soja, as isoflavonas daidzeína, genisteína e gliciteína são sintetizadas pela rota metabólica dos fenil-propanoides e armazenadas nos vacúolos como malonilglicosídeos e  $\beta$ -glicosídeos (KUDOU et al., 1991).

#### EFEITO DO TEMPO DE GERMINAÇÃO DA SOJA SOBRE AS DIFERENTES FORMAS DE ISOFLAVONAS DO COTILÉDONE

A análise de regressão do efeito do tempo de germinação na concentração de daidzina ( $R^2=0,80$ ,  $p<0,01$ ) e genistina ( $R^2=0,78$ ,  $p<0,01$ ) no cotilédone de soja germinada indicou que o modelo quadrático apresentou um bom ajuste aos dados experimentais (Figura 2a). Porém, a glicitina não foi detectada no cotilédone germinado.

**Figura 2** – concentração de  $\beta$ -glicosídeos (a), malonilglicosídeos (b), agliconas (c) e isoflavonas totais (d) em cotilédone de soja BRS 284.



No cotilédone germinado até 72 h, a concentração de daidzina e genistina reduziu 1,5 e 4,2 vezes e nos tempos de 72 h a 168 h aumentou 1,7 e 2,5 vezes, respectivamente. Esta redução inicial na concentração pode estar associada à translocação de daidzina e genistina do cotilédone para a radícula (GRAHAN, 1991). A concentração de daidzina no cotilédone germinado por 168 h foi similar ao cotilédone sem germinar (Tabela 1), enquanto que a concentração de genistina reduziu 1,7 vezes (Figura 2a). Nos cotilédones de soja, o teor de  $\beta$ -glicosídeos diminuiu até 120 h de germinação (YUAN et al., 2009). Entretanto, Ribeiro et al. (2006) descreveram que o tempo de germinação de 72 h dos cotilédones da soja BRS 213 não influenciou no perfil das isoflavonas daidzina e genistina. A não detecção de glicitina em cotilédones de soja em todo processo de germinação

também foi observada por Kudou et al. (1991) e por Ribeiro et al. (2006) que observaram em cotilédones de soja não germinados e germinados por 72 h.

A análise de regressão do efeito do tempo de germinação na concentração de malonildaidzina ( $R^2=0,91$ ,  $p<0,01$ ) e malonilgenistina e ( $R^2=0,92$ ,  $p<0,01$ ) no cotilédone de soja germinada indicou que o modelo linear apresentou um bom ajuste aos dados experimentais (Figura 2b). Porém, a malonilglicetina não foi detectada no cotilédone germinado. Entre 0 h e 168 h de germinação, a concentração de malonildaidzina e malonilgenistina aumentou 3,5 e 2,4 vezes, respectivamente. Segundo Ribeiro et al. (2006), o tempo de germinação influenciou no perfil de malonilglicosídeos de cotilédones de soja BRS 213, sendo que em 72 h de germinação a concentração da malonildaidzina e malonilgenistina aumentou 3,3 e 2,6 vezes, respectivamente, em relação ao cotilédone de soja não germinado. Destaca-se que o cotilédone de soja germinado por 168 h, apresentou 25,3 % de malonildaidzina e 65,3 % de malonilgenistina, em relação à concentração do total de isoflavonas. A malonilglicetina não foi detectada no cotilédone de soja não germinado e germinado até 168 h. Resultados similares de isoflavonas malonil foram descritos por Ribeiro et al. (2006).

Não foi possível realizar a análise de regressão para as agliconas nos cotilédones de soja germinados, pois a genisteína foi detectada apenas no cotilédone sem germinar e germinado por 24 h, sendo que a concentração de genisteína não diferiu em 0 e 24 h de germinação ( $p>0,05$ ) e apresentou média de  $0,102 \pm 0,010 \mu\text{mol g}^{-1}$  de cotilédone (Figura 2c). Entretanto, a daidzeína e gliciteína não foram detectadas no cotilédone durante todo o processo de germinação. Segundo Ribeiro et al. (2006), a genisteína foi a única isoflavona aglicona presente no cotilédone de soja BRS 213 não germinado e germinado por 6 h (RIBEIRO et al., 2006). Entretanto, em cotilédones de 17 cultivares de soja germinada por 120 h com e sem luz, foram detectadas as três formas de agliconas, sendo que a daidzeína apresentou maior concentração do que a genisteína e gliciteína (LEE et al., 2007). Segundo Wang e Murphy (1994), estas diferenças, possivelmente podem estar associadas às cultivares, ao ano de plantio e localização de cultivo da soja.

A análise de regressão do efeito do tempo de germinação na concentração do total de isoflavonas ( $R^2=0,92$ ,  $p<0,01$ ) nos cotilédones de soja germinados indicou que o modelo linear apresentou um bom ajuste aos dados experimentais (Figura 2d), com aumento de 1,4 e 2,1 vezes na concentração do total

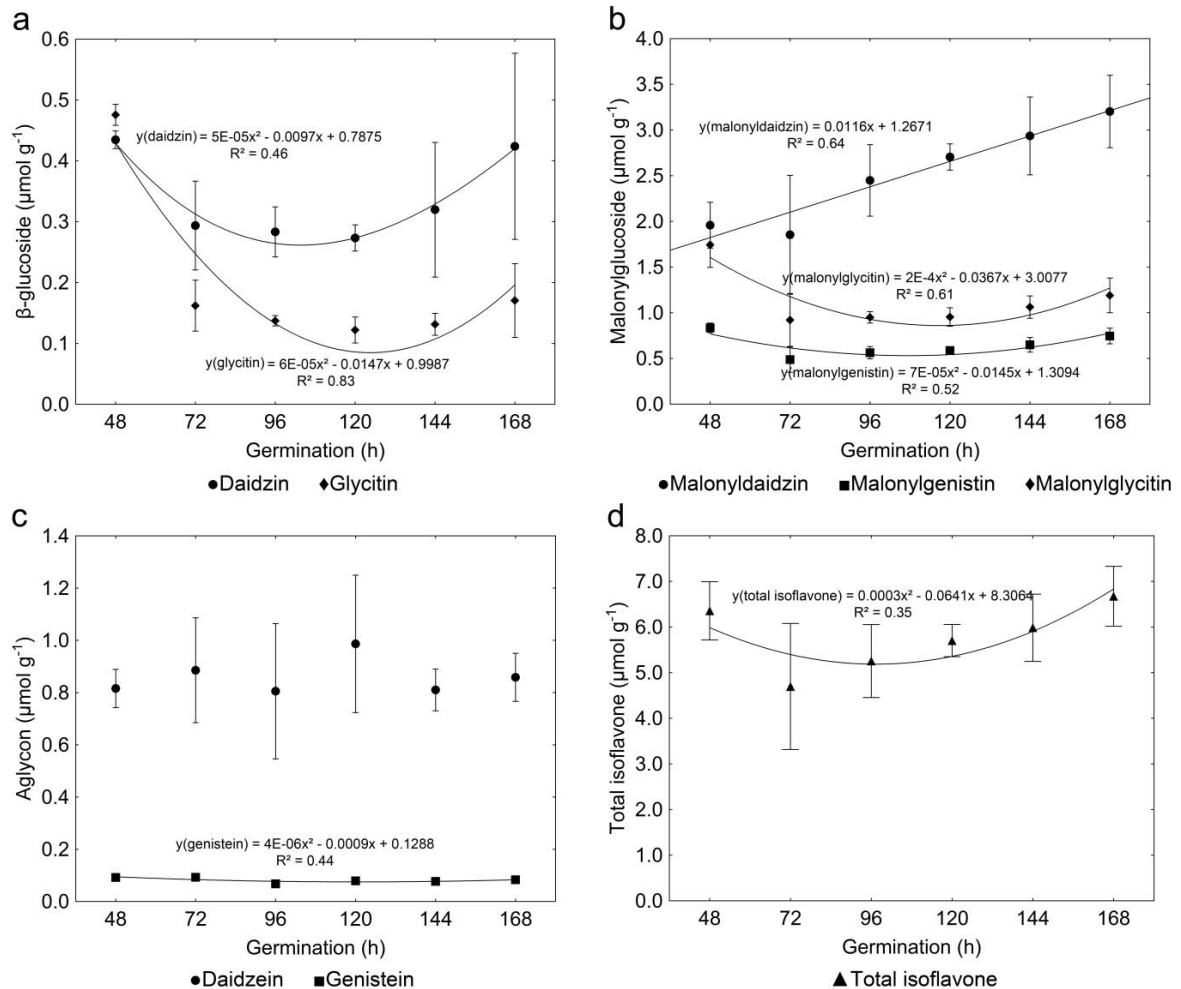
de isoflavonas após 72 h e 168 h de germinação, respectivamente. Resultados similares foram observados por Phommalth et al. (2008) nos quais constataram que a concentração do total de isoflavonas em cotilédones de soja das cultivares Aga3 e Pungsannamulkong germinadas por 168 h a 20 °C foi de 1,5 e 1,7 vezes maior do que nos cotilédones não germinados, respectivamente. Porém, Ribeiro et al. (2006) observaram um aumento de 2,4 vezes na concentração do total de isoflavonas dos cotilédones de soja BRS 213 germinado por 72 h. Na germinação, o aumento na concentração do total de isoflavonas pode ser atribuído à reativação e/ou síntese de novas enzimas (BEWLEY; BLACK, 1994) responsáveis pela biossíntese de isoflavonas e ao metabolismo e degradação de proteínas, lipídios ou carboidratos, que podem promover uma redução da matéria seca dos grãos (BORDINGNON et al., 1995; KIM et al., 2005) e conseqüentemente, pode ocorrer um aumento na concentração relativa do total de isoflavonas.

#### EFEITO DO TEMPO DE GERMINAÇÃO DA SOJA SOBRE AS DIFERENTES FORMAS DE ISOFLAVONAS NA RADÍCULA

O efeito do tempo de germinação na concentração das diferentes formas de isoflavonas da radícula de soja foi considerado somente a partir de 48 h de germinação, onde foi possível observá-la e separá-la manualmente dos outros componentes do eixo embrionário.

A análise de regressão do efeito do tempo de germinação na concentração de daidzina ( $R^2=0,46$ ,  $p=0,01$ ) e glicitina ( $R^2=0,83$ ,  $p<0,01$ ) na radícula de soja germinada indicou que o modelo quadrático se ajustou aos dados experimentais (Figura 3a). Porém, a genistina não foi detectada na radícula germinada. A concentração de daidzina nas radículas de soja germinada apresentou uma tendência de redução de 1,6 vezes até 120 h com um novo aumento de 1,5 vezes até 168 h de germinação, enquanto que a concentração da glicitina apresentou uma acentuada redução de 2,9 vezes entre 48 h e 72 h de germinação e em seguida manteve-se constante, com média de  $0,145 \pm 0,021 \mu\text{mol g}^{-1}$  entre 72 h e 168 h de germinação. Quando comparadas ao eixo embrionário da semente sem germinar, verificou-se que a concentração de daidzina e glicitina reduziu 17,2 e 51,2

**Figura 3** – Concentração de  $\beta$ -glicosídeos (a), malonilglicosídeos (b), agliconas (c) e total de isoflavonas (d) em radícula de soja BRS 284 germinada.



vezes após 72 h de germinação. Porém, Ribeiro et al. (2006) descreveram que a concentração das isoflavonas daidzina e glicitina de radículas da cultivar BRS 213 germinadas por 72 h diminuiu 6,0 e 11,0 vezes, respectivamente. A redução na concentração de daidzina e genistina nos tempo iniciais de germinação pode estar associada à intensa atividade metabólica da semente, bem como a conversão em agliconas e posterior exsudação destas isoflavonas pelo sistema radicular (GRAHAN, 1991).

A genistina não foi detectada nas radículas das sementes germinadas, também observado por Ribeiro et al. (2006) em radículas da soja BRS 213 germinada por até 72 h. Porém, Kim, Lee e Chee (2004) descreveram que a concentração da genistina foi de 0,074 a 0,437  $\mu\text{mol g}^{-1}$  de radícula em três cultivares de soja germinados por 168 h. Entretanto, a concentração da genistina em

radículas de 17 cultivares de soja germinadas por 120 h na presença de luz foi de 0,377 a 5,480  $\mu\text{mol g}^{-1}$  de radícula (LEE et al., 2007).

A análise de regressão do efeito do tempo de germinação na concentração de malonildaidzina ( $R^2=0,64$ ,  $p<0,01$ ) na radícula de soja germinada indicou que o modelo linear se ajustou aos dados experimentais, enquanto que concentração malonilgenistina ( $R^2=0,52$ ,  $p<0,01$ ) e de malonilglucitina ( $R^2=0,61$ ,  $p<0,01$ ) indicou que o modelo quadrático se ajustou aos dados experimentais (Figura 3b). A concentração de malonildaidzina de radículas aumentou 1,6 vezes entre 48 h e 168 h de germinação. Entretanto, a concentração de malonilgenistina e malonilglucitina apresentou uma redução entre 48 h e 72 h e com aumento menos pronunciado a partir de 72 h de germinação (Figura 3b). Quando comparadas ao eixo embrionário da semente sem germinar, as radículas germinadas por 72 h apresentaram uma redução de 6,9, 13,1 e 20,2 vezes na concentração de malonildaidzina, malonilgenistina e malonilglucitina, respectivamente. Ribeiro et al. (2006) também observaram redução na concentração de malonilglicosídeos em radículas de soja BRS 213 germinadas por 72 h com luz. Segundo Grahan (1991), os conjugados da daidzeína e genisteína e vários metabólitos aromáticos não identificados foram seletivamente exsudados pelas radículas e sementes durante a germinação, sendo este um fenômeno contínuo, mas saturável.

A análise de regressão do efeito do tempo de germinação na concentração de daidzeína na radícula de soja germinada indicou que os modelos linear, quadrático ou cúbico não se ajustaram aos dados experimentais ( $p>0,05$ ). Entretanto, o modelo quadrático apresentou um baixo ajuste aos dados experimentais da concentração de genisteína ( $R^2=0,44$ ,  $p=0,01$ ). Estes resultados indicaram que entre 48 h e 168 h houve uma baixa influência do tempo de germinação sobre a concentração destas duas agliconas. Desta forma, verificou-se que a concentração média da daidzeína e da genisteína, entre 48 h e 168 h de germinação, foi de  $0,860 \pm 0,069$  e  $0,082 \pm 0,010 \mu\text{mol g}^{-1}$  de radícula, respectivamente. A gliciteína não foi detectada nas radículas durante a germinação. Porém, radículas de 17 variedades de soja germinada por 120 h com e sem luz apresentaram 3,0 % de gliciteína em relação ao total de isoflavonas (LEE et al., 2007). Nas radículas de soja germinada, o percentual de agliconas foi de 14,1 %, em relação ao total de isoflavonas. O maior percentual de agliconas em relação ao total de isoflavonas nas radículas de soja germinada, quando comparado aos cotilédones

e hipocótilos, pode ser atribuído à maior atividade da enzima  $\beta$ -glicosidase nas radículas (HSIEH; GRAHAN, 2001), com consequente hidrólise e liberação de isoflavonas agliconas que participam de interações entre a planta e micro-organismos simbióticos e, como defesa contra a infecção por patógenos (SUZUKI et al., 2006). As isoflavonas daidzeína e genisteína desempenham um importante papel na indução dos genes *nod* em *Bradyrhizobium japonicum*, responsáveis pela formação dos nódulos radiculares fixadores de nitrogênio (KOSSLAK et al., 1987).

A análise de regressão do efeito do tempo de germinação na concentração do total de isoflavonas ( $R^2=0,35$ ,  $p=0,04$ ) na radícula de soja germinada indicou que o modelo quadrático apresentou um baixo ajuste aos dados experimentais (Figura 3d), indicando que o tempo de germinação entre 48 h e 168 h apresentou uma baixa influência na concentração do total de isoflavonas, sendo que a média neste intervalo foi de  $5,778 \pm 0,125 \mu\text{mol}$  do total de isoflavonas  $\text{g}^{-1}$  de amostra. O baixo ajuste observado para a radícula pode estar associado à alta variabilidade dos dados experimentais, a qual é intrínseca ao experimento, pois a germinação é um fenômeno biológico em que vários fatores, além do tempo, podem influenciar na concentração das isoflavonas.

No eixo embrionário de soja sem germinar a concentração do total de isoflavonas foi de  $53,844 \pm 3,863 \mu\text{mol}$  do total de isoflavonas  $\text{g}^{-1}$  de amostra e, portanto, na germinação a concentração do total de isoflavonas diminuiu 9,3 vezes. Uma diminuição de 6,3 vezes foi observada por Ribeiro et al. (2006) em radículas da cultivar de soja BRS 213 germinadas por 72 h. Esta diminuição pode estar associada a exsudação das isoflavonas para o meio externo ou metabolismo das isoflavonas em outros constituintes (GRAHAN, 1991).

#### EFEITO DO TEMPO DE GERMINAÇÃO DA SOJA SOBRE AS DIFERENTES FORMAS DE ISOFLAVONAS NO HIPOCÓTILO

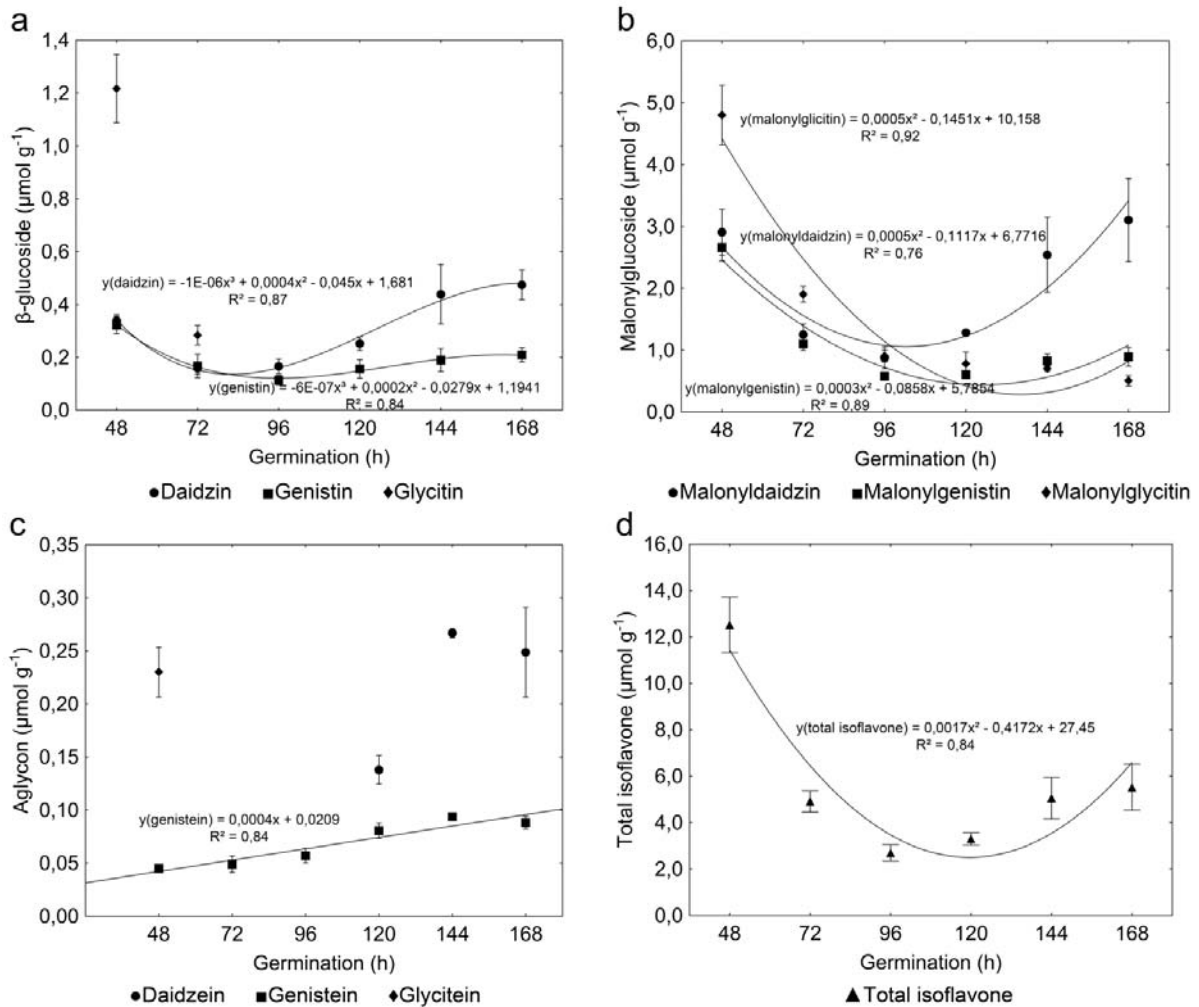
O efeito do tempo de germinação na concentração das diferentes formas de isoflavonas do hipocótilo de soja foi considerado somente a partir de 48 h de germinação, onde foi possível observá-lo e separá-lo manualmente dos outros componentes do eixo embrionário.

A análise de regressão do efeito do tempo de germinação na concentração de daidzina ( $R^2=0,87$ ,  $p<0,01$ ) e genistina ( $R^2=0,84$ ,  $p<0,01$ ) no

hipocótilo de soja germinada indicou que o modelo cúbico apresentou um bom ajuste aos dados experimentais (Figura 4a). Assim, a concentração de daidzina e genistina nos hipocótilos de soja germinada diminuiu 2,1 e 2,9 vezes em 72 h e 96 h, respectivamente, seguido de aumento de 2,8 e 1,7 vezes até 144 h com pouca tendência de alteração até 168 h. A glicitina foi detectada em 48 h, com redução de 4,3 vezes em 72 h e não detecção após este tempo de germinação, e, portanto, não foi realizada a análise de regressão. Entretanto, a glicitina foi detectada em concentrações que variaram de 0,100 a 0,776  $\mu\text{mol g}^{-1}$  de hipocótilos em 17 cultivares de soja germinada por 120 h e com luz (LEE et al., 2007). Quando comparada ao eixo embrionário da semente sem germinar, a concentração de daidzina, genistina e glicitina diminuiu 15,0, 7,6 e 6,8 vezes, respectivamente após 48 h de germinação. Grahan (1991) observou que, no gancho do hipocótilo há uma maior concentração dos conjugados de daidzeína e genisteína, e que, entre 48 h e 96 h de germinação, ocorre uma redução drástica e programada no teor destas isoflavonas, sendo que há uma correlação inversa entre a concentração de isoflavonas conjugadas e expansão do gancho do hipocótilo. A análise de regressão do efeito do tempo de germinação na concentração de malonildaidzina ( $R^2=0,76$ ,  $p<0,01$ ), malonilgenistina ( $R^2=0,89$ ,  $p<0,01$ ) e malonilglicitina ( $R^2=0,92$ ,  $p<0,01$ ) do hipocótilo de soja germinada indicou que o modelo quadrático apresentou um bom ajuste aos dados experimentais (Figura 4b). A concentração de malonildaidzina reduziu 3,3 vezes até 96 h de germinação e retornou à concentração inicial em 168 h de germinação. Entretanto, a concentração de malonilgenistina e malonilglicitina diminuiu 4,6 e 5,3 vezes até 96 h de germinação e após 96 h ocorreu pouca alteração. Quando comparados ao eixo embrionário da semente sem germinar, verifica-se que a concentração de malonildaidzina diminuiu 22,0 e 4,1 vezes em 96 h e 168 h respectivamente, enquanto que a concentração da malonilgenistina e malonilglicitina diminuiu 7,2 e 36,7 vezes após 168 h de germinação. Estes resultados apresentaram a mesma tendência conforme observado por Yuan et al. (2009) onde foi verificada uma redução de 9,0, 25,6 e 125,0 vezes na concentração de malonildaidzina, malonilgenistina e malonilglicitina em hipocótilos de soja germinados na presença de luz por até 120 h.

A análise de regressão do efeito do tempo de germinação na concentração da isoflavona de genisteína ( $R^2=0,84$ ,  $p<0,01$ ) no hipocótilo de soja germinada indicou que o modelo linear apresentou um bom ajuste aos dados

**Figura 4** – Concentração de  $\beta$ -glicosídeos (a), malonilglicosídeos (b), agliconas (c) e total de isoflavonas (d) em hipocótilo de soja BRS 284 germinada.



experimentais (Figura 4c). A concentração de genisteína aumentou 2,0 vezes entre 48 h e 168 h de germinação. Tendências similares foram observadas por Yuan et al. (2009) que descreveram um aumento de 9,7 vezes na concentração da genisteína em hipocótilos de soja germinados por 72 h, seguido de uma redução de 1,4 vezes entre 72 h e 120 h de germinação. No hipocótilo, a daidzeína foi detectada somente a partir de 120 h, enquanto que a gliciteína foi detectada apenas em 48 h de germinação, não sendo, portanto, realizada a análise de regressão. No hipocótilo, a concentração de daidzeína dobrou entre 120 h e 144 h e manteve-se constante até 168 h, com média de  $0,258 \pm 0,013 \mu\text{mol g}^{-1}$  de hipocótilo. Em hipocótilos de 17 cultivares de soja germinada por 120 h, a concentração de daidzeína variou entre 0,231 e  $1,019 \mu\text{mol}$  de daidzeína  $\text{g}^{-1}$  (LEE et al., 2007). A concentração de daidzeína em hipocótilos de soja germinados por 120 h aumentou 5,1 vezes em relação aos hipocótilos não germinados (YUAN et al., 2009). A concentração de gliciteína em 48

h de germinação foi de  $0,230 \pm 0,023 \mu\text{mol g}^{-1}$  de hipocótilo. Entretanto, em hipocótilos de 17 cultivares de soja germinados por 120 h com e sem luz a concentração de gliciteína variou de 0,067 a  $0,814 \mu\text{mol g}^{-1}$  de amostra (LEE et al., 2007).

A análise de regressão do efeito do tempo de germinação na concentração do total de isoflavonas ( $R^2=0,84$ ,  $p<0,01$ ) no hipocótilo de soja germinada indicou que o modelo quadrático apresentou um bom ajuste aos dados experimentais (Figura 4d). A concentração do total de isoflavonas no hipocótilo de soja diminuiu 4,6 vezes entre 48 h e 96 h de germinação, seguido de um aumento de 2,0 vezes entre 96 h e 168 h. Comparando o eixo embrionário da soja não germinada com o hipocótilo germinado por 168 h, a concentração do total de isoflavonas diminuiu 9,8 vezes (Tabela 1). Resultados similares foram observados nas cultivares Aga3 e Pungsannamulkong germinadas por 168 h (PHOMMALTH et al., 2008).

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi parcialmente financiado pela Fundação Araucária de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná/Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq (PRONEX). AQJr e EII agradecem ao CNPq, respectivamente pela Bolsa de Estudo do Mestrado e Bolsa Produtividade.

## REFERÊNCIAS

ABDUL-BAKI, A. A. Biochemical aspects of seed vigor. **Horticultural Science**, v. 5, n. 6, p. 765-771, 1980.

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.

ATTERITANO, M.; MAZZAFERRO, S.; FRISINA, A.; CANNATA, M. L.; BITTO, A.; D'ANNA, R.; SQUADRITO, F.; MACRÌ, I.; FRISINA, N.; BUEMI, M. Genistein effects on quantitative ultrasound parameters and bone mineral density in osteopenic postmenopausal women. **Osteoporos International**, v. 20, n. 11, p. 1947-1954, 2009.

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

BEWLEY, J. D.; BLACK, A. M. **Seeds - Physiology of development and germination**. New York: Plenum Press. 2ªed., 1994. 445 p.

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

CHAN, Y-H.; LAU, K-K.; YIU, K-H.; LI, S-W.; CHAN, H-T.; TAM, S.; SHU, X-O.; LAU, C-P.; TSE, H-F. Isoflavone intake in persons at high risk of cardiovascular events: implications for vascular endothelial function and the carotid atherosclerotic burden. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 86, p. 938-945, 2007.

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.

EMBRAPA. **Cultivares de soja: Regiões sul e central do Brasil 1010/2011**. 1ª ed., Londrina: Embrapa Soja, 2010. 62 p.

GRAHAN, T. L. Flavonoid and isoflavonoid distribution in developing soybean seedling tissues and in seed and root exudates. **Plant Physiology**. v. 95, p. 594-603, 1991.

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

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.

HOECK, J. A.; FEHR, W. R.; MURPHY, P. A.; WELKE, G. A. Influence of genotype and environment on isoflavone contents of soybean. **Crop Science**, v. 40, n. 1, p. 48-51. 2000.

KIM, E. M.; LEE, K. J.; CHEE, K-M. Comparison in isoflavone contents between soybean and soybean sprouts of various soybean cultivars. **Korean Journal of Nutrition**. v. 37, n. 1, p. 45-51, 2004.

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

- KIM, W.-J.; LEE, H.-Y.; Won, M. H.; YOO, S.-H. Germination effect of soybean on its contents of isoflavonoids and oligosaccharides. **Food Science and biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 498-502, 2005.
- KOSSLAK, R. M.; BOOKLAND, R.; BARKEI, J.; PAAREN, H. E.; APPELBAUM, E. R. Induction of Bradyrhizobium japonicum common nod genes by isoflavones isolated from Glycine max. **Proceedings of the National Academy of Sciences – USA**, v. 84, n. 21, p. 7428-7432, 1987.
- KUDOU, S.; FLEURY, Y.; WELTI, D.; MAGNOLATO, D.; UCHIDA, T.; KITAMURA, K.; OKUBO, K. Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds (*Glycine max* Merrill). **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 55, n. 9, p. 2227-2233, 1991.
- LEE, S. J.; KIM, J. J.; MOON, H. I.; AHN, J. K.; CHUN, S. C.; Jung, W. S.; LEE, O. K.; CHUNG, I. M. Analysis of isoflavones and phenolic compounds in Korean soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] seeds of different seed weights. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 8, p. 2751-2758, 2008.
- 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.
- LIU, K. **Soybeans as functional foods and ingredients**, Champaign: AOCS Press, 2004. 331 p.
- MARTÍN-CABREJAS, M. A.; DÍAZ, M. F.; AGUILERA, Y.; BENÍTEZ, V.; MOLLÁ, E.; ESTEBAN, R. M. Influence of germination on the soluble carbohydrates and dietary fibre fractions in non-conventional legumes. **Food Chemistry**, v. 107, n. 3, p. 1045-1052, 2008.
- MEBRAHTU, T.; MOHAMED, A.; WANG, C. Y.; ANDEBRHAN, T. Analysis of isoflavone contents in vegetable soybeans. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 59, p. 55-61, 2004.
- METIVIER, J. R. Dormência e germinação. In: FERRI, M.G. (Coord.) **Fisiologia Vegetal**. Sao Paulo: EDUSP, 1979. p 343-392. v. 2
- 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.
- RAMADAN E. A. Effect of Processing and Cooking Methods on the Chemical Composition, Sugars and Phytic Acid of Soybeans. **Food and Public Health**. v. 2, p. 11-15, 2012.

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

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

SHI, H.; NAM, P.; MA, A. Comprehensive Profiling of Isoflavones, Phytosterols, Tocopherols, Minerals, Crude Protein, Lipid, and Sugar during Soybean (*Glycine max*) Germination. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 4970-4976, 2010.

SILVA, C. E. da; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; MANDARINO, J. M. G.; LEITE, R. S.; MÔNACO, A. P. do A. Teores de isoflavonas em grãos inteiros e nos componentes dos grãos de diferentes cultivares de soja (*Glycine max* (L.) Merrill). **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 2, p. 150-156. 2012.

STATSOFT, INC. (2011). STATISTICA (data analysis software system), version 10. [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com).

SUZUKI, H.; TAKAHASHI, S.; WATANABE, R.; FUKUSHIMA, Y.; FUJITA, N.; NOGUCHI, A.; YOKOYAMA, R.; NISHITANI, K.; NISHINO, T.; NAKAYAMA, T. An isoflavone conjugate-hydrolyzing  $\beta$ -glucosidase from the roots of soybean (*Glycine max*) seedlings: purification, gene cloning, phylogenetics, and cellular localization. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 40, p. 30251-30259, 2006.

TSUKAMOTO, C.; SHIMADA, S.; IGITA, K.; KUDOU, S.; KOKUBUN, M.; OKUBO, K.; KITAMURA, K.. Factors Affecting Isoflavone Content in Soybean Seeds: Changes in Isoflavones, Saponins, and Composition of Fatty Acids at Different Temperatures during Seed Development. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n. 5, p.1184-1192, 1995.

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.; 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.

WEGULO, S. N.; YANG, X.-B.; MARTINSON, C. A.; MURPHY, P. A. Effects of wounding and inoculation with *Sclerotinia sclerotiorum* on isoflavone concentrations in soybean. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 85, p. 749-760, 2005.

WILLIAMSON-HUGHES, P. S.; FLICKINGER, B. D.; MESSINA, M. J.; EMPIE, M. W. Isoflavone supplements containing predominantly genistein reduce hot flash symptoms: a critical review of published studies. **Menopause**, v. 13, n. 5, p. 831-839, 2006.

- 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. 63, n. 8 9, p. 978-986, 2012b.
- YOSHIARA, L. Y.; MADEIRA, T. B.; RIBEIRO, M. L. L.; MANDARINO, J. M. G.; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; IDA, E. I.  $\beta$ -glucosidase activity of soybean (*Glycine max*) embryonic axis germinated in the presence or absence of light. **Journal of Food Biochemistry**, v. 36, n. 6, 2012a
- YUAN, J.-P.; LIU, Y.-B.; PENG, J.; WANG, J.-H.; LIU, X. Changes of isoflavone profile in the hypocotyls and cotyledons of soybeans during dry heating and germination. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 19, p. 9002-9010, 2009.
- ZHANG, B; HETTIARACHCHY, N.; CHEN, P.; HORAX, R.; CORNELIOUS, B.; ZHU, D.; Influence of the application of three different elicitors on soybean plants on the concentrations of several isoflavones in soybean seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 15, p. 5548-5554, 2006.

## 7 CONCLUSÕES DA DISSERTAÇÃO

A semente de soja BRS 284 apresentou 89,9 % de cotilédones, 2,4 % de eixo embrionário e 7,7 % de casca, sendo que 84,2 % e 15,8 % das isoflavonas totais estão contidas nos cotilédones e eixo embrionário, respectivamente.

As sementes, cotilédones e o eixo embrionário apresentaram 26,0 %, 27,2 % e 29,4 % de  $\beta$ -glicosídeos, 72,9 %, 71,4 % e 70,0 % de malonilglicosídeos e 1,2 %, 1,4 % e 0,6 % de agliconas, respectivamente.

O rendimento dos brotos de soja foi de 632,4 %.

Nos brotos de soja, o efeito do tempo de germinação foi quadrático no comprimento, umidade, concentração de daidzina, genistina e genisteína, linear na massa de 100 brotos e concentração de malonildaidzina. A concentração de malonilglicetina manteve-se constante, enquanto que a glicetina e gliciteína não foram detectadas nos brotos germinados.

Nos cotilédones, o efeito do tempo de germinação foi quadrático na concentração de daidzina e genistina, linear na concentração de malonildaidzina e malonilgenistina. A genisteína foi detectada apenas nos cotilédones não germinados e germinados, por 24 h, enquanto que a glicetina, malonilglicetina, daidzeína e gliciteína não foram detectadas.

Nas radículas, o efeito de tempo de germinação foi quadrático na concentração de daidzina, glicetina, malonilgenistina e malonilglicetina, linear na concentração de malonildaidzina, enquanto que a genistina e a gliciteína não foram detectadas.

No hipocótilo, o efeito do tempo de germinação foi cúbico na concentração de daidzina e genistina, quadrático na concentração de malonildaidzina, malonilgenistina e malonilglicetina e linear na concentração de genisteína, enquanto que a glicetina, daidzeína e gliciteína foram detectadas em apenas alguns tempos de germinação.