



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

NATALIA CENEDESI VICENTIM BOM

**OXIDAÇÃO LIPÍDICA E ALTERAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS
NAS ISOFLAVONAS E CARBOIDRATOS DURANTE O
ENVELHECIMENTO DA SOJA**

Londrina
2018

NATALIA CENEDESI VICENTIM BOM

**OXIDAÇÃO LIPÍDICA E ALTERAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS
NAS ISOFLAVONAS E CARBOIDRATOS DURANTE O
ENVELHECIMENTO DA SOJA**

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

Orientadora: Prof^a. Dra. Sandra Helena Prudencio.

Londrina
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Bom, Natalia Cenedesi Vicentim.

Oxidação lipídica e alterações físico-químicas nas isoflavonas e carboidratos durante o envelhecimento da soja / Natalia Cenedesi Vicentim Bom. - Londrina, 2018.
121 f.

Orientador: Sandra Helena Prudencio.

Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2018. Inclui bibliografia.

1. Envelhecimento de soja - Tese. 2. Isoflavonas - Tese. 3. Oligossacarídeos - Tese. 4. Lipoxigenases - Tese. I. Prudencio, Sandra Helena . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. III. Título.

NATALIA CENEDESI VICENTIM BOM

**OXIDAÇÃO LIPÍDICA E ALTERAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS NAS
ISOFLAVONAS E CARBOIDRATOS DURANTE O
ENVELHECIMENTO DA SOJA**

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

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Helena
Prudencio
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Dra. Vera de Toledo Benassi
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária -
EMBRAPA Soja

Profa. Dra. Neusa Fátima Seibel
Universidade Tecnológica Federal do Paraná -
UTFPR

Profa. Dra. Mara Lúcia Luiz Ribeiro
Universidade Estadual de Londrina - UEL

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

Londrina, 10 de abril de 2018.

*A Deus, que me deu sabedoria,
paciência e bênçãos sem fim, e a
meus pais, que me deram força por
todo o caminho.*

AGRADECIMENTOS

A Deus acima de tudo, pela saúde que me permitiu o trabalho de todos os dias, pelas bênçãos e a força que recebi, na forma das mais variadas pessoas e ensinamentos e pela família que tenho.

A Professora Dra. Sandra Helena Prudencio, que muito me ensinou nestes seis anos de convivência, agradeço pelo compartilhamento de sua sabedoria e conhecimentos e agradeço também pela amizade e a convivência.

Aos professores do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, agradeço a dedicação e esforços durante as aulas e o profissionalismo na transmissão dos conhecimentos que tanto me auxiliaram durante esta jornada, e que ainda irão me acompanhar pelas jornadas futuras.

Aos funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, agradeço por todo o auxílio prestado e todas as horas de convivência.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de estudos e auxílio financeiro para execução da pesquisa.

A SL Alimentos pela doação das cultivares de soja.

Aos meus colegas de laboratório eu agradeço por todo o apoio e ajuda. Em especial a Cintia Ladeira Handa, Marcela Fernanda G. Guelfi, Ariana Justus, Danielle Cristina B. Honorato Ferreira, Daniele Rodrigues, Dafne Pereira, Bruna Raquel Boger, Maria Rita A. Porto, Mirelli Bianchin, Valéria de O. Brito, Thaísa M. Marcello, e todos aqueles que de alguma forma me ajudaram ou me acompanharam neste período.

A Sabrina Penteado Gonçalves Castilho eu agradeço todo o auxílio e companheirismo, que tornou mais fácil a execução do experimento de envelhecimento. Agradeço também ao Fernando Sanches de Lima por toda a ajuda e apoio.

A Bruna Auriema, Marsilvio L. de Moraes Filho e Talita Kato eu agradeço pela amizade. Conhecer vocês foi uma das melhores partes deste processo. Agradeço em especial a Talita Kato pelos conselhos e toda a força que compartilhou comigo.

A meus pais Luiz Carlos e Márcia, e meus irmãos Fernanda e Vinícius, agradeço pela força, por me permitirem e incentivarem a ir atrás dos meus objetivos, agradeço também por todo o carinho e ajuda.

BOM, Natalia Cenedesi Vicentim. **Oxidação lipídica e alterações físico-químicas nas isoflavonas e carboidratos durante o envelhecimento da soja.** 2018. 121 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

RESUMO

O envelhecimento da soja consiste em uma série de reações bioquímicas que resultam em alterações nos componentes dos grãos, tais como as proteínas, lipídeos, carboidratos, enzimas e compostos fenólicos. Estas alterações podem modificar as características dos grãos e prejudicar seu emprego como semente ou ingrediente alimentar. O objetivo do trabalho foi avaliar a oxidação lipídica e alterações físico-químicas nas isoflavonas e carboidratos durante o envelhecimento natural ou acelerado de grãos de soja cultivares BRS 284 e BRS 257 (livre das lipoxigenases L1, L2 e L3). O envelhecimento acelerado (EA) foi feito em estufa a 30 °C, 78 % de umidade relativa (UR) por até 9 meses e o natural (EN) em uma sala em condições ambientais de temperatura e UR por até 18 meses. Um controle foi mantido a 4 °C e 60 % de umidade relativa. Foram avaliadas as alterações na cor, isoflavonas, atividade da enzima β -glicosidase, carboidratos e enzima α -galactosidase, a atividade antioxidante dos compostos fenólicos (pelos métodos de FRAP, DPPH e ABTS), além da ocorrência de oxidação lipídica (avaliada pelo pH e concentração de malonaldeído e hexanal), e atividade da enzima lipoxigenase nos grãos em diversos tempos de envelhecimento. Os dados foram tratados por ANOVA e teste de Tukey ($p = 0,05$). As duas cultivares apresentaram comportamento semelhante durante o envelhecimento dos grãos nas duas condições. O envelhecimento (natural e acelerado) resultou em alteração no perfil de isoflavonas, sendo mais acentuada no EA, resultando em aumento significativo no conteúdo de isoflavonas agliconas e redução das isoflavonas β -glicosídicas e malonilglicosídicas. De forma geral, não ocorreu variação na atividade da enzima β -glicosidase com o envelhecimento nas duas condições. Com o EA e o EN, houve redução no conteúdo de oligossacarídeos (estaquiose e rafinose) e sacarose (dissacarídeo) com aumento nos monossacarídeos (galactose, glicose e frutose no envelhecimento acelerado, e galactose no envelhecimento natural). Houve redução na atividade da enzima α -galactosidase em ambas as condições de armazenamento. O EA resultou em aumento dos compostos fenólicos totais somente na BRS 257 e da capacidade antioxidante por FRAP em ambas as cultivares. Quanto à ocorrência de oxidação lipídica, o envelhecimento acelerado resultou em aumento de hexanal em ambas as cultivares e redução da atividade de lipoxigenases na soja convencional (BRS 284). Ocorreu redução no pH e escurecimento em ambas as cultivares, tanto no EA quanto no EN. As duas condições de envelhecimento não ocasionaram, no geral, alteração nos teores de malonaldeído.

Palavras-chave: Genisteína. Enzimas. Oligossacarídeos. Açúcares. Atividade antioxidante. Armazenamento.

BOM, Natalia Cenedesi Vicentim. **Lipidic oxidation and physicochemical alterations in isoflavones and carbohydrates during soybean aging**. 2018. 121 p. Thesis (Doctoral Degree in Food Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

ABSTRACT

Soybean aging consists in a series of biochemical reactions that result in alterations in the grain components, such as proteins, lipids, carbohydrates, enzymes and phenolic compounds. These alterations can modify the grains characteristics and impair its use as seed or food ingredient. The aim of this work was to evaluate the lipidic oxidation and physico-chemical alterations in the isoflavones and carbohydrates during accelerated and natural aging of soybean cultivars BRS 284 and BRS 257 (free of lipoxygenases L1, L2 and L3). The accelerated aging (AA) was performed in an oven at 30 °C, 78 % of relative humidity (RH) up to 9 months and the natural (NA) in a room in ambient conditions of temperature and RH, up to 18 months. One control was maintained at 4 °C and 60 % relative humidity. In this work the alterations in color, isoflavones, β -glycosidase enzyme, carbohydrates, α -galactosidase enzyme, antioxidant activity of phenolic compounds (by the methods of FRAP, DPPH and ABTS), as well as the occurrence of lipidic oxidation (evaluated by pH, as well as malonaldehyde and hexanal concentration) and the activity of the lipoxygenase enzyme were evaluated in the grains in various aging times. The data were treated by ANOVA and Tukey test ($p = 0,05$). The aging (natural and accelerated) resulted in alteration in the isoflavones profile, more accentuated in the AA, resulting in significant increase in the aglycone isoflavones content and decrease in the β -glycosidic and malonilglycosidic isoflavones. In general, no variation in β -glycosidase activity occurred with aging in both conditions. With the AA and the NA, there was a reduction in the content of oligosaccharides (stachyose and raffinose) and sucrose (disaccharide) with increase in monosaccharides (galactose, glucose and fructose in the accelerated aging, and galactose in the natural aging). There was a reduction in the activity of α -galactosidase enzyme in both storage conditions. The AA resulted in increase of the total phenolic compounds only in BRS 257 and in the antioxidant capacity by FRAP in both cultivars. Regarding the occurrence of lipidic oxidation, the accelerated aging resulted in hexanal increase in both cultivars as well as reduction in lipoxygenase activity in the conventional soybean (BRS 284). A decrease in pH and darkening occurred in both cultivars, in the AA and the NA. In general, no alteration in malonaldehyde contents was observed in both aging conditions.

Keywords: Genistein. Enzymes. Oligosaccharides. Sugars. Antioxidant activity. Storage.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Estrutura química básica dos flavonóides	25
Figura 2	Estrutura química básica dos flavonóides flavanol, flavona, flavonol, flavanona, isoflavona e antocianidina.....	26
Figura 3	Estruturas químicas das isoflavonas de soja	28
Figura 4	Estrutura química dos oligossacarídeos da soja	33

LISTA DE TABELAS

Artigo Científico I: Alterações nas isoflavonas e capacidade antioxidante durante envelhecimento de cultivares de soja com e livre de lipoxigenases.

Tabela 1	Umidade, atividade da β -glicosidase e isoflavonas totais de sojas BRS 257 e 284 submetidas ao Envelhecimento Acelerado	84
Tabela 2	Umidade, atividade da β -glicosidase e isoflavonas totais de sojas BRS 257 e 284 submetidas ao Envelhecimento Natural	85
Tabela 3	Perfil de isoflavonas das sojas BRS 257 e 284 submetidas ao Envelhecimento Acelerado.....	86
Tabela 4	Perfil de isoflavonas das sojas BRS 257 e 284 submetidas ao Envelhecimento Natural	87
Tabela 5	Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante por DPPH, FRAP e ABTS ⁺ das sojas BRS 257 e BRS 284 submetidas ao Envelhecimento Acelerado ou Envelhecimento Natural.....	88

Artigo Científico II: Oxidação lipídica e alterações nos carboidratos no envelhecimento em cultivares de soja com e livre de lipoxigenases.

Tabela 1	pH, teores de malonaldeído e hexanal e atividade das enzimas lipoxigenases de sojas BRS 257 e BRS 284 submetidas ao Envelhecimento Acelerado.....	115
Tabela 2	pH, teores de malonaldeído e hexanal e atividade das enzimas lipoxigenases de sojas BRS 257 e BRS 284 submetidas ao Envelhecimento Natural	116
Tabela 3	Atividade da enzima α -galactosidase e teores de carboidratos de sojas BRS 257 e BRS 284 submetidas ao Envelhecimento Acelerado	117
Tabela 4	Atividade da enzima α -galactosidase e teores de carboidratos de sojas BRS 257 e BRS 284 submetidas ao Envelhecimento Natural ..	118
Tabela 5	Parâmetros de cor (L^* e h°) de sojas BRS 257 e BRS 284 submetidas ao Envelhecimento Acelerado e Natural.....	119

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	17
2.1	OBJETIVO GERAL	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3	REVISÃO DA LITERATURA	18
3.1	CARACTERÍSTICAS E HISTÓRICO DA SOJA	18
3.2	COMPOSIÇÃO DA SOJA	19
3.2.1	<i>Lipídeos</i>	21
3.2.1.1	<i>Hidrólise de lipídeos</i>	21
3.2.1.2	<i>Oxidação lipídica</i>	22
3.2.1.3	<i>Lipoxigenases</i>	23
3.2.2	<i>Compostos fenólicos da soja e atividade antioxidante da soja</i>	25
3.2.2.1	<i>Isoflavonas</i>	27
3.2.3	<i>Carboidratos</i>	32
3.2.3.1	<i>α-Galactosidase</i>	33
3.3	ENVELHECIMENTO DOS GRÃOS DE SOJA	34
4	REFERÊNCIAS	44
5	MATERIAL E MÉTODOS	56
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
6.1	ARTIGO CIENTÍFICO I.....	58
6.2	ARTIGO CIENTÍFICO II.....	89
7	CONCLUSÕES	120
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	121

1 INTRODUÇÃO

A soja é uma importante cultura agrícola, sendo observado a cada ano um aumento da produtividade e da área plantada no mundo todo. O Brasil é hoje o segundo maior produtor mundial de soja, atrás apenas dos Estados Unidos em toneladas colhidas (respectivamente, 114 milhões de toneladas e 117,21 milhões de toneladas na safra 2016/2017), fazendo da soja uma das mais expressivas *commodities* brasileiras (COMPANHIA NACIONAL DO ABASTECIMENTO, 2017).

A soja é empregada de diversas maneiras nas diferentes partes do mundo. Por exemplo, nos países asiáticos o grão é empregado há milênios para o preparo de produtos tradicionais não fermentados (como o tofu e o extrato aquoso) e fermentados (como o natto). Já nos países ocidentais, a soja é utilizada para a extração de óleo (de fritura e para o preparo de margarinas e molhos de salada). A proteína é incorporada em rações animais e utilizada como ingrediente em diversos alimentos, tais como formulações infantis, substitutos de carne e laticínios e em produtos de panificação, devido às suas boas propriedades funcionais tecnológicas, como capacidade de retenção de água e óleo, formação de emulsão, espuma e géis (GIBSON; BENSON, 2005).

Após a colheita, a soja pode ser transportada por longas distâncias, além de poder permanecer armazenada em silos até que seja processada. No Brasil, o estoque de passagem (grãos armazenados entre duas safras) de 2016/2017 está estimado em 5,42 milhões de toneladas (COMPANHIA NACIONAL DO ABASTECIMENTO, 2017).

Quando a soja é armazenada por longos períodos, principalmente em temperaturas acima de 22 °C e umidade relativa acima de 60 %, ocorrem diversas reações bioquímicas que irão resultar no envelhecimento dos grãos (KONG; CHANG; LIU; WILSON, 2008). As principais reações são a hidrólise e oxidação dos lipídios, dentre eles, os fosfolipídeos das membranas. Os radicais livres, oriundos de diversos processos metabólicos (como a respiração celular), dão início a reações de peroxidação dos ácidos graxos poli-insaturados, resultando na perda da integridade das membranas celulares, e por consequência, a descompartmentalização das células. Ao mesmo tempo, também ocorrem reações de hidrólise dos lipídeos no interior das células, e como consequência há o aumento

da acidez nos grãos, o que por sua vez, é uma das causas da redução da solubilidade e da extração das proteínas (MARCOS-FILHO, 1999; KIBINZA et al., 2011; XIN et al., 2014; SAIO et al., 1980; SHARMA et al., 2013). As reações de hidrólise e oxidação dos lipídeos resultam em danos em vários componentes celulares, como as proteínas e ácidos nucleicos e podem causar alterações (redução ou aumento) na atividade de diversas enzimas, além de alterações no perfil de isoflavonas (SAIO et al., 1980; SUNG; CHIU, 1995; KAMIZAKE; VARÉA; PRUDENCIO, 2014; NARAYAN; CHAUHAN; VERMA, 1988; HOU; CHANG, 2002; KIM; JUNG; AHN; CHUNG, 2005; LEE et al., 2003). Alguns autores observaram que, tanto no envelhecimento acelerado como natural da soja há um aumento no conteúdo de compostos secundários de oxidação lipídica nos grãos, como o malonaldeído e o hexanal (SHARMA et al., 2013; SUNG; CHIU, 1995; TIAN; SONG; LEI, 2008; BRACCINI et al., 2000).

A soja contém três formas da enzima lipoxigenase (EC 1.13.11.12) denominadas de L1, L2 e L3. Estas enzimas catalisam a hidroperoxidação do ácido linoleico e de outros ácidos graxos poliinsaturados e estão relacionadas com a geração de sabores indesejáveis durante o processamento da soja (MATOBA et al., 1985). Por atuarem na peroxidação de lipídeos, estas enzimas podem ter algum envolvimento no envelhecimento dos grãos. Entretanto o mecanismo de envolvimento ainda não está totalmente esclarecido, pois os poucos estudos existentes apresentaram resultados conflitantes. Segundo Lambrecht, Nielsen, Liska e Nielsen (1996), a ausência das lipoxigenases L2 e L3 confere maior resistência ao envelhecimento em soja armazenada em condições adversas, resultando em menores alterações nas proteínas e no produto tofu. Entretanto, outros autores observaram redução na atividade destas enzimas em soja armazenada em diversas condições, e não constataram relação entre a ausência de pelo menos duas lipoxigenases e maior resistência ao envelhecimento (SUNG; CHIU, 1995; NARAYAN; CHAUHAN; VERMA, 1988; WANG et al., 1990).

Dentre os componentes da soja estão os carboidratos solúveis, sacarose e os oligossacarídeos estaquiose e rafinose. Sabe-se que os seres humanos não possuem em seu trato digestivo a enzima α -galactosidase (EC 3.2.1.22), que hidrolisa as ligações $\alpha(1,6)$ galactosídicas, e por isso, os oligossacarídeos intactos não são absorvidos; assim, eles acumulam-se no intestino grosso, são fermentados por micro-organismos anaeróbios e conduzem à flatulência

e desconforto aos consumidores. Portanto, a redução destes oligossacarídeos é desejável para aumentar a aceitabilidade da soja e seus derivados (LIU, 1997; VIANA et al., 2005, WANG; CHEN; ZHANG, 2014; KARR-LILIENTHAL; KADZERE; GRIESHOP; FAHEY JR, 2005) e também de mercado e comercialização dos grãos e seus produtos, uma vez que aumentaria o consumo. Desta forma o estudo das alterações nestes açúcares durante o envelhecimento é interessante. Além disso, destaca-se que não foram encontrados estudos que avaliassem a atividade da α -galactosidase endógena da soja durante o envelhecimento dos grãos.

Da mesma forma, existem poucas informações sobre as interconversões das diferentes formas de isoflavonas durante o envelhecimento da soja (HOU; CHANG, 2002; LEE et al., 2003; KIM et al., 2005), especialmente referente a cultivares brasileiras (ÁVILA et al., 2011; ÁVILA et al., 2012) e não há estudos mostrando o papel da enzima β -glicosidase neste processo. Há também poucos estudos sobre as alterações nos compostos fenólicos totais e na atividade antioxidante dos grãos de soja submetidos ao envelhecimento (ÁVILA et al., 2012; LEE; CHO, 2012).

As alterações físicas e químicas nos grãos causadas pelo envelhecimento podem prejudicar e até mesmo inviabilizar o emprego da soja como ingrediente alimentar, ou ainda levar à rejeição dos produtos por parte dos consumidores. Por esta razão, é importante entender o mecanismo do envelhecimento dos grãos durante o armazenamento para encontrar ou sugerir formas de manutenção das características de qualidade dos grãos, mesmo em armazenamento prolongado, e de emprego dos grãos envelhecidos e, assim reduzir perdas na indústria de alimentos e melhorar a aceitação dos produtos pelos consumidores.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do trabalho foi avaliar a oxidação lipídica e alterações físico-químicas nas isoflavonas e carboidratos durante o envelhecimento natural ou acelerado de grãos de soja cultivares BRS 284 e BRS 257 (livre das lipoxigenases L1, L2 e L3).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar alterações no pH dos grãos de soja decorrentes do envelhecimento EA e EN.
- Medir a atividade das enzimas lipoxigenases, β -glicosidase e α -galactosidase nos grãos de soja submetidos às duas condições de envelhecimento.
- Verificar a ocorrência de oxidação lipídica nos grãos submetidos ao envelhecimento, por meio da determinação do teor de malonaldeído e da determinação e quantificação dos teores do composto volátil hexanal formados durante o envelhecimento EA e EN dos grãos.
- Determinar as alterações no perfil de isoflavonas dos grãos da soja, durante EA e EN.
- Medir a atividade antioxidante nos grãos de soja, durante EA e EN, pelos métodos de Capacidade de Sequestrar Radicais DPPH^{*}, Capacidade de Sequestrar Radical Livre ABTS⁺⁺ e Método de Redução do Ferro (FRAP).
- Verificar a mudança no perfil de carboidratos dos grãos de soja com o envelhecimento EA e EN.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 CARACTERÍSTICAS E HISTÓRICO DA SOJA

A soja é uma planta de porte arbustivo, cuja altura varia entre 0,75 a 1,25 m dependendo da cultivar e das condições de cultivo. A planta pertence à família *Leguminosae*, subfamília *Papilionoideae*, do gênero *Glycine*. Seu nome científico é *Glycine max* (L.) Merrill e, além disso, a soja é considerada, devido à sua composição, uma semente oleaginosa (SHURTLEFF; AOYAGI, 2004; LIU, 1997a). O grão é dividido em duas partes principais: a casca e o embrião. No embrião encontram-se dois cotilédones, que são estruturas de reserva para o crescimento e desenvolvimento das demais estruturas embrionárias. A casca ou tegumento protege o grão e pode ter diversas cores como verde, amarela, marrom e preta, e grãos com diferentes formatos, que podem variar entre linear e oval. Na casca encontra-se o hilo, que também pode apresentar variações de cor. Há diferenças entre as cultivares de soja quanto ao formato (esférico a oval) e tamanho do grão (7,6 a 30,3 g/100 grãos) (LIU, 1997a).

A planta é nativa do continente asiático, tendo sido domesticada na China, onde as primeiras citações escritas sobre o grão aparecem entre os anos 2883 e 2838 a.C. Da China, a soja espalhou-se pelo continente, onde até os dias atuais tem uma grande importância na alimentação desta região, sendo utilizado em produtos tradicionais, como o tofu, misso, tempeh e extrato. Do continente asiático, a soja foi levada à Europa no século XV, onde foi exposta em jardins botânicos como curiosidade, e depois às Américas. O grão chegou aos Estados Unidos no fim do século 18 e começou a ser explorado em larga escala somente na segunda década do século 20. Entretanto, somente nos anos 1960 a soja tornou-se uma cultura importante no Brasil (EMBRAPA, 2017; SHURTLEFF; AOYAGI, 2004).

Hoje, três países são responsáveis por 81,18 % da produção mundial de soja, sendo eles, em ordem decrescente de produção, Estados Unidos da América (EUA), Brasil e Argentina. Estima-se que na safra 2016/17 a produção dos EUA tenha sido de 117,21 milhões de toneladas do grão, e a da Argentina na mesma safra tenha sido de 57 milhões de toneladas. A produção do Brasil, segundo maior produtor mundial, teve um desempenho recorde nesta safra, alcançando aproximadamente 114 milhões de toneladas, com crescimento da área plantada de

1,9 %, atingindo 33.889,9 mil hectares. O Brasil é ainda o maior exportador mundial do grão, respondendo por 42,5 % de todas as exportações no mundo. O maior importador do mundo no momento é a China, com 63,9 % das importações mundiais da soja. No Brasil, a região centro-oeste é a maior produtora de soja, seguida pela região sul. No Paraná a área plantada chegou a 5.251,9 mil hectares, obtendo uma safra recorde, com uma produção de 18 % acima da safra anterior (2015/2016) (COMPANHIA NACIONAL DO ABASTECIMENTO, 2017).

Após a colheita, a soja é armazenada em fazendas e plantas de processamento em grandes silos até que seja encaminhada para sua utilização. A soja também é transportada por longas distâncias, o que aumenta o tempo de espera para ser utilizada. Há ainda os estoques de passagem mantidos pelos países, que são uma quantidade de grãos armazenados entre duas safras para estabilizar a oferta destes de ano para ano, além dos preços, e salvaguardar o suprimento dos grãos para os consumidores. No Brasil, o estoque de passagem da safra 2016/17 está estimado em 5,42 milhões de toneladas, o maior valor dos últimos dez anos, assim como o estoque de passagem para esta safra nos EUA, que está sendo estimado como o maior dos últimos 11 anos (COMPANHIA NACIONAL DO ABASTECIMENTO, 2017; USDA, 1958).

3.2 COMPOSIÇÃO DA SOJA

A soja possui um alto conteúdo de proteínas e lipídeos (aproximadamente 40 e 20 % respectivamente) quando comparada a outras leguminosas e cereais. Já o teor de carboidratos da soja é de aproximadamente 35 %. A concentração de proteínas e lipídeos dos grãos é governada por fatores genéticos, porém existe também a influência de fatores ambientais durante o período de enchimento dos grãos. Nos grãos encontram-se, ainda, diversos minerais como ferro (0,9 – 1,5 mg/100g), cálcio (0,16 – 0,47 mg/100g), fósforo (0,42 – 0,82 mg/100g), magnésio (0,22 – 0,24 mg/100g) e zinco (0,37 mg/100g). Além disso, a soja possui outros compostos de interesse, como as isoflavonas e outros compostos fenólicos (CARRÃO-PANIZZI; MANDARINO, 1998; PÍPOLO et al., 2015; LIU, 1997b).

Os componentes de maior interesse nos grãos são os lipídeos, pois os triacilgliceróis são extraídos e comercializados na forma de óleo e as proteínas,

uma vez que a soja é uma importante fonte proteica de elevado valor nutritivo e propriedades funcionais desejáveis (LIU et al., 2007; MUJOO; TRINH; NG, 2003; RIBLETT et al., 2001).

De acordo com Chen et al. (2012) a proteína da soja apresenta digestibilidade e balanço de aminoácidos essenciais satisfatórios. Das proteínas de reserva da soja, aproximadamente 90 % são classificadas como globulinas e estas são classificadas de acordo com seus coeficientes de sedimentação, sendo elas: 2S, 7S, 11S e 15S. Em maiores proporções estão a fração 7S (uma glicoproteína chamada de conglicina, que corresponde aproximadamente a 34 % das proteínas do grão), e a 11S, que contém uma proteína chamada glicina, e corresponde a aproximadamente 40 % das proteínas do grão (KINSELLA, 1979; LIU, 1997a). Essas proteínas podem ser aplicadas em diversos alimentos por apresentarem propriedades tecnofuncionais desejáveis, como solubilidade, capacidade de absorção e retenção de água, capacidade de absorção de óleo, emulsificação e formação de gel (KINSELLA, 1979). Exemplos de alimentos comuns tanto no oriente como no ocidente, cujo principal componente de soja é a proteína, são o extrato (“leite de soja”) e o tofu (obtido pela coagulação proteica, que possibilita a formação do gel) (KAMIZAKE; SILVA; PRUDENCIO, 2016).

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. Assim a proteína de soja é considerada um ingrediente com alegação de propriedade funcional relacionada à saúde (DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 1999; BRASIL, 1999).

Além destes componentes, os carboidratos, os compostos fenólicos e as isoflavonas vêm sendo estudados, pois são considerados compostos bioativos. Ainda, a soja é fonte de fibras alimentares, sendo estas o conjunto dos oligossacarídeos e dos carboidratos insolúveis do grão. Estes componentes são estudados devido a uma possível relação entre o consumo de fibras e redução de colesterol no plasma (LIU, 1997c).

3.2.1 Lipídeos

Nos grãos da soja, os lipídeos são armazenados em corpos lipídicos, sendo os triacilglicerois os principais componentes, e em menores quantidades existem os fosfolipídios e ácidos graxos livres. Entre os ácidos graxos que compõem os lipídeos da soja, o mais abundante é o ácido linoleico (C 18:2), seguido pelo ácido oleico (C 18:1), palmítico (C 16:0), linolênico (C 18:3) e esteárico (C 18:0). Entre os fosfolipídios, são encontrados na soja a fosfatidil colina (35 %), fosfatidil etanolamina (25 %), fosfatidil inositol (15 %), ácido fosfatídico (entre 5 e 10 %) e outros em menor quantidade (LIU, 1997b).

Os lipídeos da soja, além do interesse para a indústria, são de grande importância nutricional para os consumidores, pois, dos lipídeos totais da soja, aproximadamente 86 % são compostos de ácidos graxos insaturados, e destes, 60 % são ácidos graxos essenciais (ácidos linoleico e linolênico) (CARRÃO-PANIZZI; MANDARINO, 1998). Em estudo realizado com cultivares brasileiras, foram encontrados os seguintes ácidos graxos, cuja concentração está apresentada em g/kg de massa seca: palmítico (118,8 a 139), oleico (155,8 a 259,1), linoleico (494,3 a 591,6) e linolênico (55,4 a 83,8) (SILVA; CARRÃO-PANIZZI; PRUDENCIO, 2009). Já Vieira, Cabral e De Paula (1999) observaram em outras cultivares brasileiras a presença dos ácidos graxos mirístico (C 14:0), palmítico (C16:0), palmitoléico (C16:1), esteárico (C18:0), oleico (C18:1), linoleico (C18:2) e linolênico (C18:3). Destes, os principais ácidos graxos encontrados foram os ácidos oleico (aproximadamente 25 %) e linoleico (aproximadamente 53 %).

A concentração de lipídeos e sua composição são fatores muito importantes que devem ser considerados durante o armazenamento dos grãos e sua utilização, pois se sabe que quanto maior a concentração de ácidos graxos insaturados, maior a velocidade das reações de oxidação dos lipídeos (ARAÚJO, 2004).

3.2.1.1 Hidrólise de lipídeos

A hidrólise de lipídeos consiste na liberação de ácidos graxos (entre os quais os ácidos linoleico e linolênico) que estão esterificados a uma molécula de glicerol, ou de fosfolipídeos, pela ação de enzimas como as lipases e as

fosfolipases, além de ocorrer em óleos submetidos a altas temperaturas, como aquelas empregadas em processos de fritura. Estes ácidos graxos livres geram odores indesejados, e por estarem livres, ficam mais expostos às reações de oxidação, reduzindo, portanto, a estabilidade oxidativa dos alimentos (McCLEMENS; DECKER, 2010; ARAÚJO, 2004).

Durante o armazenamento, os grãos são susceptíveis à hidrólise, principalmente enzimática. Portanto, a fim de assegurar um apropriado armazenamento pós-colheita de grãos, as lipases e fosfolipases devem ser inativadas, pois, do contrário, atuam liberando ácidos graxos livres mesmo após a morte celular dos tecidos. Além disso, para manter a estabilidade dos lipídeos é necessário o controle do conteúdo de umidade dos grãos (recomenda-se mantê-la a abaixo de 14 %), pois o aumento pode acelerar as reações de hidrólise dos lipídeos (ARAÚJO, 2004).

3.2.1.2 Oxidação lipídica

A oxidação de lipídeos ocorre por meio de uma cadeia de reações que têm início quando os lipídeos de um alimento reagem com o oxigênio. Nas reações de oxidação de lipídios, ocorrem alterações dos ácidos graxos e fosfolipídios presentes no alimento, e há a formação de moléculas menores, que são os produtos de decomposição. Dentre os produtos de decomposição estão compostos voláteis como aldeídos, cetonas, álcoois e hidrocarbonetos, que são conhecidos por conferir aromas e sabores indesejados aos alimentos. Tanto os ácidos graxos livres quanto os grupos acil-graxos podem sofrer oxidação (GORDON, 2001; McCLEMENS; DECKER, 2010). A oxidação dos lipídeos provoca, ainda, mudanças nos demais componentes dos alimentos, como as proteínas, que também resulta em alterações no sabor, aroma, aparência e valor nutritivo dos alimentos (ARAÚJO, 2004).

Há três etapas nas reações de oxidação lipídica: iniciação, propagação e terminação. A iniciação ocorre quando há a retirada de um hidrogênio de uma molécula de ácido graxo, por espécies reativas ou radicais livres (por exemplo, o radical hidroxil (OH)) e, a partir desta reação, ocorre a formação de um radical alquil (L·). Os ácidos graxos insaturados são oxidados mais facilmente, pois, quanto maior o número de insaturações, menor será a energia necessária para

abstrair o átomo hidrogênio, pois a energia de dissociação da ligação covalente entre C-H é menor quando o átomo de carbono está adjacente a uma ligação dupla. Na etapa de propagação ocorre a formação do radical peroxil (LOO·). Este radical peroxil pode retirar o hidrogênio de outra molécula, e assim propagar a reação de um ácido graxo para outro. Pode ocorrer também a adição de um hidrogênio ao radical peroxil, formando um hidroperóxido de ácido graxo (LOOH). Dois radicais podem combinar-se para formar espécies não radicais, sendo esta etapa chamada de terminação. A decomposição dos hidroperóxidos leva à formação de radicais alcooxil (LO·), que ainda podem se decompor originando diversos compostos de baixa massa molecular, como aldeídos, cetonas, álcoois e hidrocarbonetos (McCLEMENS; DECKER, 2010; GORDON, 2001).

Os produtos formados nas reações de oxidação são classificados em primários e secundários. Os produtos primários são formados durante as etapas de iniciação e propagação, e os secundários são os compostos formados a partir da decomposição dos produtos primários, como por exemplo, o hexanal, as carbonilas e o malonaldeído (McCLEMENS; DECKER, 2010). Aldeídos voláteis, como o hexanal, conferem aroma e sabor indesejáveis aos alimentos sendo por esta razão, os compostos de escolha quando se deseja monitorar a ocorrência de oxidação nos alimentos (GORDON, 2001).

Tendo em vista que os grãos de soja possuem um alto teor de lipídeos, e ainda uma alta proporção de ácidos graxos insaturados em sua composição, especialmente o ácido linoleico, a soja é susceptível à ocorrência de reações de oxidação durante o armazenamento. A peroxidação lipídica em grãos depende da umidade do grão, da temperatura de armazenamento e também da concentração de oxigênio do ambiente, sendo que teores de umidade do grão abaixo de 6 % e acima de 12 % são ideais para a ocorrência de reações de autooxidação (LIU, 1997; MURTHY; SUN, 2000). Além das reações de oxidação de lipídeos catalisadas por radicais livres, as reações de oxidação também podem ser catalisadas pelas enzimas lipoxigenases, que estão presentes em diversos tecidos animais e vegetais, como na soja (ARAÚJO, 2004).

3.2.1.3 Lipoxigenases

Tecidos de diversas plantas e animais contêm enzimas conhecidas como lipoxigenases (LOX; EC 1.13.11.12). A função das lipoxigenases nos tecidos vivos e intactos de vegetais ainda está sendo estudada e não está bem esclarecida, porém, há indícios de que estas enzimas possam ter algum tipo de envolvimento na biossíntese de ácido jasmônico (um hormônio relacionado com regulação do crescimento), podendo estar relacionadas também com a produção de substâncias presentes durante o amadurecimento de frutos e no desenvolvimento de sementes, e ainda ter algum papel na produção de traumatina, um hormônio relacionado com a proteção contra injúrias mecânicas na planta (BORDINGNON; MANDARINO, 1994; PRIGGE et al., 1996).

Essas enzimas catalisam a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados na presença de oxigênio molecular produzindo hidroperóxidos, tendo como principal substrato os ácidos linoléico e linolênico. Nas plantas, as reações catalisadas pelas enzimas lipoxigenases produzem diversos compostos voláteis similares aos produzidos durante as reações de autooxidação, como aldeídos, cetonas e álcoois, sendo que dentre estes, o hexanal é o principal composto, o qual é o maior responsável por alterações de aroma e sabor nos grãos (LIU, 1997b). As lipoxigenases também estão associadas com o aparecimento de sabores indesejáveis na soja (*beany flavor*) durante o processamento, principalmente durante a produção de extrato aquoso, quando os grãos são imersos em água.

Acredita-se que a soja seja a maior fonte de lipoxigenases entre os vegetais, sendo que em seus grãos foram caracterizadas três isoformas principais da enzima, denominadas de L1, L2 e L3. Cada uma destas isoformas apresenta características diferentes quanto ao pH ótimo e substrato, em condições de laboratório. A isoforma L1 tem pH ótimo em torno de 9,0 e atua sobre substratos aniônicos. Já as isoformas L2 e L3 agem sobre substratos livres (ácidos graxos livres) ou esterificados, como os triacilgliceróis, com pH ótimo próximo ao neutro (LIU, 1997b; GORDON, 2001).

Como as lipoxigenases catalisam reações de oxidação de lipídeos dos grãos, elas podem estar relacionadas com o processo de deterioração e envelhecimento durante armazenamento dos grãos. Como a atividade das enzimas lipoxigenases resulta na formação de compostos voláteis na soja, destacando-se o composto hexanal, alguns autores sugerem que a eliminação destas enzimas poderia contribuir com uma menor ocorrência de oxidação lipídica nos grãos, e desta

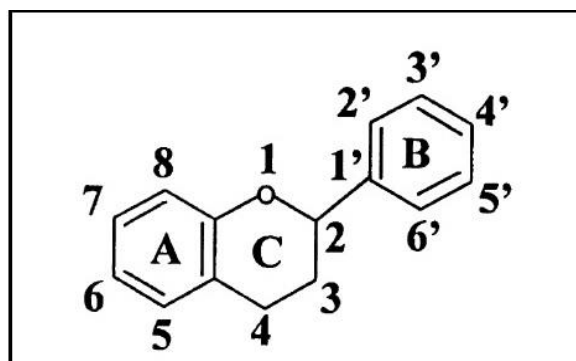
forma aumentar a estabilidade dos grãos ao armazenamento (MATOBA et al., 1985; WILSON; McDONALD, 1986; FURUTA et al., 1996).

3.2.2 Compostos fenólicos da soja e atividade antioxidante da soja

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários das plantas, derivados principalmente do aminoácido fenilalanina. Os compostos fenólicos são moléculas que possuem pelo menos um anel aromático contendo um ou mais grupos hidroxila, e podem ter outros grupos funcionais em sua estrutura. Nas plantas em geral, pode ser encontrada uma grande variedade de compostos fenólicos, desde fenólicos simples, como os fenóis, fenilpropanóides, derivados do ácido benzóico e os flavonóides, até polifenólicos, como os taninos, lignanas e as ligninas. Os compostos fenólicos têm diversas funções nas plantas, tais como: proteção contra patógenos, pigmentação, ação antimicrobiana, ação como sinalizadores no estabelecimento de relação simbiótica com rizóbios e na atração de polinizadores, além de fazerem parte da estrutura de paredes celulares (SHAHIDI; NACKZ, 2006).

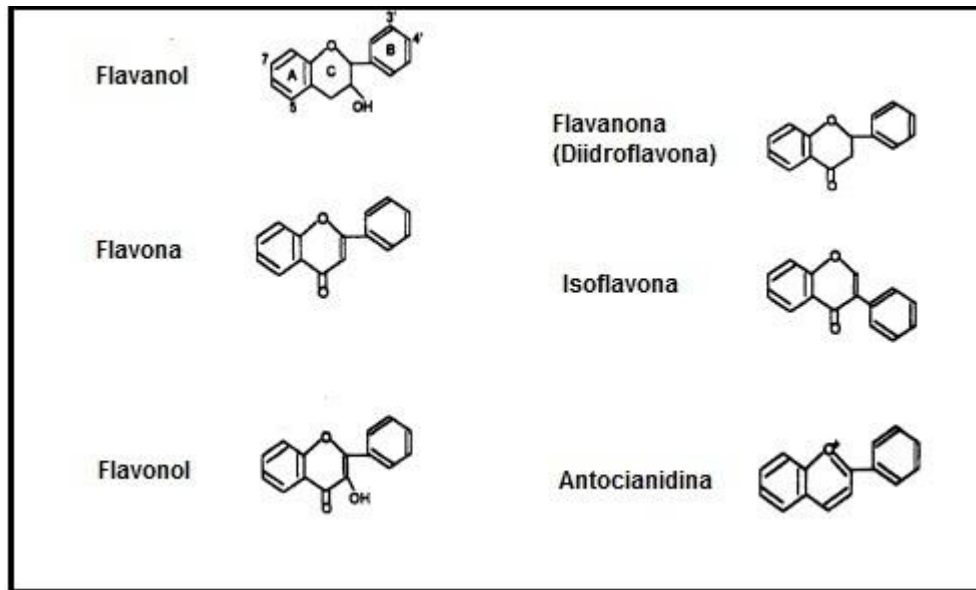
Uma das maiores classes de compostos fenólicos encontrada em plantas são os flavonóides. Estes compostos possuem uma estrutura básica referida como C₃-C₆-C₃ (Figura 1). Fazem parte desta classe, as flavonas, flavanóis e flavonóis, flavanonas, antocianidinas e as isoflavonas, sendo que as diferentes classes de flavonóides são diferenciadas pelas posições das insaturações e substituições de radicais (Figura 2). Sendo assim, o que diferencia as isoflavonas das demais classes de flavonóides, por exemplo, é a ligação do anel fenil na posição C3, ao invés da posição C2 (SHAHIDI; NACKZ, 2006).

Figura 1 – Estrutura química básica dos flavonóides



Fonte: Heim; Tagliaferro; Bobilya, 2002.

Figura 2 – Estrutura química básica dos flavonóides: flavanol, flavona, flavonol, flavanona, isoflavona e antocianidina.



Fonte: Heim; Tagliaferro; Bobilya, 2002. Adaptada pelo autor.

Nas células de todos os seres vivos podem ser encontrados sistemas de defesa contra a oxidação, os antioxidantes. Nas células vegetais encontram-se mecanismos enzimáticos e não enzimáticos para proteção contra o estresse oxidativo. Dentre os mecanismos enzimáticos de proteção contra oxidação estão enzimas como as superóxido dismutases e as catalases. Já entre os antioxidantes não enzimáticos, os principais são os compostos fenólicos, que podem atuar como sequestradores de radicais livres, interrompendo a cadeia de reações de oxidação. Estes compostos (AH) têm a capacidade de doar um elétron para o radical livre ($\text{LOO}\cdot$, $\text{LO}\cdot$) que possui um elétron desemparelhado reduzindo-o e formando um radical antioxidante ($\text{A}\cdot$) que é estável, o que interrompe a reação em cadeia da oxidação (SHI; NOGUCHI; NIKI, 2001; McCLEMENS; DECKER, 2010; YANISHLIEVA-MASLAROVA, 2001). Como o estresse oxidativo resulta em macromoléculas (proteínas, os lipídeos e os ácidos nucleicos) celulares danificadas, os referidos mecanismos antioxidantes são importantes para a manutenção do funcionamento das células (KIBINZA et al., 2011).

A soja contém diversas moléculas com atividade antioxidante, por exemplo, os ácidos fenólicos e as isoflavonas, além de outros flavonóides e os tocoferóis, sendo que a soja apresenta as quatro formas de tocoferóis que ocorrem naturalmente (α , β , γ e δ) (HALL, 2001; KUMAR et al., 2009). Alu'datt et al. (2013)

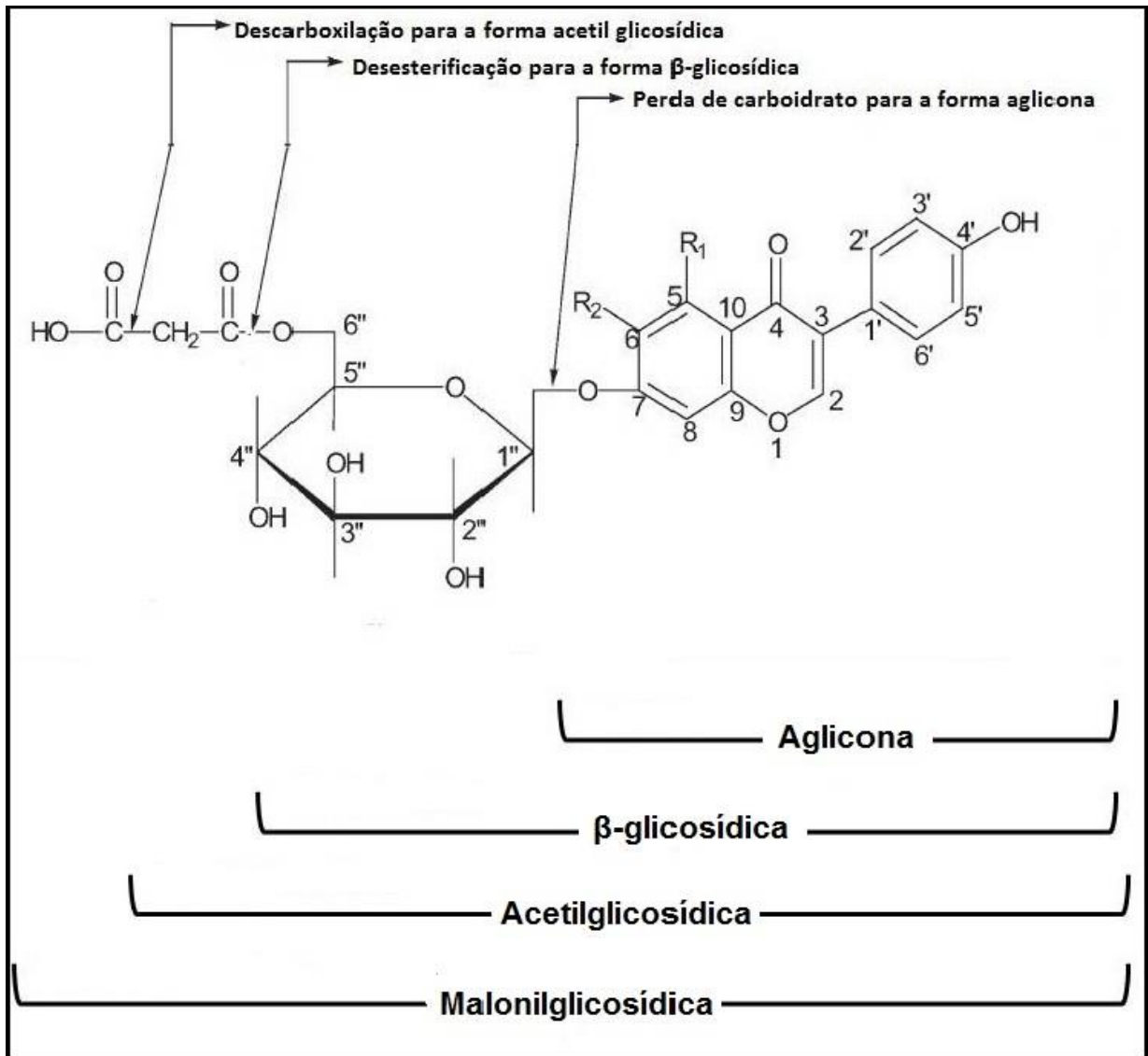
encontraram na farinha desengordurada de soja os compostos fenólicos quercitina, ácido *p*-coumárico, ácido ferúlico, ácido sinápico, ácido gálico, ácido protocatecúlico, ácido hidroxibenzóico, ácido siríngico e rutina. Já Chung et al. (2008) analisaram os compostos fenólicos da soja e concluíram que, nas 20 cultivares estudadas, as isoflavonas são os compostos fenólicos mais abundantes. Os autores encontraram também, nos grãos de soja, ácidos fenólicos e outros flavonóides. Entre as cultivares, foram observadas diferenças no conteúdo e no perfil de fenólicos devido às diferenças genéticas e condições de cultivo das cultivares analisadas.

Diversos autores encontraram correlação positiva entre o conteúdo de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante da soja (BARBOSA et al., 2006; XU; YUAN; CHANG, 2007; MALENCIC et al., 2008; DEVI et al., 2009). Como existem diferenças entre as cultivares de soja quanto ao conteúdo de fenólicos totais, conseqüentemente, pode haver diferenças na atividade antioxidante (CHUNG et al., 2008). Zilic et al. (2013) estudando soja amarela, verificaram que os compostos fenólicos como as isoflavonas e o ácido ferúlico podem estar concentrados nos cotilédones e no embrião, razão pela qual a atividade antioxidante do grão sem casca é maior do que da casca do grão.

3.2.2.1 Isoflavonas

As isoflavonas são um grupo de compostos fenólicos pertencente à classe dos flavonóides, que possuem dois anéis benzílicos ligados por três carbonos, podendo ou não ser fechados em um anel pirano, e sendo assim, sua estrutura pode ser simplificada como C₃ - C₆ - C₃. As isoflavonas são encontradas somente em famílias botânicas que possuem a enzima chalcona isomerase, que é capaz de converter a 2(R)-naringina em 2-hidroxiidzeína, um precursor das isoflavonas, sendo a soja a planta onde se encontra a maior quantidade de isoflavonas entre os vegetais (LIU, 1997b). Na soja são encontradas 12 isoflavonas, em quatro formas químicas diferentes (Figura 3): uma na forma aglicona (genisteína, daidzeína e gliciteína), e três formas glicosídicas: β-glicosídica (genistina, daidzina e glicitina), malonilglicosídica (6'-O-malonilgenistina, 6'-O-malonildaizina, 6'-O-malonilglicitina) e acetilglicosídica (6'-O-acetilgenistina, 6'-O-acetildaizina, 6'-O-acetilglicitina) (HOU; CHANG, 2002).

Figura 3 – Estruturas químicas das isoflavonas de soja



Agliconas

R ₁	R ₂	Composto
H	H	Daidzeína
OH	H	Genisteína
H	OCH ₃	Gliciteína

Fonte: Kim et al. (2005b); Liu (1997b). Adaptada pelo autor.

Podem ocorrer interconversões entre as diferentes formas de isoflavonas (Figura 3). Niamnuy et al. (2011) encontraram evidências de conversão das isoflavonas das formas malonilglicosídicas em β-glicosídicas por meio de

reações de desesterificação em grãos de soja submetidos a diferentes processos de secagem a altas temperaturas (50 a 150 °C, até 120 minutos). Da mesma forma, Park et al. (2002) observaram aumento das formas β -glicosídicas e redução das formas malonilglicosídicas após tratamento térmico (121 °C) por 40 minutos de farinhas desengorduradas de soja. Ao avaliar o conteúdo das diferentes formas de isoflavonas em produtos de soja, Wang e Murphy (1994) observaram que em produtos submetidos ao processo de extrusão ou torra (calor seco) houve aumento das formas acetilglicosídicas e redução das formas malonilglicosídicas, por um processo denominado de descarboxilação. A interconversão das formas glicosídicas em agliconas também pode ocorrer por meio de ação enzimática, na qual a enzima β -glicosidase hidrolisa a ligação β -glicosídica entre a aglicona e a molécula de açúcar (ESEN, 2003; MATSUURA; OBATA, 1993).

O tratamento hidrotérmico de grãos de soja (41 a 65 °C, 3 a 9 horas) favorece a ação da β -glicosidase, obtendo-se assim maiores teores de isoflavonas agliconas. No entanto, durante este tratamento pode haver perdas no conteúdo de isoflavonas totais, por causa da instabilidade térmica das formas malonilglicosídicas (LIMA; IDA, 2014). Por outro lado, o processamento térmico dos grãos de soja em água (40 a 65 °C, por até 3,4 horas) para a produção de extrato aquoso resulta em aumento das formas agliconas e redução nas formas malonilglicosídicas, por ação da β -glicosidase e da temperatura (BAÚ; IDA, 2015).

O teor e as formas das isoflavonas nos grãos podem sofrer alterações de acordo com o genótipo das cultivares da soja e também podem ser influenciados pelo ambiente (temperatura e teor de umidade durante o cultivo) (KIM et al., 2005b). Também há diferenças na distribuição das isoflavonas entre as partes constituintes do grão, conforme estudo realizado por Eldridge e Kwolek (1983), em que a maior proporção de isoflavonas foi observada no hipocótilo (1400 – 1750 mg/100 g) e nos cotilédones dos grãos (158 – 319 mg/100 g), enquanto que na casca foi encontrado somente de 10 a 20 mg/ 100 g. Os autores também observaram diferenças no teor e forma das isoflavonas entre as 4 cultivares estudadas e anos de colheita em um mesmo local. Diferenças no conteúdo de isoflavonas em relação a cultivares, local e ano de colheita tem sido relatado por diversos autores (LEE et al., 2003a; LEE et al, 2003b; KIM et al., 2005b; CHUNG et al., 2008; DEVI et al., 2009; KIM et al., 2012b; SAKTHIVELU et al., 2008; SILVA, CARRÃO-PANIZZI; PRUDENCIO, 2009; BENASSI; PRUDENCIO, 2013).

Por exemplo, Kim et al. (2012a) notaram diferenças na concentração de isoflavonas entre cultivares de soja de diferentes países. Porém, em todas as cultivares a concentração das formas glicosídicas foi maior do que das agliconas. Há diversos relatos de que no grão de soja sem qualquer tratamento, as formas malonilglicosídicas são as predominantes, seguidas pelas glicosídicas, agliconas e por último as acetilglicosídicas (KIM et al., 2012b; SAKTHIVELU et al., 2008; CHUNG et al., 2012). Entretanto, apesar das formas glicosídicas serem encontradas em maior concentração no grão de soja, as agliconas são melhor absorvidas pelo organismo humano, como demonstrado pelo estudo realizado por Izumi et al. (2000).

Na literatura científica, as isoflavonas têm recebido muita atenção devido a vários estudos que as têm relacionado a diversos benefícios à saúde e à atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*. Segundo Arora, Nair e Strasburg (1998) as isoflavonas, devido à sua estrutura polifenólica, podem doar átomos de hidrogênio para os radicais livres, resultando em radicais fenoxil menos reativos, e, portanto, apresentam atividade antioxidante. Além disso, atuam como quelantes de metais. Os autores estudaram a atividade antioxidante das isoflavonas genisteína e daidzeína sobre a peroxidação lipídica em lipossomos. Quando a peroxidação lipídica foi iniciada por íons ferro, as isoflavonas citadas apresentaram efeito inibitório sobre a peroxidação. A genisteína apresentou maior atividade antioxidante do que a daidzeína, pois a genisteína apresenta uma hidroxila no C-5, a qual não é encontrada na daidzeína.

De acordo com Liu, Chang, Wiesenborn (2005) as isoflavonas de soja apresentaram atividade antioxidante *in vitro*, mesmo em baixas concentrações (25 ppm). Por outro lado, em ratos, as isoflavonas demonstraram capacidade de aumentar a atividade de enzimas antioxidantes, como a catalase e a superóxido dismutase, em diversos órgãos, como pulmão e intestino delgado, somente quando administradas isoladas, em altas concentrações (250 ppm). Já a alimentação dos ratos com tofu, com concentração mais baixa de isoflavonas (50 ppm), mostrou-se mais eficiente em aumentar a atividade das enzimas citadas, provavelmente devido à presença de proteínas e outros fenólicos da soja.

As isoflavonas, cuja estrutura química é semelhante à do hormônio feminino estrogênio, são a forma mais comum de fitoestrogênio, e podem exercer efeitos estrogênicos no organismo humano (DEVI et al., 2009; KIM et al., 2012b). Song, Hendrich e Murphy (1999) realizaram um estudo em que constataram que as

formas agliconas gliciteína e genisteína apresentaram atividade estrogênica *in vitro*, pois foram capazes de ligar-se ao receptor de estrogênio nas células. Além disso, as isoflavonas citadas demonstraram atividade estrogênica em fêmeas de ratos, sendo que a gliciteína apresentou maior atividade do que a genisteína.

Há relatos da ação das isoflavonas na redução no risco de doenças coronarianas e câncer de próstata. Em estudo realizado por Anthony et al. (1996) com macacos Rhesus, a redução nos níveis colesterolêmicos, associados ao desenvolvimento de arteriosclerose, foi relacionada às isoflavonas da soja presentes na alimentação. Flavonas, flavonóis, flavononas e isoflavonas (compostos fenólicos) demonstraram, *in vitro*, atividade antiproliferativa de células de câncer de cólon. Porém, a atividade antiproliferativa não pôde ser relacionada com a capacidade antioxidante destes compostos (KUNTZ; WENZEL; DANIEL, 1999).

No estudo de Suzuki et al. (2002) a proliferação de células de duas linhagens de câncer de próstata humana foi inibida *in vitro* pelo tratamento com a isoflavona genisteína. A efetividade da inibição foi dependente da dose administrada. Houve uma redução na expressão de genes importantes para a regulação da proliferação das células como resultado do tratamento com a genisteína.

A ingestão de soja por ratos machos desde o nascimento pode ter propriedades anticarcinogênicas, evitando o aparecimento de câncer de próstata. Acredita-se que este efeito possa ser desempenhado pelas isoflavonas da soja, por apresentarem atividade estrogênica, porém, podem existir outros mecanismos de ação ainda não elucidados (MAKELA et al., 1995).

Foi observado que a administração oral de isoflavonas (5 mg por dia, por três dias) em ratos conferiu um efeito protetor aos pulmões contra injúrias induzidas por um tratamento de radiação, por meio de um mecanismo de modulação dos mediadores da inflamação (ABERNATHY et al., 2017). Ainda existem muitos estudos que estão sendo realizados para determinar o papel das isoflavonas e seus possíveis efeitos na saúde humana. Ressalta-se que as isoflavonas das formas agliconas são melhor absorvidas pelo organismo humano do que suas respectivas formas glicosídicas, e que há indícios que dentre as formas agliconas, a genisteína é absorvida mais eficientemente e possui maior atividade antioxidante do que a daidzeína (IZUMI et al., 2000; SUZUKI et al., 2002; EASON, et al., 2005; ARORA; NAIR; SATRASBURG, 1998).

3.2.3 Carboidratos

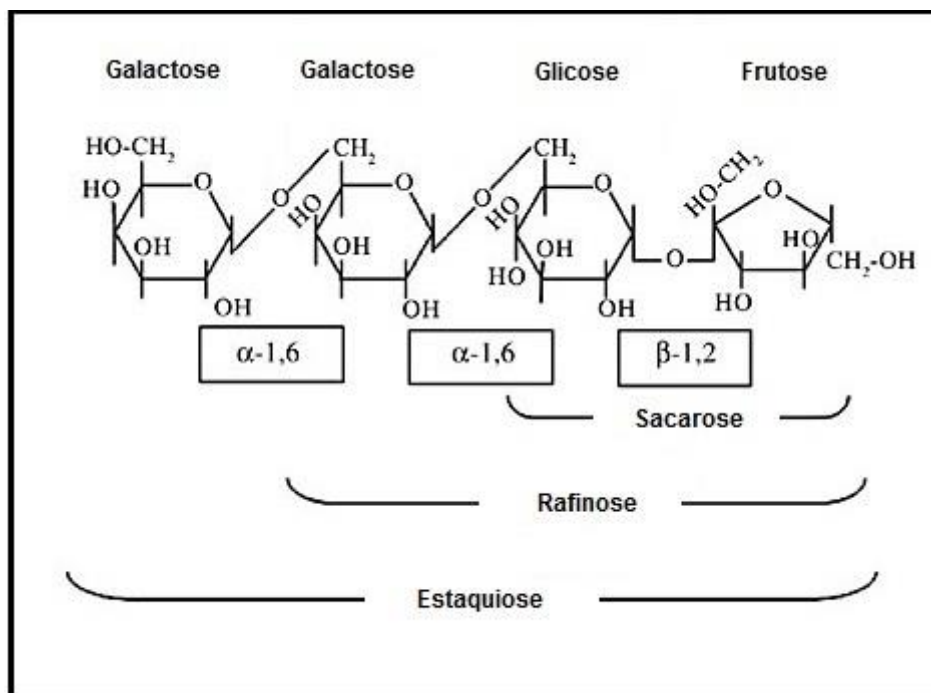
Da composição total da soja, 35 % são carboidratos. Nos grãos maduros podem ser encontrados principalmente o dissacarídeo sacarose e os oligossacarídeos rafinose e estaquiose, além dos monossacarídeos glicose e frutose, sendo estes os carboidratos solúveis do grão. Entre os carboidratos insolúveis estão a celulose, a hemicelulose e a pectina, sendo que estes têm função estrutural e estão localizados em maior quantidade na casca dos grãos. O amido é encontrado somente em quantidades traços (SALDIVAR et al., 2010; GIANNOCARO; WANG; CHEN, 2008; LIU, 1997b). A sacarose é o carboidrato solúvel presente em maior quantidade (aproximadamente 5 % dos carboidratos), enquanto que os teores de estaquiose e a rafinose são de aproximadamente 3,8 % e 1,2 % respectivamente (CARRÃO-PANIZZI; MANDARINO, 1998). Os oligossacarídeos da soja (rafinose e estaquiose principalmente) possuem unidades de frutose, glicose e galactose, e estes açúcares são unidos por ligações β -frutósídicas e α -galactosídicas (Figura 4) (LIU, 1997b).

Em extrato de soja obtido de grãos da cultivar BRS 257, Baú, Garcia e Ida (2015) notaram um conteúdo de sacarose de $5,77 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$, seguido dos oligossacarídeos estaquiose ($3,85 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) e rafinose ($1,28 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$). Já os monossacarídeos galactose, glicose e frutose foram encontrados em conteúdos mais baixos ($0,15 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$, $0,23 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ e $0,35 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$, respectivamente). Silva, Carrão-Panizzi e Prudencio (2009), analisando os teores de carboidratos de cinco cultivares brasileiras de soja, notaram diferenças entre as cultivares quanto aos teores de sacarose, rafinose e estaquiose, cujos valores variaram de 34 a 43,5 g/Kg, 4 a 9,5 g/kg e 20 a 35 g/kg, respectivamente. Neste estudo não foram encontrados os monossacarídeos glicose e frutose.

Os seres humanos não são capazes de digerir os oligossacarídeos rafinose e estaquiose, uma vez que não possuem em seu intestino, a enzima α -galactosidase que catalisa a hidrólise destes açúcares. Desta forma, quando estes oligossacarídeos são ingeridos, eles são metabolizados no intestino por bactérias presentes na microbiota intestinal o que resulta na formação de gases, e desconforto abdominal. Sendo assim, estes oligossacarídeos são considerados indesejáveis na soja e em outras leguminosas, como o feijão. Por sua vez, o dissacarídeo sacarose, é considerado desejável, por causa de seu gosto doce, que poderia melhorar o

sabor de produtos derivados da soja como o extrato aquoso e o tofu (WANG; CHEN; ZHANG, 2014; LIU, 1997b). Segundo Silva et al. (2012), há correlação positiva entre o teor de açúcares na soja e o aroma e sabor doce. Além disso, Silva, Carrão-Panizzi e Prudencio (2009) notaram que a cultivar de soja BRS 267 apresentou maior sabor doce após cozimento dos grãos, e esta característica foi correlacionada a um maior teor de frutose nesta cultivar, quando comparada às outras quatro cultivares empregadas no estudo.

Figura 4 – Estrutura química dos oligossacarídeos da soja.



Fonte: Adaptado pela autora de LeBlanc et al. (2004).

3.2.3.1 α -Galactosidase

A enzima α -D-galactosidase (EC 3.2.1.22) catalisa a hidrólise de diferentes oligossacarídeos que possuem ligação $\alpha(1-6)$ galactosídica, liberando galactose, sendo que entre seus substratos são encontrados a melibiose, a rafinose e oligossacarídeos similares, além de polímeros contendo α -galactose (galactomananas) (BAKUNINA et al., 2014, GÓES; RIBEIRO, 2002). Esta enzima é encontrada em bactérias, fungos e plantas, inclusive na soja (TABORDA; CARDOSO; KARP, 2016). Guimarães et al. (2001) extraíram duas formas da enzima α -galactosidase (P1 e P2) a partir da soja germinada e as caracterizaram. Ambas

demonstraram atividade em temperatura entre 20 e 70 °C e pH entre 6,5 e 7,0. A atividade máxima das enzimas ocorreu nas temperaturas de 45 e 50 °C e pH de 5,0 e 5,5. Os autores observaram, ainda, que a enzima P2 foi capaz de hidrolisar rafinose e estaquiose em extrato aquoso de soja após incubação por 8 horas a 30 °C. Viana et al. (2005) observaram redução nos conteúdos de rafinose, estaquiose e sacarose durante a germinação de soja, com aumento nos teores de frutose. Segundo os autores, a α -galactosidase endógena foi capaz de atuar sobre os oligossacarídeos rafinose e estaquiose e apresentou atividade máxima a 60 °C e pH 5,0.

3.3 ENVELHECIMENTO DOS GRÃOS DE SOJA

Após a colheita, enquanto a soja é transportada ou armazenada durante longos períodos, ocorrem diversas alterações bioquímicas nos grãos, que em conjunto são denominadas de envelhecimento. Como resultado os grãos perdem a qualidade fisiológica e tornam-se incapazes de germinar, além disso, perdem também a qualidade como matéria prima para o processamento de vários alimentos, como o extrato e tofu (BAILLY, 2004; SUNG; CHIU 1995; LIU, 1997a; MARCOS FILHO, 1999). Para que o processo de envelhecimento seja amenizado ou ao menos retardado, recomenda-se que os grãos contenham umidade de no máximo 10 % e que sejam armazenados em condições de baixa temperatura (até 22 °C) e umidade relativa (UR) (abaixo de 60 %) (LIU, 1997c; KONG et al., 2008). Condições superiores a estas aceleram as reações bioquímicas que causam o envelhecimento dos grãos. Essas reações estão associadas ao processo de respiração dos grãos durante o armazenamento. Tendo em vista que a taxa de respiração é influenciada pela temperatura e UR do ambiente de armazenamento, quanto mais elevados forem estes parâmetros, e também a umidade do grão, maior será a taxa respiratória, causando assim aumento da velocidade nas reações bioquímicas nos grãos (LIU, 1997a).

Grande parte dos pesquisadores que estudam o envelhecimento em grãos credita o início do processo às reações de hidrólise e peroxidação de lipídeos dos tecidos que compõem os grãos, em especial dos fosfolipídeos das membranas celulares, causando a descompartmentalização celular e a desorganização do metabolismo. Estas reações em conjunto com a

desorganização dos sistemas metabólicos do grão dão origem a diversos compostos ácidos, como os ácidos graxos livres, que resultam no aumento da acidez nos tecidos. Os produtos formados a partir das reações de hidrólise e oxidação lipídica são capazes de causar danos a outras macromoléculas, como as proteínas e o DNA. A acidez contribui com a redução ou perda da atividade de diversas enzimas (HOU; CHANG, 2004a, 2004b; BAILLY, 2004; STEWART; BEWLEY, 1980; SAIO et al., 1980; SUNG; CHIU 1995; LIU, 1997a; MARCOS FILHO, 1999, XIN et al., 2014, KAMIZAKE, SILVA, PRUDENCIO, 2016; KAMIZAKE, SILVA, PRUDENCIO, 2017).

A redução da atividade de diversas enzimas e a formação de compostos associados às reações de oxidação lipídica foram observadas em muitos estudos envolvendo envelhecimento de soja. Sung e Chiu (1995) notaram declínio na atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase, peroxidase e ascorbato peroxidase em soja armazenada por 12 meses a 25 °C. Como estas enzimas têm função antioxidante nos grãos, ou seja, houve redução na capacidade de limitar os danos causados pela presença de radicais livres e peróxidos nos grãos. E este efeito está de acordo com o aumento do teor de malonaldeído observado indicando, aumento da peroxidação lipídica com o armazenamento. Como consequência os autores também notaram redução na taxa de germinação dos grãos. Resultados similares foram encontrados para soja armazenada a 45 °C e 100 % UR durante 12 dias (SUNG, 1996) e para outras sementes, como girassol e amendoim (BAILLY et al., 1996; SUNG; JENG, 1994). Tian, Song e Lei (2008) constataram aumento na taxa respiratória com o armazenamento de soja a 40 °C e 100 % UR e também na produção de radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e malonaldeído. Por outro lado, a atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase, ascorbato peroxidase e glutathione redutase foi reduzida ao final dos 20 dias de experimento.

De forma similar, Sharma et al. (2013), após armazenamento da soja por 180 dias sem controle de umidade relativa e temperatura (envelhecimento natural), observaram aumento no conteúdo de ácidos graxos livres e redução no conteúdo de açúcares solúveis e açúcares redutores. Notaram também aumento da peroxidação lipídica, expressa em teor de malonaldeído formado, enquanto as enzimas catalase e a peroxidase tiveram sua atividade reduzida durante o armazenamento. Xin et al. (2014) também

encontraram aumento no teor de malonaldeído com o envelhecimento acelerado de soja (41 dias, 40 °C), além de evidências da perda de integridade da membrana celular, alteração na atividade de diversas enzimas e danos às mitocôndrias.

O aumento no teor de hexanal em grãos de soja submetidos ao armazenamento em condições ambientais de temperatura e UR, por até seis meses foi observado por Braccini et al. (2000), que também notaram a redução nos teores de proteínas, lipídeos e ácidos graxos poliinsaturados. Enquanto que Achouri, Boye e Zamani (2008) verificaram uma redução no teor de compostos voláteis após 10 meses de armazenamento (22 °C, 30 % UR), em especial o hexanal.

Em óleo extraído dos grãos de soja após o armazenamento por até seis meses (nas temperaturas de 20, 30 e 40 °C, umidade do grão entre 11,2 e 14,8 %), Alencar et al. (2010) constataram aumento no valor de peróxidos e no conteúdo de ácidos graxos livres, sendo estas alterações mais acentuadas em combinações de temperaturas e umidades do grão elevadas.

Giurizatto et al. (2012) avaliaram o teor de α -tocoferol (vitamina E) em grãos de soja submetidos ao armazenamento natural (15 °C 60 % UR) e artificial (41 °C, sem controle de UR) por 180 dias, e notaram aumento no teor de α -tocoferol nos dois tratamentos, ao longo do tempo de armazenamento. Os tocoferóis são antioxidantes naturais, que podem contribuir para limitar a peroxidação lipídica, pois reduzem os níveis de espécies reativas de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio e o radical superóxido. Portanto, segundo os autores, o aumento no teor de α -tocoferol dos grãos de soja pode ser uma resposta às reações bioquímicas que possivelmente ocorrem durante o armazenamento, e uma forma de prevenção aos danos. Os autores, entretanto, somente analisaram o teor de α -tocoferol, e não determinaram os níveis de peroxidação lipídica ou de outros antioxidantes dos grãos.

Um dos componentes do grão mais estudado em relação ao envelhecimento são as proteínas. Diversos autores relataram a redução na solubilidade proteica e na sua extração a partir de grãos submetidos a diversas condições de envelhecimento acelerado e natural. Dessa forma, há redução no conteúdo proteico no extrato aquoso e consequentes prejuízos tanto no rendimento como nas características físicas, químicas e sensoriais de produtos

como o extrato aquoso e tofu. Estudos indicam que a redução da solubilidade das proteínas é provocada pelo aumento da acidez, que por sua vez, é consequência dos produtos originados de reação de hidrólise dos lipídeos durante o envelhecimento. As alterações moleculares das proteínas (como redução na hidrofobicidade de superfície) conduzem à desnaturação proteica, o que por sua vez torna as proteínas menos solúveis (SAIO et al., 1980; SAIO; KOBAYAKAWA; KITO, 1982; KONG et al., 2008, HOU; CHANG, 1998, 2003, 2004a, 2004c; KONG; CHANG, 2013; BOM, 2013; YOSHIDA, 2014; KAMIZAKE; VARÉA; PRUDENCIO, 2014, KAMIZAKE; SILVA; PRUDENCIO, 2016, 2017; CASTILHO, 2016).

De acordo com Kong e Chang (2013) durante o armazenamento da soja há agregação das moléculas de proteínas por meio do aumento das interações hidrofóbicas e pontes dissulfeto, e assim dificulta a sua solubilização. Bom (2013) em estudo de envelhecimento de soja em condições naturais (sem controle de UR e temperatura, por 18 meses) e aceleradas (84 % UR e 30 °C, por 9 meses) observou que o armazenamento dos grãos de soja resultou no aumento de acidez nos grãos e na diminuição da solubilidade proteica (mais acentuada no envelhecimento acelerado). Observou também aumento nas interações não covalentes nas proteínas (ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas), redução da hidrofobicidade de superfície das proteínas e no teor de grupos sulfidrilas livres totais, além de aumento no conteúdo de pontes dissulfeto no envelhecimento acelerado. Segundo a autora, a redução na solubilidade das proteínas após o armazenamento ocorreu em razão do aumento na acidez dos grãos, que contribuiu para o dobramento das moléculas de proteína, ou em uma maior interação das subunidades das proteínas da soja glicínica e β -conglícinina.

Kamizake, Varéa e Prudencio (2014) encontraram alterações na composição química dos grãos de soja armazenados em condições ambientais por 18 meses (sem controle de UR e temperatura) e em condição acelerada por 9 meses (30 °C, 84 % UR). Notaram aumento no teor de umidade dos grãos, de 8,95 no tempo zero, para 9,51 % na condição acelerada e 9,36 % na condição natural. Constataram também redução do teor de lipídeos, e aumento do conteúdo de proteínas e carboidratos, principalmente na condição acelerada. Observaram redução do pH dos grãos e do conteúdo de fitato, além de aumento

da acidez titulável, redução da solubilidade proteica em água e da capacidade de absorção e retenção de água das proteínas. Ainda, constataram também aumento no teor de compostos fenólicos totais dos grãos. Notaram que as alterações ocorreram de forma mais pronunciada nos grãos submetidos à condição acelerada.

O escurecimento dos grãos também é muito estudado em envelhecimento da soja, e é um dos parâmetros empregados para indicar a ocorrência de envelhecimento nos grãos. Além do escurecimento, há relatos de alterações nos carboidratos da soja com o armazenamento em diversas condições, sendo que alguns autores relacionaram as alterações nos carboidratos com reações de escurecimento. Por exemplo, após armazenarem soja em condições ambientais por até nove anos, Narayan, Chauhan e Verma (1988) observaram o escurecimento dos grãos, que foi explicado pelas reações de escurecimento enzimáticas e não enzimáticas (como a reação de Maillard). Ainda notaram, como resultado do envelhecimento o aumento no teor de ácidos graxos livres (originadas de reações de hidrólise de ácidos graxos) e redução dos açúcares livres. Outras alterações observadas nos grãos foram a diminuição na solubilidade proteica e formação de peróxidos.

A redução no conteúdo de açúcares livres, juntamente com o escurecimento da soja foi observada por Hou e Chang (2004b) após nove meses de armazenamento dos grãos em condição adversa (30 °C e 84 % UR). Segundo os autores, os açúcares podem ter sido utilizados como fonte de energia em uma tentativa de superar a condição adversa de armazenamento, e adicionalmente podem ter participado de reações de escurecimento, como a reação de Maillard, contribuindo com o escurecimento dos grãos.

O armazenamento da soja em condições acelerada (30 °C e 84 % UR, 9 meses) e natural (18 meses) por Kamizake, Yamashita e Prudencio (2014) resultou em alterações nos parâmetros de cor em grãos de duas cultivares brasileiras. Os grãos escureceram, e a condição acelerada resultou ainda em um aumento na taxa de absorção de água pelos grãos durante a maceração e provocou aumento na dureza de grãos cozidos. De acordo com os autores, estas mudanças nos grãos são consequência de diversas reações bioquímicas que ocorrem nos grãos durante o armazenamento causando o envelhecimento. Os produtos (extrato aquoso e tofu) derivados de soja envelhecida também

apresentam cor e composição química alterados quando comparados ao controle, conforme demonstrado por Kamizake, Silva e Prudencio (2016). Os autores ainda mostraram que o envelhecimento dos grãos resulta em redução no rendimento, escurecimento e alterações na textura dos tofus. Ainda, alterações em diversas características sensoriais destes tofus foram estudadas por Kamizake, Silva e Prudencio (2018), que notaram que as alterações causadas nos grãos pelo armazenamento a 30 °C, 84 % UR, até 6 meses, e sem controle de temperatura e UR, até 18 meses, têm efeito negativo na aparência, aroma, sabor e textura dos tofus tornando-os assim, produtos menos aceitáveis para os consumidores.

Reações de escurecimento não enzimático, como as reações de Amadori e Maillard podem ter alguma participação no processo de envelhecimento dos grãos. Essas reações causam alterações nas proteínas, e assim reduzem a capacidade do grão em limitar os danos causados pelos radicais livres (MURTHY; SUN, 2000). Sun e Leopold (1995) encontraram evidências de que a reação de Maillard pode estar associada com o declínio do vigor e da germinação das sementes de soja. Neste estudo, foi observado o aumento nos produtos da reação da Maillard com o tempo de armazenamento (36 °C, 75 % UR, por 5 meses), assim como a hidrólise de oligossacarídeos. Porém, não houve aumento no teor de açúcares redutores, uma vez que os mesmos podem ter sido consumidos na reação de Maillard. Wettlaufer e Leopold (1991) provocaram o envelhecimento acelerado de soja por um mês em duas condições de temperatura e umidade; nas amostras armazenadas a 75 % UR e 30 °C observaram aumento no conteúdo de produtos da reação de Amadori (produtos intermediários da reação de Maillard), enquanto que naquelas armazenadas a 100 % UR e 40 °C notaram aumento de produtos finais da reação de Maillard, como o hidroximetilfurfural (HMF). Sendo assim, o escurecimento dos grãos devido ao envelhecimento pode estar relacionado a alterações em outros componentes dos grãos, como proteínas e carboidratos.

Podem ocorrer também reações de escurecimento enzimático. Em vegetais, a polifenoloxidase está envolvida com o processo de escurecimento. A enzima oxida os compostos fenólicos presentes nas células, formando compostos chamados de quinonas. Estes compostos se condensam e formam pigmentos insolúveis de cor escura, denominadas melaninas. As quinonas podem também reagir não enzimaticamente com proteínas, outros compostos fenólicos e

aminoácidos e também formar as melaninas. Os compostos fenólicos mais comuns envolvidos nesta reação são o ácido clorogênico e a tirosina. A reação de escurecimento enzimático ocorre nos tecidos quando há rompimento das células (ARAÚJO, 2004). Sendo assim, a enzima polifenoloxidase e estes compostos formados também podem ter alguma contribuição no processo de escurecimento dos grãos durante armazenamento (MARLES; VANDENBERG; BETT, 2008).

As isoflavonas é uma outra classe de componentes que ainda está pouco estudada durante o processo de envelhecimento da soja é a das isoflavonas. Hou e Chang (2002) avaliaram o efeito de diferentes condições de armazenamento da soja sobre o perfil de isoflavonas. Na condição adversa (30 °C, 84 % UR por 9 meses) notaram mudanças drásticas no perfil de isoflavonas. Enquanto que no tempo zero ou na soja não envelhecida, as formas β -glicosídicas e malonilglicosídicas perfaziam 99 % das isoflavonas da soja, após 9 meses de armazenamento estas formas decresceram para 3 %. Já as formas agliconas aumentaram de 1 % no tempo zero para 97 % aos 9 meses de armazenamento. As formas acetilglicosídicas foram encontradas em quantidades-traço em todas as condições estudadas. Nas condições moderada (20 °C, 57 % UR por 18 meses) e natural (sem controle de temperatura e UR por 18 meses) as mudanças no perfil de isoflavonas não foram tão pronunciadas. As formas β -glicosídicas aumentaram de 12 % para 31 % aos 18 meses de armazenamento, enquanto as formas malonilglicosídicas tiveram um decréscimo de 87 % no tempo zero para 66 % aos 18 meses. As demais formas de isoflavonas mantiveram-se inalteradas. Na condição de baixa temperatura (4 °C, sem controle de UR, 18 meses) não houve mudanças no perfil das isoflavonas.

Foi notada por Lee et al. (2003a) uma pequena redução no conteúdo total de isoflavonas em soja armazenada por três anos sem controle de temperatura e UR. Houve também redução no teor de malonilglicosídeos e aumento no teor de agliconas e glicosídeos, provavelmente porque os grãos foram submetidos a altas temperaturas durante o verão, e além das reações de oxidação ocorridas nos grãos durante o armazenamento.

Já Kim et al. (2005a) estudaram o efeito da temperatura (25 °C e -30 °C) e tempo de armazenamento (até três anos, sem controle de umidade) sobre o perfil de isoflavonas de oito cultivares de soja. No armazenamento a 25 °C por três anos observaram decréscimo das isoflavonas agliconas, glicosídicas

e malonilglicosídicas. Não notaram diferença entre o armazenamento a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, sendo que somente para o grupo dos malonilglicosídeos houve uma menor redução durante o armazenamento a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ do que no armazenamento a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Em outro estudo, Kim et al. (2005b) encontraram modificações no perfil de isoflavonas de soja colhida em três diferentes anos e armazenada pelo período de três anos (sem controle de temperatura e UR). Observaram perda de isoflavonas no primeiro ano de armazenamento, ou seja, redução na concentração total de isoflavonas, além de redução acentuada das formas malonilglicosídicas após um, dois e três anos de armazenamento. Aos dois e três anos de armazenamento, notaram aumento na concentração das formas glicosídicas e agliconas.

Ao avaliar os teores de isoflavonas em sementes de 21 cultivares de soja submetidas ao envelhecimento acelerado ($41\text{ }^{\circ}\text{C}$, 100 % UR, até 48 h), Ávila et al. (2011) notaram redução nos teores de isoflavonas totais com o envelhecimento, e um declínio nos teores de agliconas, com aumento concomitante nas formas glicosídicas e malonilglicosídicas. Os autores concluíram que quanto menor o conteúdo de isoflavonas nos grãos, menor o potencial fisiológico (ou vigor) das sementes após envelhecimento.

Há poucos estudos sobre as alterações na atividade antioxidante de sementes de soja com o envelhecimento. Ávila et al. (2012) avaliaram o efeito do envelhecimento acelerado ($41\text{ }^{\circ}\text{C}$, 100 % UR, até 48 h) em três cultivares de soja, sobre os teores de isoflavonas, flavonóides totais, fenólicos totais e na atividade antioxidante determinada pelo método ABTS. Os autores verificaram um aumento nos teores de fenólicos totais e flavonóides totais até aproximadamente 40 horas de armazenamento e depois uma redução. Já com relação aos teores de isoflavonas totais, não houve alteração no período estudado. Porém, foi observado aumento na atividade antioxidante, que poderia ser consequência do aumento na geração de radicais livres durante o envelhecimento, assim causaria aumento no conteúdo de compostos com atividade antioxidante como uma forma de proteção aos tecidos do grão. Já Lee e Cho (2012) armazenaram soja preta por dois anos sem controle de temperatura e umidade relativa e observaram redução, com o tempo de armazenamento, do conteúdo de isoflavonas, de proteínas, antocianinas e também na atividade antioxidante avaliada pelos métodos de DPPH e ABTS.

Segundo os autores, a redução na atividade antioxidante pode estar relacionada à degradação das isoflavonas e antocianinas da soja.

As lipoxigenases da soja também têm sido caracterizadas e estudadas. Furuta et al. (1996) estudaram extratos preparados pela centrifugação de grãos de soja, de cinco cultivares não envelhecidas, embebidos em água por 12 horas a 4 °C. As cultivares foram: uma contendo as três lipoxigenases (L-1, L-2 e L-3), uma com ausência de L-1, outra com ausência de L-2, outra com ausência de L-3 e uma cultivar com ausência das três isoenzimas. Os pesquisadores adicionaram ácido linoléico aos extratos e analisaram o teor de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA) (peroxidação lipídica) e hexanal. Nos extratos provenientes das cultivares com a presença de pelo menos uma das três lipoxigenases, houve aumento das substâncias reativas ao TBA em 10 minutos de reação. Porém, para a cultivar sem lipoxigenases, este aumento não foi observado. Quanto ao hexanal, houve maior produção na cultivar contendo somente a L-2. Nas demais cultivares contendo a enzima também ocorreu aumento do teor de hexanal, enquanto para a cultivar sem lipoxigenases a produção deste composto foi muito menor (embora tenha havido produção do composto). A maior produção de hexanal na cultivar contendo somente L-2 pode indicar que esta isoenzima é a responsável pela produção deste composto. Esta afirmação está em acordo com os resultados obtidos por Matoba et al. (1985) que também encontraram maior formação de hexanal nas cultivares contendo a isoforma L-2, enquanto a produção do composto foi menor em cultivares com ausência de L-2.

Pouco se conhece sobre a função ou papel das enzimas lipoxigenases durante o envelhecimento da soja. Lambrecht et al. (1996) concluíram que após envelhecimento acelerado em duas condições (25 °C, 50 % UR e 50 °C, 70 % UR, por 3 meses) a cultivar com ausência de lipoxigenases L2 e L3 foi mais tolerante aos efeitos do envelhecimento, e produziu tofus com características mais desejáveis do que a cultivar contendo as duas isoenzimas.

Castilho (2016) realizou um experimento de envelhecimento em condição acelerada (30 °C, 76 % UR, por até 8 meses) em duas cultivares de soja, uma convencional (BRS 284) e outra isenta de lipoxigenases L1, L2 e L3 (BRS 257). A autora não observou aumento nos teores de malonaldeído nas duas cultivares, porém, os teores deste composto foram maiores para a cultivar convencional. Observou também aumento no índice de acidez no óleo extraído.

A autora notou que, na cultivar BRS 284 houve aumento do índice de peróxido do óleo, enquanto que na BRS 257 não houve alteração. Além disso, foi analisada a presença de radicais livres no óleo, e constatou-se que a cultivar BRS 257 (sem as lipoxigenases) era mais estável ao envelhecimento, uma vez que os radicais livres demoraram mais para serem formados nesta cultivar.

Entretanto, diversos estudos têm colocado em dúvida o papel das lipoxigenases no processo de deterioração ou envelhecimento de soja. Oliveira et al. (2006) não encontraram relação entre a atividade das lipoxigenases e a perda de vigor e capacidade de germinação das sementes de soja. Neste estudo, a perda de vigor foi relacionada ao maior teor de ácido linoleico, associado com a ocorrência de autoxidação lipídica. King et al. (1998) não obtiveram maior estabilidade no óleo extraído de soja sem lipoxigenases comparado ao óleo extraído de grãos convencionais, com lipoxigenases. Enquanto que Wang et al. (1990), em armazenamento de cultivar convencional e de cultivares sem as lipoxigenases L-1 e L-3 e sem L-2 e L-3, durante duas semanas (40 °C e aproximadamente 100 % UR), notaram declínio tanto na taxa de germinação, como também na atividade das enzimas lipoxigenases ao final do tempo de armazenamento. Segundo os autores, a ausência de alguma das lipoxigenases não aumenta a resistência dos grãos à deterioração, o que pode significar que a lipoxigenase tem pouca ação no processo de envelhecimento da soja.

Sung et al. (1995) corroboraram com a inferência de Wang et al. (1990), pois os autores notaram redução na atividade das lipoxigenases durante o envelhecimento natural, e concluíram que é pouco provável que estas enzimas tenham um papel majoritário no processo do envelhecimento. Outros autores também observaram redução na atividade das lipoxigenases durante o envelhecimento natural (NARAYAN et al., 1988; ACHOURI; BOYE; ZAMANI, 2008).

Diante do exposto, o estudo das alterações nos lipídeos, carboidratos e compostos fenólicos da soja em diferentes condições e tempos de armazenamento é importante a fim de melhor compreender o processo de envelhecimento.

4 REFERÊNCIAS

- ABERNATHY, L. M.; FOUNTAIN, M. D.; JOINER, M. C.; HILLMAN, G. G. Innate immune pathways associated with lung radioprotection by soy isoflavones. **Frontiers in Oncology**. V. 7, p. 1 – 10, 2017.
- ACHOURI, A.; BOYE, J. I.; ZAMANI, Y. Soybean variety and storage effects on soymilk flavour and quality. **International Journal of Food Science and Technology**. v. 43, p. 82 – 90, 2008.
- ALENCAR, E.R.; FARONI, L.R.D.; PETERNELLI, L.A.; SILVA, M.T.C.; COSTA, A.R. Influence of soybean storage conditions on crude oil quality. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v. 14, n. 3, p. 303 – 308, 2010.
- ALU'DATT, M.H.; RABABAH, T.; EREIFEJ, K.; ALLI, I. Distribution, antioxidant and characterization of phenolic compounds in soybeans, flaxseed and olives. **Food Chemistry**. v. 139, p. 93 – 99, 2013.
- ANTHONY, M.S.; CLARKSON, T.B.; HUGHES, C.L.; MORGAN, T.M.; BURKE, G.L. Soybean isoflavones improve cardiovascular risk factors without affecting the reproductive system of peripubertal Rhesus monkeys. **Journal of Nutrition**. v. 126, p. 43 – 50, 1996.
- AOAC. **Official Methods of Analysis**. 16th ed. Washington, D.C.: Association of Official Analytical Chemists International, 1995.
- ARAÚJO, J. M. A. Oxidação de lipídios em alimentos. In: _____. **Química de Alimentos teoria e prática**. 3. ed. Rev. Viçosa: UFV, 2004. Cap. 1, p. 1 – 67.
- ARORA, A.; NAIR, M. G.; STRASBURG, G. M. Antioxidant activities of isoflavones and their biological metabolites in a liposomal system. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 356, p. 133 – 141, 1998.
- ÁVILA, M. R.; BRACCINI, A. L.; ALBRECHT, L. P.; SCAPIM, C. A.; MANDARINO, J. M. G.; BAZO, G. L.; CABRAL, Y. C. F. Effect of storage period on isoflavone content and physiological quality of conventional and transgenic soybean seeds. **Revista Brasileira de Sementes**. v 33, p. 149 – 161, 2011.
- ÁVILA, M. R.; BRACCINI, A. L.; SOUZA, C. G. M.; MANDARINO, J. M. G.; BAZO, G. L.; CABRAL, Y. C. F. Physiological quality, content and activity of antioxidants in soybean seeds artificially aged. **Revista Brasileira de Sementes**. v 34, p. 397 – 407, 2012.
- AXELROD, B.; CHEESBROUGHT, T.M.; LAAKSO, S. Lipoxygenase from soybean. **Methods Enzymologics**. v. 71, p. 441 – 451, 1981.
- BAILLY, C.; BENAMAR, A.; CORBINEAU, F.; CÔME, D. Changes in malondialdehyde content and in superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase activities in sunflower seeds as related to deterioration during accelerated aging. **Physiologia Plantarum**. v. 97, p. 104 – 110, 1996.

- BAKUNINA, I. Y.; BALABANOVA, L. A.; PENNACCHIO, A.; TRINCONE, A. Hooked on a-D-galactosidases: from biomedicine to enzymatic synthesis. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 36, p. 233 – 245, 2016.
- BARBOSA, A.C.L.; HASSIMOTTO, N.M.A.; LAJOLO, F.M.; GENOVESE, M.I. Teores de isoflavonas e capacidade antioxidante da soja e produtos derivados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 26, p. 921 – 926, 2006.
- BAÚ, T.R.; IDA, E. I. Soymilk processing with higher isoflavone aglycone content. **Food Chemistry**. v. 183, p. 161–168, 2015.
- BAÚ, T.R.; GARCIA, S.; IDA, E. I. Changes in soymilk during fermentation with kefir culture: oligosaccharides hydrolysis and isoflavone aglycone production. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**. v. 66, p. 845 – 850, 2015.
- BeMILER, J.N.; HUBER, K.C. Carboidratos. In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O.R. Ed.; tradução de Adriano Brandelli. **Química de alimentos de Fennema**. 4 Ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. Cap. 3, p. 75 – 130.
- BENASSI, V. T.; PRUDENCIO, S. H. Impactos do processamento de soja na retenção de minerais, isoflavonas e proteínas em tofus. **Brazilian Journal of Food Nutrition**. v. 24, p. 51 – 59, 2013.
- BENZIE, I.F.F.; STRAIN, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “Antioxidant Power”: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**. v. 339, p. 70 – 76, 1996.
- BOM, N. C. V. **Envelhecimento da soja: Efeitos nas propriedades químicas e funcionais das proteínas**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.
- BORDINGNON, J. R.; MANDARINO, J. M. G. **Soja: Composição química, valor nutricional e sabor**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 1994.
- BRACCINI, A. L.; REIS, M. S.; MOREIRA, M. A.; SEDIYAMA, C. S.; SCAPIM, C. A. Biochemical changes associated to soybean seeds osmoconditioning during storage. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 35, p. 433 – 447, 2000.
- BRASIL. Resolução nº 19, 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.
- CARRÃO-PANIZZI, M. C.; MANDARINO, J. M. G. **SOJA: Potencial de Uso na Dieta Brasileira**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 1998. 16p.
- CASTILHO, S. P. G. **Implicações do envelhecimento de cultivar de soja convencional ou livre de lipoxigenases nas propriedades físicas e químicas da fração lipídica dos grãos**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

CHEN, C.W.; HO, C.T. Antioxidant properties of polyphenols extracted from green and black teas. **Journal of Food Lipids**. v. 2, p. 35 – 46, 1995.

CHEN, K.-I.; ERH, M.-H.; SU, N.-W.; LIU, W.-H.; CHOU, C.-C.; CHENG, K.-C. Soyfoods and soybean products: from traditional use to modern applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 96, p. 9 – 22, 2012.

CHUNG, H.; HOGAN, S.; ZHANG, L.; RAINEY, K.; ZHOU, K. Characterization and comparison of antioxidant properties and bioactive components of Virginia soybeans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 56, p. 11515 – 11519, 2008.

CHUNG, I.M.; SEO, S.H.; AHN, J.K.; KIM, S.H. Effect of processing, fermentation, and aging treatment to content and profile of phenolic compounds in soybean seed, soy curd and soy paste. **Food Chemistry**. v. 127, p. 960 – 967, 2011.

CHUNG, I.M.; SEO, S.Y.; PARK, I.; AHN, J.K.; KIM, E.H.; KIM, M.Y.; KIM, S.H. Changes in isoflavone composition of soya seeds, soya curd and soya paste at different processing conditions. **Journal of Food and Nutrition Research**. v. 51, p. 40 – 51, 2012.

COMPANHIA NACIONAL DO ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. v. 4, safra 2016/17, n. 9, jun 2017. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_06_08_09_02_48_boletim_graos_junho_2017.pdf>. Acesso em: 21. Jun. 2017.

DEVI, M.,K.,A.; GONDI, M.; SAKTHIVELU, P.; GIRIDHAR, T.; RAJASEKARAN, T.; RAVISHANKAR, G.A. Functional attributes of soybean seeds and products, with reference to isoflavone content and antioxidant activity. **Food Chemistry**. v. 114, p. 771 – 776, 2009.

ELDRIDGE, A.C.; KWOLEK, W.F. Soybean isoflavones: Effect of environment and variety on composition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 31, p. 394 – 396, 1983.

EMBRAPA. **História da Soja**. 2017. Disponível em: <https://www.embrapa.br/web/portal/soja/cultivos/soja1/historia>. Acesso em: 22 Jun. 2017.

EMBRAPA SOJA. **Cultivares de Soja**: macrorregiões 1, 2 e 3, centro sul do Brasil. Londrina: Embrapa Soja, 2013.

ESEN, A. β -Glucosidase. In: WHITAKER, J. R.; VORAGEN, A. G. J.; WONG, D. W. S. (Ed). **Handbook of Food Enzymology**. New York: Marcel Dekker, Inc., 2003. Cap. 63, p. 774 – 787.

FDA. **Food Labeling**. 1999. Disponível em: <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcr/CFRSearch.cfm?fr=101.82>>. Acesso em: 30 Jul. 2014.

FURUTA, S.; NISHIBA, Y.; HAJIKA, M.; IGITA, K.; SUDA, I. DETBA value and hexanal production with the combination of unsaturated fatty acids and extracts prepared from soybean seeds lacking two to three lipoxigenase isozymes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 44, p. 236 – 239, 1996.

GIANNOCCARO, E.; WANG, Y-J.; CHEN, P. Comparison of two HPLC systems and an enzymatic method for quantification of soybean sugars. **Food Chemistry**. v. 106, p. 324 – 330, 2008.

GIBSON, L.; BENSON, G. **Origin, History, and Uses of Soybean (*Glycine max*)**. Iowa State University. 2005. Disponível em: <http://agron-www.agron.iastate.edu/Courses/agron212/Readings/Soy_history.htm>. Acesso em: 05 Jun. 2014.

GIURIZATTO, M.I.K.; FERRARESE-FILHO, O.; FERRARESE, M.L.L.; ROBAINA, A.D.; GONÇALVES, M.C.; CARDOSO, C.A.L. α -Tocoferol levels in natural and artificial aging of soybean seeds. **Acta Scientiarum. Agronomy**. v. 34, p. 339 – 343, 2012.

GÓES, S. P.; RIBEIRO, M. L. L. α -galactosidase: aspectos gerais e sua aplicação em produtos a base de soja. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 23, p. 111 – 119, 2002.

GORDON, M.H. The development of oxidative rancidity in foods. In: POKORNY, J.; YANISHLIEVA, N. GORDON, M.H. (Ed.). **Antioxidants in Food: Practical applications**. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2001. Cap. 2, p. 7 – 20.

GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G.; FELIX, C. R. Characterization of α -galactosidases from germinating soybean seed and their use for hydrolysis of oligosaccharides. **Phytochemistry**, v. 58, p. 67 – 73, 2001.

HALL, C. Sources of natural antioxidants: oilseeds, nuts, cereals, legumes, animal products and microbial sources. In: POKORNY, J.; YANISHLIEVA, N. GORDON, M.H. (Ed.). **Antioxidants in Food: Practical applications**. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2001. Cap. 9, p. 159 – 198.

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

HEATH, R.L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 124, p. 189 – 198, 1968.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**. v. 13, p. 572 – 584, 2002.

HODGES, D.M.; DeLONG, J.M.; FORNEY, C.F.; PRANGE, R.K. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. **Planta**. v. 207, p. 604 – 611, 1999.

HOU, H.J.; CHANG, S.K.C. Yield and quality of soft Tofu as affected by soybean physical damage and storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 46, p. 4798 – 4805, 1998.

HOU, H.J.; CHANG, S.K.C. Interconversions of isoflavones in soybeans as affected by storage. **Journal of Food Science**. v. 67, n. 6, p. 2083 – 2089, 2002.

HOU, H.J.; CHANG, S.K.C. Yield and textural properties of Tofu as affected by the changes of phytate content during soybean storage. **Journal of Food Science**. v. 68, n. 4, p. 1185 – 1191, 2003.

HOU, H.J.; CHANG, S.K.C. Structural characteristics of purified Glycinin from soybeans stored under various conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 52, p. 3792 – 3800, 2004a.

HOU, H.J.; CHANG, S.K.C. Storage conditions affect soybean color, chemical composition and tofu qualities. **Journal of Food Processing and Preservation**. v. 28, p. 473 – 488, 2004b.

HOU, H.J.; CHANG, S.K.C. Structural characteristics of purified β -Conglycinin from soybeans stored under various conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 52, p. 7931 – 7937, 2004c.

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

KAMIZAKE, N.K.K.; YAMASHITA, F.; PRUDENCIO, S.H. Physical alterations of soybean during accelerated and natural aging. **Food Research International**. v. 55, p. 55 – 61, 2014.

KAMIZAKE, N.K.K.; VARÉA, G.S.; PRUDENCIO, S.H. Physicochemical properties of aged soybean components. **Journal of Food, Agriculture and Environment**. V. 12, p. 263 – 268, 2014.

KAMIZAKE, N.K.K.; SILVA, L. C. P.; PRUDENCIO, S. H. Effect of soybean aging on the quality of soymilk, firmness of tofu and optimum coagulant concentration. **Food Chemistry**. v. 190, p. 90 – 96, 2016.

KAMIZAKE, N.K.K.; SILVA, L. C. P.; PRUDENCIO, S. H. Impact of soybean aging conditions on tofu sensory characteristics and acceptance. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 98, p. 1132 – 1139, 2018.

KARR-LILIENTHAL, L. K.; KADZERE, C. T.; GRIESHOP, C.M.; FAHEY JR., G. C. Chemical and nutritional properties of soybean carbohydrates as related to nonruminants: a review. **Livestock Production Science**, v. 97, p. 1 – 12, 2005.

KATO, M.; SHIMIZU, S. Chlorophyll metabolism in higher plants. VII. Chlorophyll degradation in senescing tobacco leaves; phenolic-dependent peroxidative degradation. **Canadian Journal of Botanic**. v. 65, p. 729 – 735, 1986.

KIBINZA, S.; BAZIN, J.; BAILLY, C.; FARRANT, J.M.; CORBINEAU, F.; EL-MAAROUF-BOUTEAU, H. Catalase is a key enzyme in seed recovery from ageing during priming. **Plant Science**. v. 181, p. 309 – 315, 2011.

KIM, J.J.; KIM, S.H.; HAHN, S.J.; CHUNG, I.M. Changing soybean isoflavone composition and concentrations under two different storage conditions over three years. **Food Research International**. v. 38, p. 435 – 444, 2005a.

KIM, S.H.; JUNG, W.S.; AHN, J.K.; CHUNG, I.M. Analysis of isoflavone concentration and composition in soybean [*Glycine max* (L.)] seeds between the cropping year and storage for 3 years. **European Food Research Technology**. v. 220, p. 207 – 214, 2005b.

KIM, E.H.; RO, H.M.; KIM, S.L.; KIM, H.S.; CHUNG, I.M. Analysis of isoflavone, phenolic, soyasapogenol, and tocopherol compounds in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] germplasms of different seed weights and origins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 60, p. 6045 – 6055, 2012a.

KIM, E.H.; KIM, S.L.; KIM, H.S.; CHUNG, I.M. Comparison of isoflavones and anthocyanins in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] seeds of different planting dates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 60, p. 10196 – 10202, 2012b.

KING, J.M.; SVENDSEN, L.K.; FEHR, W.R.; NARVEL, J.R.; WHITE, P.J. Oxidative and flavor stability of oil from lipoxygenase-free soybeans. **Journal of American Oil Chemists Society**. v. 75, p. 1121 – 1126, 1998.

KINSELLA, J. E. Functional properties of soy proteins. **Journal of American Oil Chemists Society**. v. 56, p. 242 – 258, 1979.

KONG, F.; CHANG, S.K.C.; LIU, Z.; WILSON, L.A. Changes of soybean quality during storage as related to soymilk and tofu making. **Journal of Food Science**. v. 73, n. 3, p. 134 – 144, 2008.

KONG, F.; CHANG, S.K.C. Changes in protein characteristics during soybean storage under adverse conditions as related to tofu making. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 61, p. 387 – 393, 2013.

KUMAR, V.; RANI, A.; DIXIT, A.K.; BHATNAGAR, D.; CHAUHAN, G.S. relative changes in Tocopherols, isoflavones, total phenolic content, and antioxidative activity in soybean seeds at different reproductive stages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 57, p. 2705 – 2710, 2009.

KUNTZ, S.; WENZEL, U.; DANIEL, H. Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. **European Journal of Nutrition**. v. 38, p. 133 – 142, 1999.

LAMBRECHT, H. S.; NIELSEN, S. S. ; LISKA, B. J.; NIELSEN, N. C. Effect of soybean storage on tofu and soymilk production. **Journal of Food Quality**. v. 19, p. 189 – 202, 1996.

LeBLANC, J. G.; SILVESTRONI, A.; CONNES, C.; JUILLARD, V.; De GIORI, G. S.; PIARD, J-C.; SESMA, F. Reduction of non-digestible oligosaccharides in soymilk: application of engineered lactic acid bacteria that produces α -galactosidase. **Genetics and Molecular Research**. v. 3, p. 432 – 440, 2004. Disponível em: http://www.funpecrp.com.br/gmr/year2004/vol3-3/gmr0099_full_text.htm. Acesso em: 26/10/2017.

LEE, S.J.; AHN, J.K.; KIM, S.H.; KIM, J.T.; HAN, S.J.; JUNG, M.Y.; CHUNG, I.M. Variation in isoflavone of soybean cultivars with location and storage duration. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 51, p. 3382 – 3389, 2003a.

LEE, S.J.; YAN, W.; AHN, J.K.; CHUNG, I.M. Effects of year, site, genotype and their interactions on various soybean isoflavones. **Field Crops Research**. v. 81, p. 181 – 192, 2003b.

LEE, J.H.; CHO, K.M. Changes in compositional components of black soybeans maintained at room temperature for different storage periods. **Food Chemistry**. v. 131, p. 161 – 169, 2012.

LIMA, F. S.; IDA, E. I. Optimisation of soybean hydrothermal treatment for the conversion of b-glucoside isoflavones to aglycones. **LWT - Food Science and Technology**. v. 56, p. 232 – 239, 2014.

LIU, K. Agronomic characteristics, production and marketing. In: _____. **Soybeans: Chemistry, technology and utilization**. New York: Chapman and Hall, 1997a. Cap. 1, p. 1 – 22.

LIU, K. Chemistry and nutritional value of soybean components. In: _____. **Soybeans: Chemistry, technology and utilization**. New York: Chapman and Hall, 1997b. Cap. 2, p. 25 – 113.

LIU, K. Biological and compositional changes during Soybean maturation, storage, and germination. In: _____. **Soybeans: Chemistry, technology and utilization**. New York: Chapman and Hall, 1997c. cap. 3, p. 114 – 136.

LIU, J.; CHANG, S.K.C.; WIESENBORN, D. Antioxidant properties of soybean isoflavone extract and tofu in vitro and in vivo. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 53, p. 2333 – 2340, 2005.

LIU, C.; WANG, H.; CIU, Z.; HE, X.; WANG, X.; ZENG, X.; MA, H. Optimization of extraction and isolation for 11S and 7S globulins of soybean seed storage protein. **Food Chemistry**. v. 102, p. 1310 – 1316, 2007.

MAKELA, S.I.; PYLKKANEN, L.H.; SANTTI, R.S.S.; ADLERCREUTZ, H. Dietary soybean may be antiestrogenic in male mice. **Journal of Nutrition**. v. 125, p. 437 – 445, 1995.

MALENCIC, D.; MAKSIMOVIC, Z.; POPOVIC, M.; MILADINOVIC, J. Polyphenol contents and antioxidant activity of soybean seed extracts. **Bioresource Technology**. v. 99, p. 6688 – 6691, 2008.

MARCOS-FILHO, J. Teste de envelhecimento acelerado. In: KRZYZANOWSKY, F.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA-NETO, J.B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999, cap. 3, p. 1-24.

MARLES, M.A.S.; VANDENBERG, A.; BETT, K.E. Polyphenol oxidase activity and differential accumulation of polyphenolics in seed coats of pinto bean (*Phaseolus vulgaris* L.) characterize postharvest color changes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 56, p. 7049 – 7056, 2008.

- MASUDA, R.; KANEKO, K.; YAMASHITA, I. Sugar and cyclitol determination in vegetables by HPLC using post column fluorescent derivatization. **Journal of Food Science**. v. 61, p. 1186 – 1190, 1996.
- MATOBA, T.; HIDAHA, H.; NARITA, H.; KITAMURA, K.; KAIZUMA, N.; KITO, M. Lipoxygenase-2 is responsible for generation of n-Hexanal in soybean homogenate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 33, p. 852 – 855, 1985.
- MATSUURA, M.; OBATA, A. β -Glucosidases from Soybeans Hydrolyze Daidzin and Genistin. **Journal of Food Science**. v. 58, p. 144 – 147, 1993.
- McCLEMENS, J.; DECKER, E.A. Lipídeos.In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O.R. Ed.; tradução de Adriano Brandelli. **Química de alimentos de Fennema**. 4 Ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. Cap. 4, p. 132 – 176.
- MUJOO, R.; TRINH, D.T.; NG, P.K.W. Characterization of storage proteins in different soybean varieties and their relationship to tofu yield and texture. **Food Chemistry**. v. 82, p. 265 – 273, 2003.
- MURTHY, U.M.N.; LIANG, Y.; KUMAR, P. P.; SUN, W.Q. Non-enzymatic protein modification by the Maillard reaction reduces the activities of scavenging enzymes in *Vigna radiata*. **Physiologia Plantarum**. v. 115, p. 213 – 220, 2002.
- MURTHY, U.M.N.; SUN, W.Q. Protein modification by Amadori-Maillard reactions during seed storage: roles of sugar hydrolysis and lipid peroxidation. **Journal of Experimental Botany**. v. 51, p. 1221 – 1228, 2000.
- NAKANO, Y. ASSADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxides in Spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology**. v. 22, p. 867 – 888, 1981.
- NARAYAN, R.; CHAUHAN, G.S.; VERMA, N.S. Changes in the quality of Soybean during storage. Part 1 - Effect of storage on some physico-chemical properties of Soybean. **Food Chemistry**. v. 27, p. 13 – 23, 1988.
- NIAMNUY, C, NACHAISIN, M., LAOHAVANICH, J. & DEVAHASTIN, S. Evaluation of bioactive compounds and bioactivities of soybean dried by different methods and conditions. **Food Chemistry**. v. 129, p. 899 – 906, 2011. .
- OLIVEIRA, D.A.; PIOVESAN, N.D.; JOSÉ, I.C.; DE BARROS, E.G.; DIAS, D.C. F.S.; MOREIRA, M.A. Lipoxygenases e teor de ácido linolênico relacionados à qualidade de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**. v. 28, p. 30 – 25, 2006.
- PARK, Y. K.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; MASCARENHAS, H. A. A.; SCAMPARINI, A. R. P. Conversão de malonil- β -glicosil isoflavonas em isoflavonas glicosiladas presentes em alguns cultivares de soja brasileira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 22, p. 130 – 135, 2002.
- PINTO, M.S.; LAJOLO, F.M.; GENOVESE, M.I. Effect of storage temperature and water activity on the content and profile of isoflavones, antioxidant activity, and *in vitro* protein digestibility of soy protein isolates and defatted soy flours. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 53, p. 6340 – 6346, 2005.

PÍPOLO, A. E.; HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J. C.; BALBINOT JÚNIOR, A. A.; DEBIASI, H.; MANDARINO, J. M. G. **Teores de óleo e proteína em soja: fatores envolvidos e qualidade para a indústria.** Comunicado Técnico n. 86, Embrapa: Londrina, 2015.

PRIGGE, S. T.; BOYINGTON, J. C.; GAFFNEY, B. J.; ANZEL, M. Lipoxygenases: Structure and function. In: PIAZZA, G. (Ed). **Lipoxygenase and lipoxygenase pathway enzymes.** Champaign Illinois: AOCS Press, 1996. cap 1.

RAO, P.U.; DEOSTHALE, Y.G. Polyphenoloxidase activity in germinated legume seeds. **Journal of Food Science.** v. 52, p. 1549 – 1551, 1987.

RIBLETT, A.L.; HERALD, T.J.; SCHMIDT, K.A.; TILLEY, K.A. Characterization of β -conglitin and glycinin soy protein fractions from four selected soybean genotypes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** v. 49, p. 4983 – 4989, 2001.

RIOS, A.O.; ABREU, C.M.P.; CORRÊA, A.D. Efeitos da época de colheita e do tempo de armazenamento no escurecimento do tegumento do feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.). **Ciência e Agrotecnologia.** v. 26, p. 550 – 558, 2002.

SAIO, K., NIKKUNI, I.; ANDO, Y.; OTSURU, M.; TERAUCHI, Y.; KITO, M. Soybean quality changes during model storage studies. **Cereal Chemistry.** v. 57, n. 2, p. 77 – 82, 1980.

SAIO, K.; KOBAYAKAWA, K.; KITO, M. Protein denaturation during model storage studies of soybeans and meals. **Cereal Chemistry.** v. 59, n. 5, p. 408 – 412, 1982.

SAKTHIVELU, G.; DEVI, M.K.A.; GIRIDHAR, P.; RAJASEKARAN, T.; RAVISHANKAR, G.A.; NIKOLOVA, M.T.; ANGELOV, G.B.; TODOROVA, R.M.; KOSTURKOVA, G.P. Isoflavone composition, phenol content, and antioxidant activity of soybean seeds from India and Bulgaria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** v. 56, p. 2090 – 2095, 2008.

SALDIVAR, X.; WANG, Y-J.; CHEN, P.; MAUROMOSTAKOS, A. Effects of blanching and storage conditions on soluble sugar contents in vegetable soybean. **LWT- Food Science and Technology.** v. 43, p. 1368 – 1372, 2010.

SÁNCHEZ-GONZÁLES, I.; JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; SAURA-CALIXTO, F. In vitro antioxidant activity of coffees brewed using different procedures. **Food Chemistry.** v. 90, p. 133 – 139, 2005.

SATHE, S.H.; SHARMA, G.M.; KSHIRSAGAR, H.H.; SU, M.; ROUX, K.H. Effects of long term frozen storage on electrophoretic patterns, immunoreactivity, and pepsin *in vitro* digestibility of soybean (*Glycine max* L.) proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** v. 57, p. 1312 – 1318, 2009.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. Biosynthesis, Classification, and Nomenclature of Phenolics in Food and Nutraceuticals. In: _____. **Phenolics in Food and Nutraceuticals.** Boca Raton: CRC Press, 2006. Cap. 1, p. 1 – 16.

SHARMA, S.; KAUR, A.; BANSAL, A.; GILL, B.S. Positional effects on soybean seed composition during storage. **Journal of Food Science and Technology**. v. 50, p. 353 – 359, 2013.

SHI, H.; NOGUCHI, N.; NIKI, E. Introducing natural antioxidants. In: POKORNY, J.; YANISHLIEVA, N. GORDON, M.H. (Ed.). **Antioxidants in Food: Practical applications**. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2001. cap. 8, p. 147 – 158.

SHURTLEFF, W.; AOYAGI, A. **The soybean plant: Botany, Nomenclature, Taxonomy, Domestication and Dissemination**. 2004. Disponível em: <http://www.soyinfocenter.com/HSS/soybean_plant4.php>. Acesso em: 22 Jun. 2017.

SILVA, J.B.; CARRÃO-PANIZZI, M.C.; PRUDENCIO, S.H. Chemical and physical composition of grain-type and food type soybean for food processing. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 44, p. 777 – 784, 2009.

SILVA, J.B.; PRUDENCIO, S.H; CARRÃO-PANIZZI, M.C.; GREGORUT, C.; FONSECA, F.; MATTOSO, L. Study on the flavour of soybean cultivars by sensory analysis and electronic tongue. **International Journal of Food Science and Technology**. v. 47, p. 1630 – 1638, 2012.

SLAVIN, M.; CHENG, Z.; LUTHER, M.; KENWORTHY, W.; YU, L.L. Antioxidant properties and phenolic, isoflavone, tocopherol and carotenoid composition of Maryland-grown Soybean lines with altered fatty acids profiles. **Food Chemistry**. v. 114, p. 20 – 27, 2009.

SONG, T.T.; HENDRICH, S.; MURPHY, P. Estrogenic activity of glycitein, a soy isoflavone. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**.v. 47, p. 1607 – 1610, 1999.

St. ANGELO, A.J.; ORY, R. L. Lipid degradation during seed deterioration. **Phytopathology**. v. 73, p. 315 – 317, 1983.

STEWART, R.R.C.; BEWLEY, J.D. Lipid peroxidation associated with aging of soybean axes. **Plant Physiology**. v. 65, p. 245 – 248, 1980.

SUN, W.Q.; LEOPOLD, A.C. The Maillard reaction and oxidative stress during aging of soybean seeds. . **Physiologia Plantarum**. v. 94, p. 94 – 104, 1995.

SUNG, J.M; CHIU, C.C. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes of naturally aged soybean seed. **Plant Science**. v. 110, p. 45 – 52, 1995.

SUNG, J.M.; JENG, T.L. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes associated with accelerated aging of peanut seed. **Physiologia Plantarum**. v. 91, p. 51 – 55, 1994.

SUNG, J.M. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes in soybean seeds during aging. **Physiologia Plantarum**. v. 97, p. 85 – 89, 1996.

SUZUKI, K.; KOIKE, H.; MATSUI, H.; ONO, Y.; HASUMI, M.; NAKAZATO, H.; OKUGI, H.; SEKINE, Y.; OKI, K.; ITO, K.; YAMAMOTO, T.; FUKABORI, Y.;

KUROKAWA, K.; YAMANAKA, H. Genistein, a soy isoflavone, induces glutathione peroxidase in the human prostate cancer cell lines LNCAP and PC-3. **International Journal of Cancer**. v. 99, p. 846 – 852, 2002.

TABORDA, P. C. S. A.; CARDOSO, L. A. C.; KARP, S. G. α -Galactosidases: characteristics, production and immobilization. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 55, p. 195 – 204, 2016.

TIAN, X.; SONG, S.; LEI, Y. Cell death and reactive oxygen species metabolism during accelerated ageing of soybean axes. **Russian Journal of Plant Physiology**. v. 55, p. 33 – 40, 2008.

TYUG, T.S.; PRASAD, K.N.; ISMAIL, A. Antioxidant capacity, phenolics and isoflavones in soybean by-products. **Food Chemistry**. v. 123, p. 583 – 589, 2010.

USDA. **Carryover levels for grains**: A method for determining amounts that are optimal under specified conditions. 1958. Disponível em: <<http://naldc.nal.usda.gov/download/CAT87201112/PDF>>. Acesso em: 26 Ago. 2014.

USDA. **Soybean area, yield and production**. 2014. Disponível em: <<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/psdReport.aspx?hidReportRetrievalName=Table+11+Soybean+Area%2c+Yield%2c+and+Production>>. Acesso em: 30 Jun. 2014.

UTUMI, M.M.; BARROS, E.G.; OLIVEIRA, M.G.; SEDIYAMA, C.S.; MOREIRA, M.A. Efeito da eliminação genética de lipoxigenases e de polipeptídios de reserva na qualidade da proteína de soja. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. v. 10, p. 203 – 212, 1998.

VESELOVSKY, V.A.; VESELOVA, T.V. Lipid peroxidation, carbohydrate hydrolysis, and Amadori-Maillard reaction at early stages of dry seed aging. **Russian Journal of Plant Physiology**. v. 59, n. 6, p. 811 – 817, 2012.

VIANA, S. F.; GUIMARÃES, V. M.; JOSÉ, I. C.; OLIVEIRA, M. G. A.; COSTA, N. M. B.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A.; REZENDE, S. T. Hydrolysis of oligosaccharides in soybean flour by soybean α -galactosidase. **Food Chemistry**, v. 93, p. 665 – 670, 2005.

VIEIRA, C. R.; CABRAL, L. C.; DE PAULA, A. C. O. Composição centesimal e conteúdo de aminoácidos, ácidos graxos e minerais de seis cultivares de soja destinadas à alimentação humana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.34, p.1277 – 1283, 1999.

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

WANG, H-J.; MURPHY, P. A. Isoflavone Content in Commercial Soybean Foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 42, p. 1666 – 1673, 1994.

WANG, J.; FUJIMOTO, K.; MIYAZAWA, T.; ENDO, Y.; KITAMURA, K. Sensitivities of lipoxigenase-lacking soybean seeds to accelerated aging and their chemiluminescence levels. **Phytochemistry**. v. 29, p. 3739 – 3742, 1990.

WETTLAUFER, S.H.; LEOPOLD, A.C. Relevance of Amadori and Maillard products to seed deterioration. **Plant Physiology**.v. 97, p. 165 – 169, 1991.

WILSON JR, D.O.; McDONALD JR, M.B.A Convenient volatile aldehyde assay for measuring seed vigour. **Seed Science and Technology**. v. 14, n. 2, p. 259 – 268, 1986.

XIN, X.; TIAN, Q.; YIN, G.; CHEN, X.; ZHANG, J.; NG, S.; LU, X. Reduced mitochondrial and ascorbate-glutathione activity after artificial ageing in soybean seed. **Journal of Plant Physiology**. v. 171, p. 140 – 147, 2014.

XU, B.J.; YUAN, S.H.; CHANG, S.K.C. Comparative analysis of phenolic composition, antioxidant capacity, and color of cool season legumes and other selected food legumes. **Journal of Food Science**. v. 72, p. 167 – 177, 2007.

YANISHLIEVA-MASLAROVA, N.V. Inhibiting oxidation. In: POKORNY, J.; YANISHLIEVA, N. GORDON, M.H. (Ed.). **Antioxidants in Food: Practical applications**. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2001. Cap. 3, p. 22– 57.

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

YOSHIDA, B. Y. **Propriedades físicas, químicas e tecnofuncionais de okara de soja envelhecida e aplicação do coproduto em salsicha**. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

ZILIC, S.; ALILLIOGLU, H.G.; SERPEN, A.; PERIC, V.; GOKMEN, V. Comparisons of phenolic compounds, isoflavones, antioxidant capacity and oxidative enzymes in yellow and black soybeans seed coat and dehulled bean. **European Food Research and Technology**. v. 237, p. 409 – 418, 2013.

5 MATERIAL E MÉTODOS

O item 5 está contemplado com o desenvolvimento de dois artigos científicos que estão apresentados no item **6 RESULTADOS E DISCUSSÃO**.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão desta pesquisa foram divididos em dois artigos científicos que estão apresentados a seguir na seguinte ordem:

6.1 ARTIGO CIENTÍFICO I

Alterações nas isoflavonas e capacidade antioxidante durante envelhecimento de cultivares de soja com e livre de lipoxigenases.

O artigo está redigido conforme as normas do periódico científico *Food Chemistry*.

6.2 ARTIGO CIENTÍFICO II

Oxidação lipídica e alterações nos carboidratos no envelhecimento em cultivares de soja com e livre de lipoxigenases.

O artigo está redigido conforme as normas do periódico científico *Food Chemistry*.

6.1 ARTIGO CIENTÍFICO I

Alterações nas isoflavonas e capacidade antioxidante durante envelhecimento de cultivares de soja com e livre de lipoxigenases.

Artigo redigido para submissão conforme normas do periódico científico *Food Chemistry*.

Alterações nas isoflavonas e capacidade antioxidante durante envelhecimento de cultivares de soja com e livre de lipoxigenases.

Resumo:

O estudo teve como objetivo avaliar as alterações na atividade da β -glicosidase, perfil de isoflavonas, compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante pelos métodos de FRAP, ABTS^{•+} e DPPH[•] em grãos de duas cultivares de soja: BRS 284 e BRS 257 (livre das enzimas lipoxigenases L1, L2 e L3), durante o envelhecimento natural (até 18 meses, temperatura e umidade relativa ambiente) e envelhecimento acelerado (até 9 meses, 30 °C e 78 % umidade relativa). O controle foi mantido a 4 °C, 60 % umidade relativa. O envelhecimento (natural e acelerado) de forma geral não causou alterações na atividade da β -glicosidase, mas resultou em alteração no perfil de isoflavonas, que foi mais acentuada na condição acelerada, com um aumento significativo no conteúdo de agliconas. O envelhecimento acelerado levou ao aumento dos fenólicos totais somente na BRS 257 e da capacidade antioxidante por FRAP, em ambas as cultivares. Ambas as cultivares apresentaram um comportamento semelhante de alterações nos compostos estudados durante o envelhecimento natural e acelerado.

Palavras-chave: Armazenamento; *Glycine max*; Isoflavonas agliconas; β -glicosidase; FRAP.

1. Introdução

A soja é um grão versátil, que possui alto teor de lipídeos e proteínas, sendo matéria prima para extração de óleo, produção de concentrados e isolados proteicos e de alimentos tradicionais como o natto, tofu e extrato aquoso. A soja é também fonte de compostos fenólicos, entre os quais estão os ácidos fenólicos (ácidos ferúlico, benzóico,

protocatecúlico e os flavonóides (isoflavonas), sendo estes últimos a classe de fenólicos presente em maior quantidade nos grãos (Chung, Seo, Ahn & Kim, 2011; Slavin, Cheng, Luther, Kenworthy & Yu, 2009). Diversos estudos constataram que os compostos fenólicos da soja possuem capacidade antioxidante, e as isoflavonas, principalmente nas suas formas agliconas, têm sido associadas também com atividade antitumoral *in vitro* (Barbosa, Hassimotto, Lajolo & Genovese, 2006; Slavin et al., 2009; Niamnuy, Nachaisin, Laohsavanich & Devahastin, 2011; Suzuki et al., 2002).

A soja contém isoflavonas em quatro formas químicas distintas, sendo três na forma glicosilada: acetilglicosídica (6''-O- acetilgenistina, 6''-O- acetilglicitina e 6''-O- acetildaidzina), malonilglicosídica (6''-O- malonilgenistina, 6''-O- malonilglicitina e 6''-O- malonildaizina) e β -glicosídica (genistina, glicitina e daidzina) e uma na forma aglicona (genisteína, gliciteína e daidzeína) (Hou & Chang, 2002). Nos grãos podem ocorrer interconversões entre as formas de isoflavonas, sendo que as formas glicosiladas podem ser convertidas em agliconas por meio de hidrólise das ligações β -glicosídicas pela ação da enzima β -glicosidase (EC: 3.2.1.21) presente na soja (Matsuura & Obata, 1993). As formas malonil e acetilglicosídicas podem converter-se em suas formas β -glicosídicas por meio de desesterificação, quando submetidas a altas temperaturas (Niamnuy et al., 2011).

Quando a soja é armazenada por longos períodos, principalmente em altas temperaturas (acima de 22 °C) e umidade relativa (acima de 60 %), além de umidade do grão maior do que 13 %, ocorrem diversas reações bioquímicas que irão resultar no envelhecimento dos grãos (Kong, Chang, Liu & Wilson, 2008). Destaca-se a peroxidação lipídica onde os radicais livres presentes nas células, oriundos de diversos processos metabólicos (como a respiração celular), iniciam as reações de peroxidação dos ácidos graxos poliinsaturados, resultando na perda da integridade das membranas celulares e, conseqüentemente, na descompartimentalização das células. Concomitantemente, ocorrem

também reações de hidrólise dos lipídeos, causando aumento da acidez nos grãos, que é uma das causas da redução da solubilidade das proteínas (Marcos-Filho, 1999; Kibinza, Bazin, Bailly, Farrant, Corbineau & El-Maarouf-Bouteau, 2011; Xin et al., 2014; Saio, Nikkuni, Ando, Otsuru, Terauchi & Kito, 1980). As reações de oxidação e hidrólise dos lipídeos, por sua vez, resultam em danos a outros componentes celulares como as proteínas e ácidos nucleicos causando redução ou aumento na atividade de diversas enzimas, além de alterações no perfil de isoflavonas (Saio et al., 1980; Sung & Chiu, 1995; Kamizake, Varéa & Prudencio, 2014; Narayan, Chauhan & Verma, 1988; Hou et al., 2002; Kim, Jung, Ahn & Chung, 2005; Lee et al., 2003).

A soja contém três formas de lipoxigenases (EC 1.13.11.12) denominadas de L1, L2 e L3. Estas enzimas catalisam a hidroperoxidação do ácido linoleico e de outros ácidos graxos poliinsaturados e estão relacionadas com a geração de sabores indesejáveis durante o processamento da soja (Matoba, Hidaka, Narita, Kitamura, Kaizuma & Kito, 1985). Por atuarem na peroxidação de lipídeos, estas enzimas podem ter algum envolvimento no envelhecimento dos grãos. Entretanto o mecanismo ainda não está totalmente esclarecido, pois os poucos estudos existentes apresentaram resultados conflitantes. Segundo Lambrecht, Nielsen, Liska e Nielsen (1996), a ausência das lipoxigenases L2 e L3 confere maior resistência ao envelhecimento em soja armazenada em condições adversas, resultando em menores alterações nas proteínas e no produto tofu. Entretanto, outros autores observaram redução na atividade destas enzimas em soja armazenada em diversas condições, e não constataram relação entre a ausência de pelo menos duas lipoxigenases e maior resistência ao envelhecimento (Sung et al., 1995; Narayan et al., 1988; Wang, Fujimoto, Miyazawa, Endo & Kitamura, 1990).

Existem poucas informações sobre as interconversões das diferentes formas de isoflavonas durante o envelhecimento da soja (Hou et al., 2002; Lee et al., 2003; Kim et

al., 2005), especialmente em relação a cultivares brasileiras (Ávila et al., 2011; Ávila, Braccini, Souza, Mandarino, Bazo & Cabral, 2012) e não há estudos mostrando o papel da enzima β -glicosidase neste processo. Há também poucos estudos sobre as alterações nos compostos fenólicos totais e na atividade antioxidante dos grãos de soja submetidos ao envelhecimento (Ávila et al., 2012; Lee & Cho, 2012). Sendo assim, os objetivos deste estudo foram investigar duas cultivares de soja (uma livre das lipoxigenases L1, L2 e L3 e outra contendo as três enzimas) quanto às alterações no conteúdo de fenólicos totais, capacidade antioxidante e no perfil de isoflavonas durante o envelhecimento dos grãos de forma natural e acelerada, e determinar a atividade da enzima β -glicosidase, que atua na conversão das isoflavonas glicosídicas em agliconas, contribuindo assim com a elucidação do processo de conversão das isoflavonas durante o envelhecimento.

2. Material e Métodos

2.1 Material

Utilizaram-se grãos de duas cultivares de soja recomendadas para consumo humano, BRS 284 (hilo marrom claro, casca amarelo claro, 38,7 % de proteínas, 20,4 % de lipídeos e tamanho equivalente a 14,6 g /100 grãos) e BRS 257 (livre das lipoxigenases L1, L2 e L3, hilo marrom claro, casca amarelo claro, 40,6 % de proteínas, 22,6 % de lipídeos e tamanho equivalente a 14,4 g/100 grãos). Os grãos foram cultivados na safra de 2013/2014, na região de Mauá da Serra, norte do Paraná, Brasil.

Os padrões de isoflavonas malonil conjugadas e acetil conjugadas foram obtidos de Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan). Os padrões de isoflavonas β -glicosídicas e agliconas foram obtidos de Sigma Aldrich (St. Louis, USA). Todos os reagentes utilizados na quantificação das isoflavonas por cromatografia líquida de ultra eficiência

(CLUE) foram de grau cromatográfico. Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

2.2 Envelhecimento da soja

O estudo consistiu de dois experimentos de envelhecimento, um acelerado (EA) e outro natural (EN), de grãos recém-colhidos das duas cultivares de soja. Inicialmente, foi feita a seleção dos grãos, retirando-se os quebrados e danificados além de sujidades e materiais estranhos. Os grãos controles foram mantidos em câmara fria a 4 °C e 60 % de umidade relativa (UR) (Hou et al., 2002; Kamizake, Yamashita & Prudencio, 2014). Para o EA, os grãos foram armazenados em estufa a 30 °C e 78 ± 2 % de UR (obtida por solução de cloreto de potássio saturada) por até nove meses. Para o EN, os grãos foram armazenados em condições ambientais não controladas por 18 meses, e a temperatura e UR foram monitoradas diariamente com termo-higrômetro (INCOTERM Modelo 7666.02.0.00), sendo a média no período de 23,9 °C e 62,7 % UR, a máxima de 34,4 °C e 86 % UR e a mínima de 12 °C e 24 % UR.

Amostras das condições de envelhecimento acelerado e natural foram tomadas em intervalos de um mês e três meses, respectivamente, e estocadas nas mesmas condições do controle até a realização das análises. Para as análises, os grãos foram moídos em moinho analítico (IKA A11 Basic) e peneirados em peneira de 60 mesh.

2.3 Teor de umidade

O teor de umidade dos grãos foi determinado de acordo com a metodologia padrão da AOAC (1995).

2.4 Determinação da atividade da β -glicosidase

Foram homogeneizados, em tubos de ensaio, 0,2 g de amostras e 3 mL de tampão citrato 0,05 mol. L⁻¹ (pH 4,5) contendo NaCl 0,1 mol.L⁻¹. Os tubos foram mantidos a temperatura ambiente por uma hora, sendo agitados em vórtex, em intervalos de 15 minutos, por uma hora a temperatura ambiente. Após centrifugação (Centrífuga 5804R - Eppendorf) a 4 °C, 3215 g por 20 minutos (Carrão-Panizzi & Bordingnon, 2000), o sobrenadante foi filtrado (filtro Millex-HN, 0,45 μ m) obtendo-se o extrato para a determinação da atividade da enzima, conforme procedimento descrito por Matsuura et al. (1993) empregando-se o substrato cromogênico ρ -nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (ρ -NPG). Foram incubados, separadamente, uma solução de ρ -NPG 1 mmol. L⁻¹ preparada em solução tampão acetato (0,1 mol.L⁻¹, pH 4,7) e 0,2 mL do extrato da amostra em banho-maria (30 °C, 10 minutos). Então, foi adicionado 0,8 mL de ρ -NPG 1 mmol. L⁻¹ ao tubo de ensaio contendo a amostra, e a mistura foi mantida em banho-maria (30 °C) por mais 15 minutos. Interrompeu-se a reação pela adição de 1,0 mL de carbonato de sódio 0,5 mol. L⁻¹. A absorbância do ρ -nitrofenol (ρ -NP) liberado na reação foi lida em espectrofotômetro a 400 nm (BIOCHROM, Libra S22). A curva padrão de ρ -NP foi preparada em concentrações variando de 8 a 64 μ mol. L⁻¹. Uma unidade de atividade da enzima (UA) foi definida como a quantidade de enzima requerida para liberar 1 μ mol de ρ -NP em 1 minuto de reação, nas condições do ensaio. Os resultados foram expressos em UA. g⁻¹ de amostra em base seca.

2.5 Análise de isoflavonas por CLUE

O teor das diferentes formas de isoflavonas foi determinado por cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE). Os grãos moídos foram desengordurados com hexano (1:10 m/v) por 1 h a temperatura ambiente, com agitação contínua, filtrando-se a

vácuo a seguir. Para a extração das isoflavonas, 0,2 g da amostra desengordurada foram adicionadas a 8 mL do solvente extrator (água ultrapura, acetona e etanol na proporção de 1:1:1, v/v/v) (Yoshiara, Madeira, Delaroza, Silva & Ida, 2012). Esta mistura foi agitada a cada 15 minutos em agitador de tubos, por uma hora. Em seguida, a mistura foi mantida em banho ultrassônico por 15 minutos, centrifugada (794 g, 15 min, 4 °C) (Centrifuga 5804R - Eppendorf, Hamburg, GE), e filtrada (filtro Millex-LH 0,22 µM), obtendo-se o extrato.

A quantificação das diferentes formas das isoflavonas dos grãos de soja foi feita de acordo com Handa, Couto, Vicensoti, Georgetti e Ida (2014). Para a análise cromatográfica, utilizou-se uma coluna de fase reversa (modelo ACQUITY – UPLC BEH C18 Waters) com as dimensões: 2,1 mm x 50 mm e tamanho de partícula de 1,7 µm. Alíquotas de 1,4 µL dos extratos foram injetadas automaticamente no cromatógrafo líquido de ultra alta eficiência (Acquity UPLC[®] System, Waters). Usou-se gradiente não linear, sendo a fase móvel A, água acidificada (pH 3,0) ajustada com ácido acético glacial e a fase móvel B, acetonitrila 100 %, e a vazão das fases móveis foi de 0,7 mL. min⁻¹. O gradiente iniciou-se com 90 % da fase móvel A e 10 % da fase móvel B. Após 8 minutos, atingiu-se 100 % de B, retornando às condições iniciais aos 9 minutos. A temperatura da coluna manteve-se em 35 °C, com tempo de corrida de 10 minutos. Para a detecção das isoflavonas foi utilizado um detector de arranjo de diodos (Waters) no comprimento de onda de 260 nm. Cada isoflavona foi identificada por comparação dos tempos de retenção e do espectro UV dos padrões. A quantificação foi feita por padronização externa, utilizando como referência as curvas dos padrões de daidzina, glicitina, genistina, daidzeína, gliciteína, genisteína, acetil daidzina, acetil glicitina, acetil genistina, malonil daidzina, malonil glicitina e malonil genistina. Os resultados foram expressos em µmol de isoflavonas por g de amostra em base seca.

Os conteúdos totais de isoflavonas das formas β-glicosídicas, malonilglicosídicas e agliconas, além do total de isoflavonas em cada tempo de

armazenamento do EA e do EN foram obtidos pela soma dos valores das isoflavonas individuais correspondentes, em $\mu\text{mol. g}^{-1}$, em base seca.

2.6 Extração dos compostos fenólicos totais

A extração dos compostos fenólicos totais foi realizada de acordo com Xu e Chang (2007) com modificações. Foram agitados em mesa agitadora orbital (Marconi, MA 140 CFT) 0,5 g da amostra e 10 mL de solvente extrator (acetona: água: ácido acético, na proporção de 70: 29,5: 0,5; v/v/v) durante três horas. A suspensão foi centrifugada (1160 g, 15 min) (Centrifuga 5804R – Eppendorf) e o sobrenadante foi filtrado (filtro Millex-HN, 0,45 μm). Esses extratos foram armazenados por uma semana a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ para análises de fenólicos totais e de capacidade antioxidante.

2.7 Determinação dos compostos fenólicos totais

Os compostos fenólicos totais foram quantificados pelo método de Folin-Ciocalteu descrito por Kumazawa, Hamasaka e Nakayama (2004). A uma alíquota de 0,5 mL do extrato foram adicionados 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu (0,9 N) e 0,5 mL de carbonato de sódio 10 % (m/v). A mistura permaneceu em repouso por uma hora a temperatura ambiente, e então a absorbância foi lida a 760 nm em espectrofotômetro (BIOCHROM, Libra S22). A curva padrão de ácido gálico foi construída em concentrações variando de 4 a 24 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os resultados foram expressos como mg de equivalentes de ácido gálico por grama de amostra (mg EAG. g^{-1}), em base seca.

2.8 Medidas da capacidade antioxidante

2.8.1 Capacidade de sequestrar radicais DPPH[·]

A capacidade de sequestrar radicais DPPH[·] (2,2 difenil-1-picrilhidrazil) dos extratos fenólicos de soja foi determinada de acordo com Casagrande, Georgetti, Verri Jr., Borin, Lopez e Fonseca (2007). Foram misturados em tubo de ensaio, 1 mL de tampão acetato de sódio 0,1 mol.L⁻¹ (pH 5,5), 1 mL de etanol absoluto, 50 µL da amostra e 0,5 mL da solução etanólica de DPPH (250 µmol.L⁻¹). A mistura foi mantida ao abrigo da luz por 15 minutos e então procedeu-se a leitura da absorbância a 517 nm em espectrofotômetro (BIOCHROM, Libra S22). A curva padrão de Trolox em concentrações variando de 25 a 200 µg. mL⁻¹ foi construída e os resultados foram expressos em µmol de equivalentes de Trolox por g de amostra (µmol ET.g⁻¹) em base seca.

2.8.2 Capacidade de sequestrar radical livre ABTS^{·+}

A capacidade de sequestrar cátion radical livre ABTS^{·+} (2,2'- azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)) foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Sánchez-González, Jiménez-Escrig e Saura-Calixto (2005). Foram adicionados 10 µL da amostra a 4 mL da solução do radical ABTS^{·+} e após 6 minutos, a absorbância a 730 nm foi lida em espectrofotômetro (BIOCHROM, Libra S22). Preparou-se uma curva padrão de Trolox com concentrações variando de 0,75 a 10 mmol. mL⁻¹. Os resultados foram expressos em µmol de equivalentes de Trolox por g de amostra (µmol ET.g⁻¹) em base seca.

2.8.3 Método de redução do ferro (FRAP)

A capacidade antioxidante avaliada pelo método de FRAP seguiu o procedimento descrito por Sánchez-González et al. (2005). O reagente FRAP consistiu de 25 mL de tampão acetato 300 mmol.L⁻¹ (pH 3,6), 2,5 mL de TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina) 10 mmol.L⁻¹ em HCl 40 mmol.L⁻¹ e 2,5 mL da solução de (FeCl₃ . 6 H₂O) 20 mmol.L⁻¹. Para a análise, foram misturados 30 µL do extrato da amostra, 70 µL de água destilada e 900 µL do reagente de FRAP recém preparado. A mistura permaneceu 30 minutos em banho-maria a 37 °C e a absorbância a 595 nm foi lida em espectrofotômetro (BIOCHROM, Libra S22). A concentração de Trolox da curva padrão variou de 50 a 600 µmol.mL⁻¹. Os resultados foram expressos em µmol de equivalentes de Trolox por g de amostra (µmol ET.g⁻¹) em base seca.

2.9 Delineamento experimental e análise estatística

Cada experimento de envelhecimento dos grãos de soja (acelerado ou natural) foi repetido duas vezes e seguiu o delineamento inteiramente casualizado em esquema de parcelas subdivididas, onde o tempo de envelhecimento foi o tratamento principal e as cultivares o tratamento secundário. As análises foram feitas em duplicata em cada repetição dos experimentos. Os dados de cada análise de cada experimento foram submetidos à ANOVA e teste de comparação de médias de Tukey ($p \leq 0,05$). Empregou-se o programa Sisvar 5.6 (Ferreira, 2014).

3. Resultados e Discussão

3.1 Teor de umidade dos grãos

Quanto aos grãos controle, a cultivar BRS 257 continha maior conteúdo de umidade que a BRS 284. Porém, durante o EA houve aumento da umidade nos grãos

de ambas as cultivares, sendo que até o sétimo mês o conteúdo na BRS 257 foi superior ao da BRS 284. Já ao longo do EN, houve variação da umidade nas duas cultivares ao longo do tempo (Tabela 1 e 2). O aumento no conteúdo de umidade nos grãos do EA está de acordo com os resultados obtidos por Kamizake, Varéa et al. (2014), cujas condições do EA foram 30 °C e 84 % UR. Segundo os autores, o aumento da umidade deve-se à alta UR do meio em que os grãos foram submetidos durante o armazenamento em estufa. Já a flutuação de umidade observada nos grãos no EN, ou seja, ganho ou perda de umidade está relacionado com a variação da UR do meio ambiente.

3.2 Atividade da B-glicosidase e alterações das isoflavonas

Comparando-se as cultivares, a atividade da β -glicosidase foi maior na BRS 257 ao longo de todo o período do EA, inclusive no controle (Tabela 1). O EA não resultou em alteração na atividade da β -glicosidase na cultivar BRS 257, enquanto que na BRS 284 houve redução na atividade da enzima somente a partir do sétimo mês de armazenamento em relação ao controle. A atividade de β -glicosidase no EN foi maior na BRS 257 do que na BRS 284 somente no controle e aos 12 e 18 meses de armazenamento. Ao longo do EN não houve alteração na atividade da enzima na BRS 284, mas na BRS 257 observou-se redução na atividade somente no nono mês de armazenamento (Tabela 3). A variação na atividade das enzimas β -glicosidases entre diferentes cultivares de soja é atribuída a fatores genéticos (Carrão-Panizzi et al., 2000). Não foram encontrados estudos sobre a atividade da β -glicosidase com o envelhecimento da soja. Entretanto, há relatos de redução na atividade de outras enzimas (catalase, superóxido dismutase, peroxidase e ascorbato peroxidase) durante o envelhecimento natural e acelerado em diversas condições, devido à deterioração do sistema fisiológico dos grãos causada pelo envelhecimento (Sung et al., 1995; Xin et al., 2014; Narayan et al., 1988).

Quanto às isoflavonas totais, no controle, o conteúdo era menor na cultivar BRS 284 do que na BRS 257 (Tabela 1). Em ambas as cultivares houve redução nos conteúdos durante o EA. Na BRS 257, houve uma redução de 1,2 vezes a partir do sétimo mês, mantendo-se estável até o nono mês. Na BRS 284 notou-se redução de 1,4 vezes já no primeiro mês de armazenamento, e então não se alterou até o final do armazenamento. No EN (Tabela 2), ocorreu uma redução de 1,03 vezes na BRS 257 e de 1,24 vezes na BRS 284 aos 18 meses de armazenamento, significativa ($p \geq 0,05$) somente na BRS 284. O conteúdo de isoflavonas nos grãos de soja pode variar entre as cultivares e também com o ano e local de cultivo, além de outros fatores ambientais (Lee et al., 2003; Kim et al., 2005; Ávila et al., 2012). Além disso, em geral, quanto maior o tempo de armazenamento em condições naturais, maior a redução nos teores de isoflavonas totais na soja (Kim et al., 2005). Ávila et al. (2011) armazenaram 21 cultivares de soja por 180 dias em condições ambientais e observaram redução nas isoflavonas totais ao longo do tempo. Porém, dentre as cultivares, sete (entre elas a BRS 257) apresentaram aumento no conteúdo de isoflavonas, o que foi atribuído a uma possível ação de agentes ativos de reparo celular destas cultivares.

Tanto nos controles como na soja envelhecida nas duas condições (EA e EN) não foram encontradas as isoflavonas acetilglicosídicas, o que está de acordo com alguns relatos na literatura (Hou et al., 2002; Lee et al., 2003; Kim et al., 2005). Foi observado um comportamento semelhante para as duas cultivares quanto às alterações das demais formas das isoflavonas durante o EA e o EN (Tabelas 1 e 2).

A BRS 257 continha maior teor das isoflavonas malonilglicosídicas do que a BRS 284 no controle. Nas duas cultivares observou-se redução destas isoflavonas durante o EA já a partir do primeiro mês. Na BRS 257 controle as malonilglicosídicas representavam 67,3 % das isoflavonas totais e após os nove meses de armazenamento notou-se redução de

12,64 vezes, e assim passaram a representar somente 6,28 %. Na BRS 284 controle estas formas representavam 67,61 % das isoflavonas totais e ao final do armazenamento passaram a representar somente 5,43 %, (redução de 17,3 vezes). No EN notou-se redução menos acentuada nestas formas de isoflavonas, sendo que ao final dos 18 meses de armazenamento essas isoflavonas representavam 37,8 % das totais (redução de 1,8 vezes) na BRS 257, enquanto que na BRS 284 esta forma representava 39,4 % (redução de 2,1 vezes).

No controle, a BRS 257 continha maior conteúdo de isoflavonas β -glicosídicas do que a BRS 284. Notou-se redução dessas formas em ambas as cultivares durante o EA. Na cultivar BRS 284 a redução teve início a partir do quinto mês de armazenamento, e na BRS 257 a partir do sexto mês (Tabela 1). Nos controles estas formas representavam 29,88 % e 30,07 % das totais na BRS 257 e BRS 284, respectivamente, e ao final do armazenamento representaram 5,06 % (redução de 6,96 vezes) na BRS 257 e 2,47 % (redução de 16,9 vezes) na BRS 284. No EN observou-se comportamento oposto, houve aumento nas isoflavonas das formas β -glicosídicas a partir do nono mês para a BRS 257 e do mês 15 para a BRS 284. Ao final do armazenamento no EN as formas β -glicosídicas representavam 54,87 % das isoflavonas totais na BRS 257 (aumento de 1,78 vezes) e 53,76 % na BRS 284 (aumento de 1,44 vezes).

As isoflavonas agliconas aumentaram tanto no EA quanto no EN (Tabelas 1 e 2). O aumento no EA foi bastante acentuado, iniciando-se a partir do terceiro mês em ambas cultivares, sendo que no controle não havia diferença entre elas. No controle da BRS 257 as isoflavonas agliconas correspondiam a somente 2,95 % das totais, chegando a 88,65 % no nono mês (aumento de 25,4 vezes) e na BRS 284 as agliconas correspondiam a 2,31 % das totais, atingindo 91,85 %, o que caracteriza um aumento de 28,6 vezes. O aumento nas isoflavonas agliconas ao longo do EA indica que houve a conversão das formas glicosídicas para formas agliconas. A partir do terceiro

mês, o conteúdo de isoflavonas agliconas foi maior na BRS 257, o que pode ser decorrente da maior atividade da enzima β -glicosidase observada para esta cultivar comparada à da BRS 284 em todos os tempos do EA (Tabela 1). Estes resultados estão de acordo com aqueles relatados por Hou et al. (2002), que observaram redução no conteúdo de isoflavonas malonilglicosídicas e β -glicosídicas e aumento no conteúdo de agliconas em armazenamento por 9 meses, 30 °C e 84 % UR. Os autores sugeriram que o aumento das formas agliconas foi devido à hidrólise das isoflavonas glicosídicas pelas enzimas β -glicosidases, no entanto os mesmos não avaliaram a atividade da enzima.

Mesmo sem haver variação na atividade da enzima β -glicosidase durante o EA (Tabela 1), esta enzima pode ter atuado na conversão das isoflavonas das formas glicosídicas em agliconas. Durante o envelhecimento ocorrem alterações nas membranas lipídicas dos grãos, com perda de compartimentalização celular (Marcos-Filho, 1999). Esta desorganização das células pode ter facilitado o contato entre a enzima e seus substratos, favorecendo sua ação e resultando no aumento das isoflavonas agliconas ao longo do tempo. Segundo Hou et al. (2002) a alta temperatura, o aumento no conteúdo de umidade dos grãos e a redução no pH dos grãos também podem favorecer a ação da enzima. A redução no pH dos grãos ao longo do envelhecimento foi encontrada por diversos autores, sendo considerada um parâmetro indicador de ocorrência do envelhecimento (Kamizake, Varéa, et al., 2014; Saio et al., 1980; Kong et al., 2008).

No EN a conversão foi menor e o aumento nas formas agliconas foi de 2,4 vezes para a BRS 257 (em que as agliconas passaram a representar 7,31 % das isoflavonas totais), e de 2,38 vezes para a BRS 284 (passando a representar 6,85 % das totais) aos 18 meses (Tabela 2). Os resultados também estão de acordo com outros estudos em que há aumento no conteúdo de isoflavonas β -glicosídicas e, de forma menos acentuada, nas formas agliconas durante armazenamento por períodos mais prolongados

(de até 3 anos) sem controle de temperatura e UR (Hou et al., 2002; Kim et al., 2005; Lee et al., 2003). O aumento no conteúdo de isoflavonas glicosídicas durante o EN pode ser devido à conversão das formas malonilglicosídicas em suas formas β -glicosídicas por meio de reações de desesterificação (Hou et al., 2002). Segundo Lee et al. (2003), as variações de temperatura durante o armazenamento prolongado em condições ambientais, e também reações oxidativas, podem contribuir para a conversão das formas malonilglicosídicas em suas formas β -glicosídicas e agliconas correspondentes. Kim et al. (2005) sugerem que variações na temperatura e umidade durante o armazenamento prolongado em condição ambiental possam contribuir para alterações nos teores de isoflavonas totais e de suas formas.

As alterações no conteúdo e perfil de isoflavonas com o EA e o EN podem ser distintas (Ávila et al., 2012), pois provavelmente os danos às células ocorrem de forma mais lenta e em menor extensão durante o EN, quando comparado ao EA. Desta forma, a ação das enzimas β -glicosidases pode não ter sido favorecida no armazenamento em condições ambientais como parece ter ocorrido no EA, o que é evidenciado por um aumento menos acentuado no conteúdo de agliconas no EN comparado ao EA.

A deterioração dos grãos durante o envelhecimento é influenciada principalmente pela temperatura e UR do ambiente, além do conteúdo de umidade dos grãos, sendo que a umidade dos grãos é o fator mais relevante (Saio et al., 1980). Desta forma, explicam-se as diferenças entre o EA e o EN, pois, no EA os grãos foram submetidos à alta temperatura e UR de forma constante e no EN, a temperatura e a UR variaram amplamente no armazenamento conforme as estações do período, tornando o EN um processo mais ameno. Lehner, Mamadou, Poels, Côme, Bailly e Corbineau (2008) advertem que, durante o armazenamento nas condições natural e acelerada, os mecanismos de envelhecimento dos

grãos podem não ser idênticos, razão pela qual é importante estudar o envelhecimento em diferentes condições de tempo e UR para elucidá-los.

Há indícios de que as isoflavonas agliconas sejam absorvidas mais rapidamente e em maior quantidade do que suas formas glicosídicas pelo organismo, e que das formas agliconas, a genisteína é absorvida de forma mais eficiente do que a daidzeína (Izumi et al., 2000). Portanto, a soja envelhecida, apesar de ter a qualidade prejudicada tanto como semente quanto como ingrediente de alimentos, é uma fonte de isoflavonas agliconas. Considerando as duas cultivares, notou-se neste estudo um conteúdo médio de genisteína superior ao de daidzeína de 1,9 vezes no EA e 1,4 vezes no EN (Tabelas 3 e 4). Assim, a soja velha além de ser fonte de agliconas, apresenta prevalência da genisteína. Há estudos que indicam que a genisteína possui atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo*, e maior atividade antioxidante do que a daidzeína (Suzuki et al., 2002; Arora, Nair & Satrasburg, 1998).

Durante o EA e o EN, observaram-se, em geral, maiores teores de daidzina, genistina, malonil daidzina e malonil genistina na BRS 257 do que na BRS 284 (Tabelas 3 e 4). No EA, a glicitina foi encontrada no controle de ambas as cultivares, no primeiro e terceiro mês de armazenamento da BRS 284, e no terceiro mês da BRS 257, enquanto que no EN não ocorreram alterações. A partir do oitavo mês de armazenamento do EA a isoflavona malonil daidzina deixou de ser encontrada na BRS 284. A isoflavona daidzeína não foi encontrada no controle da BRS 284. A isoflavona gliciteína não foi encontrada em ambas as cultivares até o segundo mês do EA, sendo que nos demais meses não houve diferença entre as cultivares. Já no EN a isoflavona gliciteína não foi encontrada em ambas as cultivares durante todo o período de armazenamento.

3.4 Compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante

O teor de compostos fenólicos totais na BRS 257 foi maior do que na BRS 284 em todos os tempos de armazenamento do EA, exceto no controle, no qual nas cultivares não diferiram (Tabela 5). Observou-se um aumento significativo ($p \leq 0,05$) de 19,6 % aos nove meses de armazenamento da BRS 257. No EN (Tabela 5) não houve alteração em ambas as cultivares. Kamizake, Varéa et al. (2014) observaram aumento de conteúdo de fenólicos totais em grãos de duas cultivares convencionais tanto no EA (30 °C, 84 % UR, 9 meses) quanto no EN (temperatura e UR ambiente) diferente do observado no presente trabalho, o que pode ser devido à maior UR do EA empregada no referido estudo. Entretanto, Ávila et al. (2012) em estudo de qualidade fisiológica de soja armazenada a 41 °C, 100 % UR por 48 h observaram um aumento desses compostos no período de até aproximadamente 36 horas de armazenamento, seguido por um declínio até o final do período. Também notaram diferença entre as três cultivares convencionais de soja estudadas, que foi atribuída a características genéticas das cultivares.

Quanto à capacidade antioxidante avaliada por FRAP (Tabela 5) notou-se, no EA, aumento aos oito e nove meses de armazenamento na BRS 257 (aumento de 35,3 %) e no nono mês da BRS 284 (aumento de 32,79 %). Porém, não houve alteração durante o EN em ambas as cultivares. Por outro lado, quando empregaram-se os métodos de capacidade de sequestrar radicais DPPH[·] ou de sequestrar radical livre ABTS^{·+} não foi observada alteração durante o EA e o EN em ambas as cultivares.

Em ambas as cultivares, nos últimos dois meses de armazenamento do EA notou-se um aumento concomitante do conteúdo de compostos fenólicos totais (aproximadamente 19,5 %, apesar de não significativa ($p > 0,05$) na BRS 284) e da capacidade antioxidante por FRAP (aproximadamente 34 %). Correlação entre o teor de compostos fenólicos totais (em soja e produtos derivados) e a capacidade antioxidante, além da correlação entre o teor de isoflavonas totais e a capacidade antioxidante tem sido

demonstrada (Barbosa et al., 2006; Xu, Yuan, et al., 2007). Niamnuy et al. (2011) constataram que a capacidade antioxidante por FRAP teve uma maior correlação com o conteúdo de isoflavonas na soja do que a capacidade antioxidante por DPPH, assim como Ma e Huang (2014) que observaram uma maior correlação entre os conteúdos das isoflavonas agliconas e a capacidade antioxidante por FRAP do que para a capacidade antioxidante por DPPH em extrato aquoso de soja. As isoflavonas representam aproximadamente 72 % dos fenólicos totais da soja (Kim, Kim, Hahn & Chung, 2005), assim o aumento na capacidade antioxidante por FRAP durante o EA observado no presente estudo pode estar relacionado tanto com o aumento no teor de isoflavonas agliconas quanto com o aumento no teor de compostos fenólicos totais.

Lee e Cho (2012) observaram redução na capacidade de sequestrar o radical livre $ABTS^{+•}$ e de radicais $DPPH^•$ em soja preta convencional armazenada em condições naturais após dois anos, e atribuíram esta redução a uma possível degradação das isoflavonas e antocianinas presentes nos grãos estudados. Já Ávila et al. (2012) notaram aumento na capacidade de sequestrar o radical livre $ABTS^{+•}$ com o envelhecimento acelerado por 48 h (41 °C, 100 % UR) em soja convencional, diferentemente do observado neste trabalho, possivelmente devido à diferença nas condições de armazenamento. A utilização de um único método de avaliação da capacidade antioxidante não permite a ampla avaliação de todos os compostos antioxidantes presentes em uma amostra, uma vez que os resultados expressos por um dado método estão relacionados com as condições específicas do ensaio, os radicais empregados, assim como com os compostos antioxidantes e características hidrofóbicas/hidrofílicas da amostra (Huang, Ou & Prior, 2005; Xu, Yuan & Chang, 2007; Slavin et al., 2009). Dessa forma, as diferenças entre os resultados obtidos pelos três métodos podem estar relacionadas a seus princípios de avaliação.

Conclusões

Durante o EA e o EN de ambas as cultivares ocorrem alterações nos conteúdos e formas das isoflavonas. Não há alteração na atividade das enzimas β -glicosidases, significando que estas podem continuar atuando na conversão das isoflavonas β -glicosídicas em agliconas durante o envelhecimento. O envelhecimento acarreta em aumento significativo de agliconas, assim, a soja velha pode ser fonte destas isoflavonas, especialmente a genisteína. As cultivares BRS 284 (convencional) e a BRS 257 (sem lipoxigenases) apresentam padrão de comportamento semelhante ao longo do envelhecimento natural e acelerado. Assim, a ausência das lipoxigenases L1, L2 e L3 não influencia nas alterações dos componentes estudados.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro e concessão de bolsa de estudos e bolsa produtividade em pesquisa aos autores.

Referências

AOAC. (1995). *Official Methods of Analysis*. 16th ed. Washington, D.C.: Association of Official Analytical Chemists International. *Archives of Biochemistry and Biophysics*.

Arora, A., Nair, M. G. & Strasburg, G. M. (1998). Antioxidant activities of isoflavones and their biological metabolites in a liposomal system. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 356, 133 – 141.

Ávila, M. R., Braccini, A. L., Albrecht, L. P., Scapim, C. A., Mandarino, J. M. G., Bazo, G. L. & Cabral, Y. C. F. (2011). Effect of storage period on isoflavone content and physiological quality of conventional and transgenic soybean seeds. *Revista Brasileira de Sementes*, 33, 149 – 161.

Ávila, M. R., Braccini, A. L., Souza, C. G. M., Mandarino, J. M. G., Bazo, G. L. & Cabral, Y. C. F. (2012). Physiological quality, content and activity of antioxidants in soybean seeds artificially aged. *Revista Brasileira de Sementes*, 34, 397 – 407.

Barbosa, A. C. L., Hassimotto, N. M. A., Lajolo, F. M. & Genovese, M. I. (2006). Teores de isoflavonas e capacidade antioxidante da soja e produtos derivados. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26, 921 – 926.

Carrão-Panizzi, M. C. & Bordingnon, J. R. (2000). Activity of beta-glucosidase and levels of isoflavone glucosides in soybean cultivars affected by the environment. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 35, 873 – 878.

Casagrande, R., Georgetti, S. R., Verri Jr., W. A., Borin, M. F., Lopez, R. F. V. & Fonseca, M. J. V. (2007). In vitro evaluation of quercetin cutaneous absorption from topical formulations and its functional stability by antioxidant activity. *International Journal of Pharmaceutics*, 328, 183–190.

Chung, I-M., Seo, S-H., Ahn, J-K. & Kim, S-H. (2011). Effect of processing, fermentation, and aging treatment to content and profile of phenolic compounds in soybean seed, soy curd and soy paste. *Food Chemistry*, 127, 960 – 967.

Ferreira, D. F. (2014). Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. *Ciência e Agrotecnologia* [online], 38, 109 – 112. Available in: ISSN 1413-7054, <<http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542014000200001>>.

Handa, C. L., Couto, U. R., Vicensoti, A. H., Georgetti, S. R. & Ida, E. I. (2014). Optimization of soy flour fermentation parameters to produce β -glucosidase for bioconversion into aglycones. *Food Chemistry*, 152, 56 – 65.

Hou, H. J. & Chang, K. C. (2002). Interconversions of isoflavones in soybeans as affected by storage. *Journal of Food Science*, 67, 2083 – 2089.

Huang, D., Ou, B. & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841 – 1856.

Izumi, T., Piskula, M. K., Osawa, S., Obata, A., Tobe, K., Saito, M., Kataoka, S., Kubota, Y. & Kikuchi, M. (2000). Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. *Human Nutrition and Metabolism*, 130, 1695 – 1699.

Kamizake, N. K. K., Yamashita, F. & Prudencio, S. H. (2014). Physical alterations of soybean during accelerated and natural aging. *Food Research International*, 55, 55 – 61.

Kamizake, N. K. K., Varéa, G. S. & Prudencio, S. H. (2014). Physicochemical properties of aged soybean components. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 12, 263 – 268.

Kibinza, S., Bazin, J., Bailly, C., Farrant, J. M., Corbineau, F. & El-Maarouf-Bouteau, H. (2011). Catalase is a key enzyme in seed recovery from ageing during priming. *Plant Science*, 181, 309 – 315.

Kim, J. J., Kim, S. H., Hahn, S. J. & Chung, I. M. (2005). Changing soybean isoflavone composition and concentrations under two different storage conditions over three years. *Food Research International*, 38, 435 – 444.

Kim, S. H., Jung, W. S., Ahn, J. K. & Chung, I. M. (2005). Analysis of isoflavone concentration and composition in soybean [*Glycine max* (L.)] seeds between the cropping year and storage for 3 years. *European Food Research and Technology*, 220, 207 – 214.

Kong, F., Chang, S. K. C., Liu, Z. & Wilson, L.A. (2008). Changes of soybean quality during storage as related to soymilk and tofu making. *Journal of Food Science*, 73, S134 – S144.

Kumazawa, S., Hamasaka, T. & Nakayama, T. (2004). Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry*, 84, 329 – 339.

Lambrecht, H. S., Nielsen, S. S., Liska, B. J. & Nielsen, N. C. (1996). Effect of soybean storage on tofu and soymilk production. *Journal of Food Quality*, 19, 189 – 202.

Lee, J. W. & Cho, K. M. (2012). Changes occurring in compositional components of black soybeans maintained at room temperature for different storage periods. *Food Chemistry*, 131, 161 – 169.

Lee, S. J., Ahn, J. K., Kim, S. H., Kim, J. T., Han, S. J., Jung, M. Y. & Chung, I. M. (2003). Variation in Isoflavone of Soybean Cultivars with Location and Storage Duration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3382 – 3389.

Lehner, A., Mamadou, N., Poels, P., Côme, D., Bailly, C. & Corbineau, F. (2008). Changes in soluble carbohydrates, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in the embryo during ageing in wheat grains. *Journal of Cereal Science*, 47, 555–565.

Ma, Y. & Huang, H. (2014). Characterization and comparison of phenols, flavonoids and isoflavones of soymilk and their correlations with antioxidant activity. *International Journal of Food Science and Technology*, 49, 2290 – 2298.

Marcos-Filho, J. (1999). Teste de Envelhecimento Acelerado. In: Krzyzanowski, F. C., Vieira, R. D. & França-Neto, J. B. (Eds.), *Vigor de Sementes: Conceitos e Testes* (pp. 3.1 – 3.24). Londrina: ABRATES.

Matoba, T., Hidaka, H., Narita, H., Kitamura, K., Kaizuma, N., Kito, M. (1985). Lipoxygenase-2 isozyme is responsible for generation of *n*-Hexanal in soybean homogenate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 33, 852 – 855.

Matsuura, M. & Obata, A. (1993). B-Glucosidases from soybeans hydrolyze daidzin and genistin. *Journal of Food Science*, 58, 144 – 147.

Narayan, R., Chauhan, G. S. & Verma, N. S. (1988). Changes in the quality of soybean during storage. Part 1: Effect of storage on some physico-chemical properties of soybean. *Food Chemistry*, 27, 13 – 23.

Niamnuy, C, Nachaisin, M., Laohavanich, J. & Devahastin, S. (2011). Evaluation of bioactive compounds and bioactivities of soybean dried by different methods and conditions. *Food Chemistry*, 129, 899 – 906.

Saio, K., Nikkuni, I., Ando, Y., Otsuru, M., Terauchi, Y. & Kito, M. (1980). Soybean quality changes during model storage studies. *Cereal Chemistry*, 57, 77 – 82.

Sánchez-González, I., Jiménez-Escrig, A. & Saura-Calixto, F. (2005). In vitro antioxidant activity of coffees brewed using different procedures (Italian, espresso and filter). *Food Chemistry*, 90, 133 – 139.

Slavin, M., Cheng, Z., Luther, M., Kenworthy, W. & Yu, L. (2009). Antioxidant properties and phenolic, isoflavone, tocopherol and carotenoid composition of Maryland-grown soybean lines with altered fatty acid profiles. *Food Chemistry*, 114, 20 – 27.

Sung, J. M. & Chiu, C. C. (1995). Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes of naturally aged soybean seed. *Plant Science*, 110, 45 – 52.

Suzuki, K., Koike, H., Matsui, H., Ono, Y., Hasumi, M., Nakazato, H., Okugi, H., Sekine, Y., Oki, K., Ito, K., Yamamoto, T., Fukabori, Y., Kurokawa, K. & Yamanaka, H. (2002).

Genistein, a soy isoflavone, induces glutathione peroxidase in the human prostate cancer cell lines LNCAP and PC-3. *International Journal of Cancer*, 99, 846 – 852.

Wang, J., Fujimoto, K., Miyazawa, T., Endo, Y. & Kitamura, K. (1990). Sensitivities of lipoxygenase-lacking soybean seeds to accelerated aging and their chemiluminescence levels. *Photochemistry*, 29, 3739 – 3742.

Xin, X., Tian, Q., Yin, G., Chen, X., Zhang, J., Ng, S. & Lu, X. (2014). Reduced mitochondrial and ascorbate–glutathione activity after artificial ageing in soybean seed. *Journal of Plant Physiology*, 171, 140 – 147.

Xu, B. J. & Chang, S. K. C. (2007). A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. *Journal of Food Science*, 72, S159 – S166.

Xu, B. J., Yuhan, S. H. & Chang, S. K. C. (2007). Comparative analyses of phenolic composition, antioxidant capacity, and color of cool season legumes and other selected food legumes. *Journal of Food Science*, 72, S167 – S177.

Yoshiara, L. Y., Madeira, T. B., Delaroza, F., Silva, J. B. & Ida, E. I. (2012) Optimization of soy isoflavone extraction with different solvents using the simplex-centroid mixture design. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 9, 978 – 986.

Tabela 1 – Umidade, atividade da β -glicosidase e isoflavonas totais de sojas BRS 257 e 284 submetidas ao Envelhecimento Acelerado.

Cultivares	Controle	Tempo de Armazenamento (meses)								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Umidade (%)										
BRS 257	10,12 \pm 0,22 ^{Ae}	11,84 \pm 0,27 ^{Acd}	12,52 \pm 0,42 ^{Ab}	11,89 \pm 0,38 ^{Acd}	13,52 \pm 0,27 ^{Aa}	11,44 \pm 0,25 ^{Ad}	13,34 \pm 0,32 ^{Aa}	13,54 \pm 0,39 ^{Aa}	11,73 \pm 0,98 ^{Ad}	12,32 \pm 0,43 ^{Abc}
BRS 284	8,51 \pm 0,22 ^{Bf}	10,79 \pm 0,33 ^{Bde}	10,69 \pm 0,22 ^{Bde}	10,39 \pm 0,32 ^{Be}	12,19 \pm 0,20 ^{Bbc}	11,04 \pm 0,38 ^{Bd}	12,12 \pm 0,09 ^{Bbc}	12,85 \pm 0,48 ^{Ba}	11,81 \pm 0,82 ^{Ac}	12,43 \pm 0,66 ^{Aab}
Atividade de β-glicosidase (UA.g⁻¹)										
BRS 257	0,15 \pm 0,008 ^{Aa}	0,15 \pm 0,005 ^{Aa}	0,15 \pm 0,01 ^{Aa}	0,15 \pm 0,005 ^{Aa}	0,15 \pm 0,008 ^{Aa}	0,14 \pm 0,005 ^{Aa}	0,14 \pm 0,003 ^{Aa}	0,14 \pm 0,003 ^{Aa}	0,14 \pm 0,008 ^{Aa}	0,15 \pm 0,008 ^{Aa}
BRS 284	0,12 \pm 0,003 ^{Bab}	0,13 \pm 0,01 ^{Ba}	0,13 \pm 0,004 ^{Bab}	0,12 \pm 0,001 ^{Babc}	0,11 \pm 0,001 ^{Babc}	0,11 \pm 0,001 ^{Babc}	0,11 \pm 0,001 ^{Babc}	0,10 \pm 0,001 ^{Bc}	0,10 \pm 0,003 ^{Babc}	0,10 \pm 0,002 ^{Bbc}
Isoflavonas totais										
BRS 257	6,76 \pm 0,09 ^{Aa}	5,95 \pm 0,04 ^{Aab}	5,87 \pm 0,32 ^{Ab}	6,44 \pm 0,38 ^{Aab}	6,08 \pm 0,57 ^{Aab}	5,92 \pm 0,26 ^{Aab}	6,01 \pm 0,16 ^{Aab}	5,73 \pm 0,37 ^{Ab}	5,82 \pm 0,19 ^{Ab}	5,73 \pm 0,50 ^{Ab}
BRS 284	5,62 \pm 0,30 ^{Ba}	4,59 \pm 0,17 ^{Bb}	3,99 \pm 0,19 ^{Bb}	4,53 \pm 0,11 ^{Bb}	4,03 \pm 0,27 ^{Bb}	4,22 \pm 0,11 ^{Bb}	4,34 \pm 0,07 ^{Bb}	4,01 \pm 0,08 ^{Bb}	4,10 \pm 0,16 ^{Bb}	4,05 \pm 0,17 ^{Bb}
Malonil glicosídicas totais										
BRS 257	4,55 \pm 0,03 ^{Aa}	3,25 \pm 0,03 ^{Ab}	2,78 \pm 0,10 ^{Ac}	2,38 \pm 0,17 ^{Ad}	1,79 \pm 0,10 ^{Ae}	1,34 \pm 0,08 ^{Af}	1,05 \pm 0,03 ^{Afg}	0,76 \pm 0,06 ^{Agh}	0,51 \pm 0,01 ^{Ahi}	0,36 \pm 0,07 ^{Ai}
BRS 284	3,80 \pm 0,20 ^{Ba}	2,76 \pm 0,12 ^{Bb}	2,01 \pm 0,09 ^{Bc}	1,76 \pm 0,06 ^{Bc}	1,31 \pm 0,06 ^{Bd}	1,05 \pm 0,03 ^{Bde}	0,82 \pm 0,02 ^{Bef}	0,61 \pm 0,02 ^{Afg}	0,36 \pm 0,02 ^{Agh}	0,22 \pm 0,009 ^{Ah}
β-glicosídicas totais										
BRS 257	2,02 \pm 0,09 ^{Abc}	2,13 \pm 0,05 ^{Aab}	2,18 \pm 0,22 ^{Aab}	2,48 \pm 0,20 ^{Aa}	2,11 \pm 0,13 ^{Aab}	1,59 \pm 0,06 ^{Ac}	1,16 \pm 0,05 ^{Ade}	0,74 \pm 0,07 ^{Aef}	0,39 \pm 0,01 ^{Af}	0,29 \pm 0,02 ^{Af}
BRS 284	1,69 \pm 0,13 ^{Bab}	1,54 \pm 0,05 ^{Bab}	1,40 \pm 0,08 ^{Babc}	1,72 \pm 0,04 ^{Ba}	1,24 \pm 0,10 ^{Bbc}	1,04 \pm 0,02 ^{Bcd}	0,72 \pm 0,02 ^{Bde}	0,44 \pm 0,02 ^{Bef}	0,18 \pm 0,01 ^{Af}	0,10 \pm 0,02 ^{Af}
Agliconas totais										
BRS 257	0,20 \pm 0,004 ^{Ah}	0,56 \pm 0,02 ^{Ah}	0,90 \pm 0,02 ^{Agh}	1,58 \pm 0,04 ^{Afg}	2,17 \pm 0,35 ^{Aef}	2,99 \pm 0,14 ^{Ade}	3,79 \pm 0,16 ^{Ac}	4,23 \pm 0,24 ^{Abc}	4,92 \pm 0,19 ^{Aab}	5,08 \pm 0,43 ^{Aa}
BRS 284	0,13 \pm 0,002 ^{Ag}	0,30 \pm 0,01 ^{Afg}	0,58 \pm 0,02 ^{Afg}	1,04 \pm 0,04 ^{Bef}	1,47 \pm 0,11 ^{Bde}	2,13 \pm 0,10 ^{Bcd}	2,80 \pm 0,06 ^{Bbc}	2,96 \pm 0,09 ^{Babc}	3,56 \pm 0,14 ^{Bab}	3,72 \pm 0,20 ^{Ba}

Valores representam média de duas determinações em cada repetição do experimento (n = 4) \pm desvio padrão.

Médias na mesma coluna, seguidas de letras maiúsculas diferentes e na linha, acompanhadas de letras minúsculas diferentes, indicam diferença significativa (p \leq 0,05) em cada parâmetro.

Teor de umidade expresso em g.100 g⁻¹; Atividade de β -glicosidase expressa em UA.g⁻¹; Teores de Isoflavonas expressos em μ mol.g⁻¹

Resultados expressos em base seca, exceto umidade.

Controle: 4 °C e 66 % UR. Envelhecimento Acelerado: até 9 meses, 30 °C e 78 \pm 2 % UR.

Tabela 2 – Umidade, atividade da β -glicosidase e isoflavonas totais de sojas BRS 257 e 284 submetidas ao Envelhecimento Natural.

Cultivares	Tempo de Armazenamento (meses)						
	Controle	3	6	9	12	15	18
Umidade (%)							
BRS 257	10,12 \pm 0,22 ^{Aab}	8,26 \pm 0,32 ^{Abcd}	8,11 \pm 0,25 ^{Accl}	9,90 \pm 0,17 ^{Aabc}	10,70 \pm 0,25 ^{Aa}	7,20 \pm 0,36 ^{Ad}	10,21 \pm 0,36 ^{Aab}
BRS 284	8,51 \pm 0,22 ^{Babcd}	7,65 \pm 0,30 ^{Ad}	7,79 \pm 0,14 ^{Accl}	9,72 \pm 0,09 ^{Aabc}	10,25 \pm 0,22 ^{Aa}	8,23 \pm 0,35 ^{Abcd}	10,17 \pm 0,40 ^{Aab}
Atividade de β-glicosidase (UA.g⁻¹)							
BRS 257	0,15 \pm 0,008 ^{Aa}	0,13 \pm 0,002 ^{Aab}	0,13 \pm 0,005 ^{Aab}	0,12 \pm 0,004 ^{Ab}	0,14 \pm 0,003 ^{Aab}	0,13 \pm 0,003 ^{Aab}	0,14 \pm 0,004 ^{Aab}
BRS 284	0,12 \pm 0,003 ^{Ba}	0,12 \pm 0,01 ^{Aa}	0,12 \pm 0,001 ^{Aa}	0,12 \pm 0,003 ^{Aa}	0,12 \pm 0,007 ^{Ba}	0,12 \pm 0,002 ^{Aa}	0,12 \pm 0,006 ^{Ba}
Isoflavonas totais							
BRS 257	6,76 \pm 0,09 ^{Aa}	6,87 \pm 0,20 ^{Aa}	6,67 \pm 0,17 ^{Aa}	6,77 \pm 0,53 ^{Aa}	6,59 \pm 0,14 ^{Aa}	6,78 \pm 0,40 ^{Aa}	6,56 \pm 0,35 ^{Aa}
BRS 284	5,62 \pm 0,30 ^{Ba}	4,66 \pm 0,21 ^{Bbc}	4,54 \pm 0,15 ^{Bbc}	5,00 \pm 0,37 ^{Bab}	4,28 \pm 0,10 ^{Bc}	4,62 \pm 0,19 ^{Bbc}	4,52 \pm 0,10 ^{Bbc}
Malonil glicosídicas totais							
BRS 257	4,55 \pm 0,03 ^{Aa}	4,40 \pm 0,12 ^{Aa}	3,99 \pm 0,08 ^{Ab}	3,46 \pm 0,26 ^{Ac}	3,03 \pm 0,07 ^{Ad}	2,91 \pm 0,18 ^{Ad}	2,48 \pm 0,19 ^{Ae}
BRS 284	3,80 \pm 0,20 ^{Ba}	3,20 \pm 0,16 ^{Bb}	2,94 \pm 0,09 ^{Bbc}	2,75 \pm 0,20 ^{Bc}	2,05 \pm 0,04 ^{Bde}	2,12 \pm 0,10 ^{Bd}	1,78 \pm 0,03 ^{Be}
β-glicosídicas totais							
BRS 257	2,02 \pm 0,09 ^{Ac}	2,23 \pm 0,09 ^{Ac}	2,44 \pm 0,09 ^{Ac}	3,02 \pm 0,25 ^{Ab}	3,22 \pm 0,07 ^{Aab}	3,44 \pm 0,22 ^{Aab}	3,60 \pm 0,18 ^{Aa}
BRS 284	1,69 \pm 0,13 ^{Bbc}	1,36 \pm 0,07 ^{Bc}	1,47 \pm 0,06 ^{Bc}	2,06 \pm 0,16 ^{Bab}	2,02 \pm 0,08 ^{Bab}	2,25 \pm 0,09 ^{Ba}	2,43 \pm 0,08 ^{Ba}
Agliconas totais							
BRS 257	0,20 \pm 0,004 ^{Ad}	0,24 \pm 0,006 ^{Accl}	0,24 \pm 0,01 ^{Accl}	0,28 \pm 0,01 ^{Ac}	0,35 \pm 0,01 ^{Ab}	0,43 \pm 0,003 ^{Aa}	0,48 \pm 0,01 ^{Aa}
BRS 284	0,13 \pm 0,002 ^{Bd}	0,11 \pm 0,02 ^{Bd}	0,13 \pm 0,01 ^{Bd}	0,20 \pm 0,02 ^{Bc}	0,21 \pm 0,003 ^{Bbc}	0,25 \pm 0,02 ^{Bb}	0,31 \pm 0,01 ^{Ba}

Valores representam média de duas determinações em cada repetição do experimento (n = 4) \pm desvio padrão.

Médias na mesma coluna, seguidas de letras maiúsculas diferentes e na linha, acompanhadas de letras minúsculas diferentes, indicam diferença significativa (p \leq 0,05) em cada parâmetro.

Teor de umidade expresso em g.100 g⁻¹; Atividade de β -glicosidase expressa em UA.g⁻¹; Teores de Isoflavonas expressos em μ mol.g⁻¹

Resultados expressos em base seca, exceto umidade.

Controle: 4 °C e 66 % UR. Envelhecimento Natural: até 18 meses, temperatura e UR ambiente (variação: 12 a 34,4 °C e 24 a 86 % UR).

Tabela 3 – Perfil de isoflavonas das sojas BRS 257 e 284 submetidas ao Envelhecimento Acelerado.

Cultivares	Controle	Tempo de Armazenamento (meses)								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
β-Glicosídicas										
Daidzina										
BRS 257	0,74 ± 0,005 ^{Aab}	0,89 ± 0,01 ^{Aa}	0,90 ± 0,19 ^{Aa}	0,93 ± 0,09 ^{Aa}	0,90 ± 0,07 ^{Aa}	0,70 ± 0,03 ^{Aab}	0,52 ± 0,01 ^{Abc}	0,34 ± 0,04 ^{Ac}	0,19 ± 0,003 ^{Ad}	0,14 ± 0,00 ^{Ad}
BRS 284	0,45 ± 0,03 ^{Ba}	0,38 ± 0,02 ^{Bab}	0,38 ± 0,03 ^{Ba}	0,42 ± 0,01 ^{Ba}	0,35 ± 0,04 ^{Bab}	0,31 ± 0,01 ^{Bab}	0,22 ± 0,006 ^{Babc}	0,13 ± 0,0003 ^{Bbc}	0,00 ^{Bc}	0,00 ^{Bc}
Glicitina										
BRS 257	0,34 ± 0,04 ^{Ba}	0,00 ^{Bb}	0,00 ^{Ab}	0,33 ± 0,05 ^{Aa}	0,00 ^{Ab}	0,00 ^{Ab}	0,00 ^{Ab}	0,00 ^{Ab}	0,00 ^{Ab}	0,00 ^{Ab}
BRS 284	0,38 ± 0,08 ^{Aa}	0,25 ± 0,03 ^{Ac}	0,00 ^{Ad}	0,32 ± 0,04 ^{Ab}	0,00 ^{Ad}	0,00 ^{Ad}	0,00 ^{Ad}	0,00 ^{Ad}	0,00 ^{Ad}	0,00 ^{Ad}
Genistina										
BRS 257	0,93 ± 0,08 ^{Ab}	1,23 ± 0,04 ^{Aa}	1,28 ± 0,04 ^{Aa}	1,21 ± 0,08 ^{Aa}	1,20 ± 0,06 ^{Aa}	0,89 ± 0,03 ^{Ab}	0,63 ± 0,03 ^{Ac}	0,40 ± 0,03 ^{Ad}	0,20 ± 0,008 ^{Ade}	0,14 ± 0,007 ^{Ae}
BRS 284	0,86 ± 0,02 ^{Aab}	0,90 ± 0,03 ^{Bab}	1,01 ± 0,05 ^{Ba}	0,97 ± 0,03 ^{Ba}	0,89 ± 0,06 ^{Bab}	0,73 ± 0,01 ^{Bb}	0,50 ± 0,01 ^{Bc}	0,31 ± 0,003 ^{Ac}	0,18 ± 0,01 ^{Ade}	0,10 ± 0,02 ^{Ae}
Malonil glicosídicas										
Malonil Daidzina										
BRS 257	1,70 ± 0,02 ^{Aa}	1,21 ± 0,02 ^{Ab}	1,02 ± 0,05 ^{Ab}	0,81 ± 0,08 ^{Ac}	0,63 ± 0,05 ^{Ac}	0,44 ± 0,06 ^{Ade}	0,35 ± 0,006 ^{Aef}	0,23 ± 0,03 ^{Afg}	0,14 ± 0,003 ^{Ag}	0,11 ± 0,01 ^{Ag}
BRS 284	0,88 ± 0,05 ^{Ba}	0,58 ± 0,03 ^{Bb}	0,42 ± 0,04 ^{Bbc}	0,34 ± 0,04 ^{Bcd}	0,28 ± 0,04 ^{Bcde}	0,21 ± 0,02 ^{Bde}	0,14 ± 0,005 ^{Bdef}	0,10 ± 0,01 ^{Bef}	0,00 ^{Bf}	0,00 ^{Bf}
Malonil Glicitina										
BRS 257	0,36 ± 0,06 ^{Ba}	0,00 ^{Bc}	0,00 ^{Ac}	0,18 ± 0,02 ^{Ab}	0,00 ^{Ac}	0,00 ^{Ac}	0,00 ^{Ac}	0,00 ^{Ac}	0,00 ^{Ac}	0,00 ^{Ac}
BRS 284	0,57 ± 0,11 ^{Aa}	0,33 ± 0,04 ^{Ab}	0,00 ^{Ad}	0,19 ± 0,02 ^{Ac}	0,00 ^{Ad}	0,00 ^{Ad}	0,00 ^{Ad}	0,00 ^{Ad}	0,00 ^{Ad}	0,00 ^{Ad}
Malonil Genistina										
BRS 257	2,48 ± 0,03 ^{Aa}	2,04 ± 0,04 ^{Ab}	1,77 ± 0,07 ^{Ac}	1,40 ± 0,08 ^{Ad}	1,16 ± 0,05 ^{Ae}	0,90 ± 0,04 ^{Af}	0,70 ± 0,02 ^{Afg}	0,53 ± 0,03 ^{Agh}	0,36 ± 0,009 ^{Ahi}	0,28 ± 0,01 ^{Ai}
BRS 284	2,35 ± 0,08 ^{Ba}	1,84 ± 0,07 ^{Bb}	1,59 ± 0,08 ^{Bc}	1,22 ± 0,02 ^{Bd}	1,03 ± 0,04 ^{Bde}	0,84 ± 0,009 ^{Aef}	0,67 ± 0,01 ^{Afg}	0,51 ± 0,005 ^{Agh}	0,36 ± 0,02 ^{Ahi}	0,22 ± 0,009 ^{Ai}
Agliconas										
Daidzeína										
BRS 257	0,08 ± 0,004 ^{Ag}	0,27 ± 0,01 ^{Afg}	0,41 ± 0,01 ^{Afg}	0,66 ± 0,02 ^{Aef}	0,94 ± 0,12 ^{Ade}	1,21 ± 0,07 ^{Ac}	1,57 ± 0,10 ^{Abc}	1,71 ± 0,13 ^{Aab}	1,97 ± 0,03 ^{Aab}	2,05 ± 0,24 ^{Aa}
BRS 284	0,00 ^{Ad}	0,11 ± 0,01 ^{Ac}	0,18 ± 0,01 ^{Ac}	0,31 ± 0,02 ^{Bbcd}	0,39 ± 0,09 ^{Bbcd}	0,56 ± 0,03 ^{Babc}	0,71 ± 0,03 ^{Bab}	0,74 ± 0,02 ^{Bab}	0,91 ± 0,06 ^{Ba}	0,94 ± 0,08 ^{Ba}
Gliciteína										
BRS 257	0,00 ^{Ab}	0,00 ^{Ab}	0,00 ^{Ab}	0,08 ± 0,01 ^{Ab}	0,08 ± 0,03 ^{Ab}	0,15 ± 0,06 ^{Ab}	0,12 ± 0,007 ^{Ab}	0,15 ± 0,03 ^{Ab}	0,46 ± 0,21 ^{Aa}	0,38 ± 0,09 ^{Aa}
BRS 284	0,00 ^{Ad}	0,00 ^{Ad}	0,00 ^{Ad}	0,05 ± 0,02 ^{Ac}	0,00 ^{Ad}	0,14 ± 0,03 ^{Ac}	0,19 ± 0,03 ^{Ac}	0,21 ± 0,06 ^{Abc}	0,41 ± 0,07 ^{Aa}	0,40 ± 0,05 ^{Aab}
Genisteína										
BRS 257	0,12 ± 0,002 ^{Af}	0,30 ± 0,01 ^{Aef}	0,49 ± 0,01 ^{Aef}	0,84 ± 0,01 ^{Ade}	1,15 ± 0,22 ^{Ac}	1,63 ± 0,05 ^{Abc}	2,10 ± 0,06 ^{Aab}	2,37 ± 0,09 ^{Aa}	2,48 ± 0,05 ^{Aa}	2,65 ± 0,12 ^{Aa}
BRS 284	0,13 ± 0,002 ^{Ae}	0,19 ± 0,009 ^{Ae}	0,40 ± 0,01 ^{Ae}	0,68 ± 0,02 ^{Ade}	1,08 ± 0,02 ^{Ac}	1,43 ± 0,04 ^{Abc}	1,91 ± 0,02 ^{Aab}	2,01 ± 0,05 ^{Ba}	2,23 ± 0,02 ^{Aa}	2,38 ± 0,11 ^{Ba}

Valores representam média de duas determinações em cada repetição do experimento (n = 4) ± desvio padrão.

Médias na mesma coluna, seguidas de letras maiúsculas diferentes e na linha, acompanhadas de letras minúsculas diferentes, indicam diferença significativa (p ≤ 0,05) em cada parâmetro. Teores de Isoflavonas expressos em μmol.g⁻¹. Resultados expressos em base seca. Controle: 4 °C e 66 % UR.

Envelhecimento Acelerado: até 9 meses, 30 °C e 78 ± 2 % UR.

Tabela 4 – Perfil de isoflavonas das sojas BRS 257 e 284 submetidas ao Envelhecimento Natural.

Cultivares	Tempo de Armazenamento (meses)						
	Controle	3	6	9	12	15	18
β-Glicosídicas							
Daidzina							
BRS 257	0,74 \pm 0,005 ^{Ae}	0,80 \pm 0,03 ^{Ade}	0,89 \pm 0,01 ^{Ad}	1,15 \pm 0,10 ^{Ac}	1,22 \pm 0,04 ^{Abc}	1,28 \pm 0,07 ^{Aab}	1,38 \pm 0,05 ^{Aa}
BRS 284	0,45 \pm 0,03 ^{Bbc}	0,35 \pm 0,02 ^{Bc}	0,39 \pm 0,009 ^{Bc}	0,52 \pm 0,04 ^{Bab}	0,50 \pm 0,02 ^{Bab}	0,57 \pm 0,03 ^{Ba}	0,61 \pm 0,02 ^{Ba}
Glicitina							
BRS 257	0,34 \pm 0,04 ^{Aa}	0,38 \pm 0,03 ^{Aa}	0,38 \pm 0,06 ^{Aa}	0,40 \pm 0,07 ^{Aa}	0,35 \pm 0,04 ^{Aa}	0,45 \pm 0,06 ^{Aa}	0,39 \pm 0,12 ^{Aa}
BRS 284	0,38 \pm 0,08 ^{Aa}	0,31 \pm 0,04 ^{Aa}	0,29 \pm 0,06 ^{Aa}	0,45 \pm 0,07 ^{Aa}	0,27 \pm 0,06 ^{Aa}	0,40 \pm 0,08 ^{Aa}	0,38 \pm 0,03 ^{Aa}
Genistina							
BRS 257	0,93 \pm 0,08 ^{Af}	1,05 \pm 0,06 ^{Ae}	1,16 \pm 0,02 ^{Ad}	1,48 \pm 0,09 ^{Ac}	1,64 \pm 0,03 ^{Ab}	1,71 \pm 0,09 ^{Ab}	1,83 \pm 0,03 ^{Aa}
BRS 284	0,86 \pm 0,02 ^{Bd}	0,70 \pm 0,03 ^{Be}	0,79 \pm 0,02 ^{Bde}	1,09 \pm 0,06 ^{Bc}	1,24 \pm 0,02 ^{Bb}	1,28 \pm 0,07 ^{Bb}	1,44 \pm 0,02 ^{Ba}
Malonil glicosídicas							
Malonil Daidzina							
BRS 257	1,70 \pm 0,02 ^{Aa}	1,55 \pm 0,05 ^{Ab}	1,42 \pm 0,02 ^{Ac}	1,21 \pm 0,11 ^{Ad}	1,03 \pm 0,04 ^{Ae}	0,98 \pm 0,06 ^{Ae}	0,86 \pm 0,04 ^{Af}
BRS 284	0,88 \pm 0,05 ^{Ba}	0,73 \pm 0,04 ^{Bb}	0,66 \pm 0,02 ^{Bbc}	0,60 \pm 0,05 ^{Bc}	0,46 \pm 0,02 ^{Bd}	0,46 \pm 0,02 ^{Bd}	0,34 \pm 0,07 ^{Be}
Malonil Glicitina							
BRS 257	0,36 \pm 0,06 ^{Ba}	0,50 \pm 0,04 ^{Aa}	0,44 \pm 0,06 ^{Aa}	0,40 \pm 0,05 ^{Aa}	0,30 \pm 0,04 ^{Aa}	0,34 \pm 0,04 ^{Aa}	0,26 \pm 0,11 ^{Aa}
BRS 284	0,57 \pm 0,11 ^{Aa}	0,47 \pm 0,05 ^{Aab}	0,44 \pm 0,03 ^{Aabc}	0,46 \pm 0,08 ^{Aabc}	0,17 \pm 0,01 ^{Ac}	0,34 \pm 0,07 ^{Aabc}	0,24 \pm 0,05 ^{Abc}
Malonil Genistina							
BRS 257	2,48 \pm 0,03 ^{Aa}	2,35 \pm 0,05 ^{Ab}	2,12 \pm 0,02 ^{Ac}	1,85 \pm 0,12 ^{Ad}	1,70 \pm 0,01 ^{Ae}	1,58 \pm 0,09 ^{Af}	1,42 \pm 0,02 ^{Ag}
BRS 284	2,35 \pm 0,08 ^{Ba}	1,99 \pm 0,09 ^{Bb}	1,84 \pm 0,05 ^{Bc}	1,69 \pm 0,09 ^{Bd}	1,43 \pm 0,04 ^{Be}	1,32 \pm 0,05 ^{Bf}	1,19 \pm 0,01 ^{Bg}
Agliconas							
Daidzeína							
BRS 257	0,08 \pm 0,004 ^{Ad}	0,10 \pm 0,004 ^{Ad}	0,11 \pm 0,01 ^{Ad}	0,13 \pm 0,009 ^{Acd}	0,17 \pm 0,01 ^{Abc}	0,21 \pm 0,006 ^{Aab}	0,23 \pm 0,02 ^{Aa}
BRS 284	0,00 ^{Bc}	0,03 \pm 0,008 ^{Bbc}	0,05 \pm 0,01 ^{Bbc}	0,09 \pm 0,02 ^{Bab}	0,07 \pm 0,003 ^{Bab}	0,08 \pm 0,02 ^{Bab}	0,11 \pm 0,01 ^{Ba}
Genisteína							
BRS 257	0,12 \pm 0,002 ^{Bf}	0,13 \pm 0,001 ^{Ae}	0,13 \pm 0,003 ^{Ae}	0,15 \pm 0,005 ^{Ad}	0,18 \pm 0,006 ^{Ac}	0,22 \pm 0,008 ^{Ab}	0,24 \pm 0,005 ^{Aa}
BRS 284	0,13 \pm 0,002 ^{Ac}	0,08 \pm 0,001 ^{Be}	0,08 \pm 0,004 ^{Be}	0,11 \pm 0,003 ^{Bd}	0,13 \pm 0,003 ^{Bc}	0,16 \pm 0,007 ^{Bd}	0,20 \pm 0,001 ^{Ba}

Valores representam média de duas determinações em cada repetição do experimento (n = 4) \pm desvio padrão.

Médias na mesma coluna, seguidas de letras maiúsculas diferentes e na linha, acompanhadas de letras minúsculas diferentes, indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) em cada parâmetro.

Teores de Isoflavonas expressos em $\mu\text{mol.g}^{-1}$

Resultados expressos em base seca.

Controle: 4 °C e 66 % UR. Envelhecimento Natural: até 18 meses, temperatura e UR ambiente (variação: 12 a 34,4 °C e 24 a 86 % UR)

Tabela 5 – Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante por DPPH[•], FRAP e ABTS^{•+} das sojas BRS 257 e BRS 284 submetidas ao Envelhecimento Acelerado ou Natural.

Envelhecimento Acelerado (EA)											
Cultivares	Tempo de Armazenamento (meses)										
	Controle	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Compostos Fenólicos Totais (mg EAG.g⁻¹)											
BRS 257	2,86 ± 0,15 ^{Ab}	3,02 ± 0,09 ^{Aab}	3,04 ± 0,10 ^{Aab}	3,10 ± 0,11 ^{Aab}	3,18 ± 0,04 ^{Aab}	3,09 ± 0,23 ^{Aab}	3,37 ± 0,04 ^{Aab}	3,37 ± 0,11 ^{Aab}	3,14 ± 0,23 ^{Aab}	3,42 ± 0,10 ^{Aa}	
BRS 284	2,61 ± 0,15 ^{Aa}	2,70 ± 0,09 ^{Ba}	2,63 ± 0,04 ^{Ba}	2,68 ± 0,10 ^{Ba}	2,80 ± 0,05 ^{Ba}	2,84 ± 0,07 ^{Aa}	2,84 ± 0,08 ^{Ba}	2,99 ± 0,09 ^{Ba}	3,10 ± 0,13 ^{Aa}	3,12 ± 0,04 ^{Ba}	
FRAP (µMol Equivalentes de Trolox.g⁻¹)											
BRS 257	8,44 ± 0,29 ^{Acd}	8,23 ± 0,59 ^{Acd}	8,15 ± 0,75 ^{Ad}	8,90 ± 0,17 ^{Acd}	8,60 ± 0,13 ^{Acd}	8,77 ± 0,51 ^{Acd}	9,33 ± 0,66 ^{Abcd}	10,28 ± 0,47 ^{Aabc}	11,84 ± 0,71 ^{Aa}	11,42 ± 0,51 ^{Aab}	
BRS 284	7,93 ± 0,46 ^{Ab}	8,01 ± 0,28 ^{Ab}	7,68 ± 0,37 ^{Ab}	7,37 ± 0,66 ^{Bb}	7,57 ± 0,32 ^{Bb}	7,72 ± 0,84 ^{Bb}	7,53 ± 0,43 ^{Bb}	8,20 ± 0,76 ^{Bb}	9,16 ± 0,79 ^{Bab}	10,53 ± 0,37 ^{Aa}	
ABTS^{•+} (µMol Equivalentes de Trolox.g⁻¹)											
BRS 257	40,47 ± 2,79 ^{Aa}	43,67 ± 3,53 ^{Aa}	40,79 ± 2,76 ^{Aa}	45,26 ± 1,90 ^{Aa}	44,26 ± 0,99 ^{Aa}	45,25 ± 4,46 ^{Aa}	49,89 ± 1,26 ^{Aa}	50,91 ± 1,63 ^{Aa}	49,35 ± 2,99 ^{Aa}	46,48 ± 3,73 ^{Aa}	
BRS 284	32,96 ± 4,03 ^{Aa}	35,91 ± 2,09 ^{Aa}	33,46 ± 1,65 ^{Aa}	35,10 ± 1,82 ^{Ba}	31,61 ± 2,37 ^{Ba}	34,40 ± 3,73 ^{Ba}	34,45 ± 3,98 ^{Ba}	34,49 ± 2,18 ^{Ba}	40,02 ± 1,01 ^{Aa}	36,77 ± 1,94 ^{Aa}	
DPPH (µMol Equivalentes de Trolox.g⁻¹)											
BRS 257	4,73 ± 0,32 ^{Aa}	4,49 ± 0,28 ^{Ba}	4,37 ± 0,24 ^{Ba}	4,84 ± 0,05 ^{Aa}	4,56 ± 0,12 ^{Aa}	4,77 ± 0,49 ^{Aa}	4,67 ± 0,26 ^{Aa}	5,12 ± 0,29 ^{Aa}	5,16 ± 0,28 ^{Aa}	5,45 ± 0,37 ^{Aa}	
BRS 284	5,32 ± 0,21 ^{Aa}	5,48 ± 0,37 ^{Aa}	5,35 ± 0,34 ^{Aa}	5,12 ± 0,23 ^{Aa}	4,98 ± 0,27 ^{Aa}	5,26 ± 0,10 ^{Aa}	5,00 ± 0,18 ^{Aa}	5,28 ± 0,27 ^{Aa}	5,67 ± 0,22 ^{Aa}	5,47 ± 0,29 ^{Aa}	
Envelhecimento Natural (EN)											
Cultivares	Tempo de Armazenamento (meses)										
	Controle	3	6	9	12	15	18				
Compostos Fenólicos Totais (mg EAG.g⁻¹)											
BRS 257	2,86 ± 0,15 ^{Aa}	2,75 ± 0,12 ^{Aa}	3,05 ± 0,05 ^{Aa}	3,00 ± 0,14 ^{Aa}	2,94 ± 0,18 ^{Aa}	2,91 ± 0,10 ^{Aa}	3,05 ± 0,06 ^{Aa}				
BRS 284	2,61 ± 0,15 ^{Ba}	2,69 ± 0,04 ^{Aa}	2,56 ± 0,10 ^{Ba}	2,68 ± 0,12 ^{Ba}	2,73 ± 0,05 ^{Ba}	2,75 ± 0,07 ^{Aa}	2,68 ± 0,09 ^{Ba}				
FRAP (µMol Equivalentes de Trolox.g⁻¹)											
BRS 257	8,44 ± 0,29 ^{Aa}	7,84 ± 0,54 ^{Aa}	8,33 ± 0,12 ^{Aa}	8,09 ± 0,61 ^{Aa}	8,23 ± 0,52 ^{Aa}	8,15 ± 0,65 ^{Aa}	8,20 ± 0,73 ^{Aa}				
BRS 284	7,93 ± 0,46 ^{Aa}	8,16 ± 0,38 ^{Aa}	8,48 ± 0,20 ^{Aa}	8,44 ± 0,56 ^{Aa}	8,09 ± 0,28 ^{Aa}	7,74 ± 0,55 ^{Aa}	7,96 ± 0,57 ^{Aa}				
ABTS^{•+} (µMol Equivalentes de Trolox.g⁻¹)											
BRS 257	40,47 ± 2,79 ^{Aa}	41,14 ± 3,01 ^{Aa}	42,84 ± 1,34 ^{Aa}	44,40 ± 2,96 ^{Aa}	44,98 ± 4,49 ^{Aa}	44,16 ± 2,86 ^{Aa}	45,36 ± 1,56 ^{Aa}				
BRS 284	32,96 ± 4,03 ^{Ba}	31,10 ± 1,75 ^{Ba}	33,74 ± 2,13 ^{Ba}	34,46 ± 2,99 ^{Ba}	32,81 ± 3,12 ^{Ba}	35,68 ± 4,55 ^{Ba}	31,57 ± 3,50 ^{Ba}				
DPPH (µMol Equivalentes de Trolox.g⁻¹)											
BRS 257	4,73 ± 0,32 ^{Ba}	4,62 ± 0,28 ^{Ba}	4,56 ± 0,29 ^{Ba}	4,80 ± 0,12 ^{Ba}	4,54 ± 0,39 ^{Ba}	4,84 ± 0,07 ^{Ba}	4,82 ± 0,18 ^{Ba}				
BRS 284	5,32 ± 0,21 ^{Aa}	5,53 ± 0,17 ^{Aa}	5,91 ± 0,26 ^{Aa}	5,77 ± 0,37 ^{Aa}	6,01 ± 0,17 ^{Aa}	5,69 ± 0,13 ^{Aa}	5,84 ± 0,34 ^{Aa}				

Valores representam média de duas determinações em cada repetição do experimento (n = 4) ± desvio padrão.

Médias na mesma coluna, seguidas de letras maiúsculas diferentes e na linha, acompanhadas de letras minúsculas diferentes, indicam diferença significativa (p ≤ 0,05) em cada parâmetro.

Compostos fenólicos totais expressos em mg EAG.g⁻¹; Resultados das análises de FRAP, ABTS e DPPH expressos em µMol de Equivalentes de Trolox.g⁻¹.

Resultados expressos em base seca.

Controle: 4 °C e 66 % UR. Envelhecimento Acelerado: até 9 meses, 30 °C e 78 ± 2 % UR. Envelhecimento Natural: até 18 meses, temperatura e UR ambiente (variação: 12 a 34,4 °C e 24 a 86 % UR).

6.2 ARTIGO CIENTÍFICO II

Oxidação lipídica e alterações nos carboidratos no envelhecimento em cultivares de soja com e livre de lipoxigenases.

Artigo redigido para submissão conforme normas do periódico científico *Food Chemistry*.

Oxidação lipídica e alterações nos carboidratos no envelhecimento em cultivares de soja com e livre de lipoxigenases.

Resumo:

Avaliaram-se as alterações nas concentrações de malonaldeído e hexanal, a atividade das enzimas lipoxigenases e α -galactosidase e o conteúdo de carboidratos em duas cultivares de soja, com e sem as enzimas lipoxigenases, durante envelhecimento natural (até 18 meses, temperatura e umidade relativa ambientes) e acelerado (até 9 meses, 30 °C e 78 % umidade relativa). Um controle foi mantido a 4 °C e 60 % umidade relativa. O envelhecimento acelerado resultou em aumento de hexanal nos grãos de ambas as cultivares e redução da atividade de lipoxigenases na soja convencional. As duas condições de envelhecimento não ocasionaram, no geral, alteração nos teores de malonaldeído, porém reduziram a atividade da α -galactosidase e o conteúdo de oligossacarídeos e aumentaram os monossacarídeos em ambas as cultivares. A ausência das lipoxigenases não protegeu os grãos da cultivar BRS 257 do envelhecimento.

Palavras-chave: Oligossacarídeos, Rafinose, Estaquiase, Hexanal, Malonaldeído, Cor.

1. Introdução

A soja é uma importante *commodity* no mercado mundial, representando uma substancial parcela das exportações de grãos dos Estados Unidos, Brasil e Argentina (USDA, 2017). Isso deve-se, em parte, à sua composição química, pois o grão contém, em média, 20 % de lipídeos, 40 % de proteínas e 35 % de carboidratos, o que permite que a soja tenha uma infinidade de possíveis usos. Os principais carboidratos solúveis nos grãos são o dissacarídeo sacarose e os oligossacarídeos estaquiase e rafinose. Como os seres humanos não possuem em seu trato digestivo

a enzima α -galactosidase (EC 3.2.1.22), que hidrolisa as ligações $\alpha(1,6)$ galactosídicas, os oligossacarídeos intactos não são absorvidos. Assim, estes açúcares são fermentados por microrganismos anaeróbios no intestino grosso conduzindo à flatulência e desconforto aos consumidores. Portanto, a redução destes oligossacarídeos é desejável para aumentar a aceitabilidade da soja e seus derivados (Liu, 1997; Viana et al., 2005, Wang, Chen & Zhang, 2014; Karr-Lilienthal, Kadzere, Grieshop & Fahey Jr, 2005) e também comercialização, uma vez que aumentaria o consumo.

A soja contém a enzima lipoxigenase (EC 1.13.11.12) em três isoformas, denominadas de L1, L2 e L3, que catalisam a hidroperoxidação de ácidos graxos poliinsaturados que contenham uma ligação *cis*, *cis*-1,4-pentadieno conjugada (principalmente o ácido linoleico), gerando compostos voláteis que conferem aroma e sabor indesejável (*beany flavor*) à soja, dos quais o principal é o aldeído hexanal (Matoba, Hidaka, Narita, Kitamura, Kaizuma & Kito, 1985).

Durante transporte ou armazenamento por tempo prolongado, a soja passa por uma série de reações bioquímicas que resultam na deterioração dos grãos e modificação de sua composição química, sendo o conjunto destas reações denominado de envelhecimento. A hipótese mais aceita para o início do processo de envelhecimento dos grãos é que ocorrem reações de hidrólise e oxidação de lipídeos, especialmente dos lipídeos de membrana, cujos produtos conduzem ao aumento da acidez dos grãos e geram radicais livres e peróxidos, que danificam as células, resultando na sua descompartimentalização e conseqüente desorganização do metabolismo. Além disso, e possivelmente ao mesmo tempo, os produtos de hidrólise e oxidação de lipídeos causam danos ao DNA e alterações nas moléculas de proteínas (que se tornam menos solúveis), nas atividades de diversas enzimas e nos teores de açúcares livres, solúveis e redutores (Bailly, 2004; Marcos-Filho, 1999; Sung & Chiu, 1995; Narayan, Chauhan & Verma, 1988; Hou & Chang, 2004; Kamizake, Varéa & Prudencio, 2014; Sharma, Kaur, Bansal & Gill, 2013). Alguns autores observaram que, no envelhecimento acelerado ou natural da soja há um aumento no conteúdo de

compostos secundários de oxidação lipídica nos grãos, como o malonaldeído e o hexanal (Sharma et al., 2013; Sung et al., 1995; Tian, Song & Lei, 2008; Braccini, Reis, Moreira, Sedyama & Scapim, 2000).

É possível que as lipoxigenases participem do processo de envelhecimento dos grãos por catalisarem a hidroperoxidação de ácidos graxos insaturados. Entretanto, este envolvimento ainda não está esclarecido, uma vez que apenas Lambrecht, Nielsen, Liska e Nielsen (1996) relataram uma maior resistência ao envelhecimento quando a soja é isenta de pelo menos duas isoformas de lipoxigenases. Enquanto que, em outros estudos não foi observado o mesmo resultado, tendo sido notada, inclusive, redução na atividade da enzima (Sung et al., 1995; Wang, Fujimoto, Miyazawa, Endo & Kitamura, 1990).

Sendo assim, os objetivos deste estudo foram comparar grãos de duas cultivares de soja (uma com e outra livre de lipoxigenases L1, L2 e L3) quanto aos produtos da oxidação lipídica (acidez, malonaldeído e hexanal), além de avaliar o papel das lipoxigenases, alterações nos carboidratos e a atividade da enzima α -galactosidase durante envelhecimento acelerado e natural.

2. Material e Métodos

2.1 Material

Neste estudo foram utilizados grãos de duas cultivares de soja para consumo humano: a BRS 284 (convencional, hilo marrom claro e casca amarelo claro) e a BRS 257 (isenta de lipoxigenases L1, L2 e L3; hilo marrom claro, casca amarelo claro) (Embrapa Soja, 2013). As cultivares foram cultivadas na região de Mauá da Serra, norte do estado do Paraná, Brasil, na safra de 2013/2014. Os padrões de carboidratos (glicose, galactose, frutose, sacarose, rafinose e estaquiase) e hexanal foram adquiridos da Sigma Aldrich (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO,

USA). Todos os reagentes utilizados na quantificação dos açúcares por cromatografia de troca iônica foram de grau cromatográfico. Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

2.2 Armazenamento dos grãos de soja

Após a colheita, os grãos de soja foram selecionados a fim de retirar materiais estranhos, sujidades e grãos quebrados. Os grãos selecionados de cada cultivar foram submetidos a dois experimentos de envelhecimento: envelhecimento acelerado (EA) em estufa (FREEZETEC, modelo D1004, Brasil) a 30 °C e 78 ± 2 % de umidade relativa (UR) (obtida por solução de cloreto de potássio saturada) por até nove meses e envelhecimento natural (EN) em condições ambientais, sem controle de temperatura e UR, por até 18 meses (Hou & Chang, 2002; Kamizake, Yamashita & Prudencio, 2014). A temperatura e a UR do EN foram monitoradas diariamente empregando-se um termo-higrômetro (INCOTERM, Modelo 7666.02.0.00, Brasil). A média no período foi de 23,9 °C e 62,7 % UR, sendo a máxima de 34,4 °C e 86 % UR e a mínima de 12 °C e 24 % UR. Um controle foi mantido a 4 °C e 60 % UR. As amostras de soja das condições EA e EN foram tomadas em intervalos de três e seis meses, respectivamente, e armazenadas nas mesmas condições do controle até a realização das análises. Os grãos foram moídos em moinho analítico (Ika A11, Ika Works, Inc., Wilmington, NC, USA) e peneirados em peneira de 60 mesh imediatamente antes das análises.

2.3 Medida do pH dos grãos

O pH da amostra (5 g) homogeneizada em 50 mL de água destilada foi medido em potenciômetro digital (Five Easy FE20, Mettler Toledo AG Analytical, Schwerzenbach, Switzerland).

2.4 Determinação das lipoxigenases

A atividade das enzimas foi determinada conforme Silva, Carrão-Panizzi e Prudencio (2009). Em tubo de centrifuga, 200 mg da amostra e 6 mL de tampão Tris pH 8,2 (Tris 0,06 mol.L⁻¹, CaCl₂ 0,015 mol.L⁻¹, e sacarose 13 %) foram homogeneizados em vórtex por 30 segundos a 4 °C. Após a centrifugação a 3000 g por 15 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi coletado e mantido a 4 °C em banho de gelo durante a análise.

Após o preparo, a solução estoque de linoleato de sódio (70 mg de ácido linoleico, 70 mg de Tween 20 e 4 mL de água ultrapura sem oxigênio obtida por banho de ultrassom durante 20 minutos) foi clareada com NaOH 0,1 mol.L⁻¹, e transferida para um balão volumétrico de 25 mL, completando-se o volume com água ultrapura livre de oxigênio. A atividade das enzimas lipoxigenases foi determinada em espectrofotômetro (Biochrom Libra S22, Cambridge, England) misturando-se, em cubeta de quartzo, 1 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6), 50 µL da solução estoque e 25 µL do extrato enzimático. A leitura da absorbância foi feita a 234 nm a cada 1 minuto por 4 minutos. O branco consistiu de substrato e tampão nas mesmas proporções usadas para a amostra. A atividade das enzimas foi expressa em µmol de hidroperóxido de ácido linolênico por minuto, por mg de proteína solúvel (µmol. min⁻¹. mg proteína⁻¹) de acordo com a equação 1 (da Silva et al., 2001):

$$\text{Atividade das Lipoxigenases} = (\Delta A_{234} / \epsilon.l.t) / CP \quad (1)$$

Onde: ΔA_{234} corresponde à diferença entre a absorbância final a 234 nm em 4 minutos e a absorbância a 234 nm no tempo zero, $\epsilon = 25000 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ (absortividade molar dos hidroperóxidos do ácido linoleico a 234 nm), $l = 1,0 \text{ cm}$ (caminho óptico), $t = 4 \text{ minutos}$ e $CP =$ concentração de proteína na amostra (mg. mL⁻¹), obtida pelo método de Lowry et al. (1951).

2.5 Avaliação da oxidação de lipídeos

2.5.1 Determinação do Teor de hexanal

O teor do composto volátil hexanal foi determinado conforme Silva et al. (2009). Para a extração do hexanal, 1 g da amostra e 10 mL de água ultrapura foram transferidos para *headspace vials* de 20 mL. Os vials foram lacrados em uma recravadeira, agitados e mantidos em banho-maria a 98 °C por 30 minutos. Para a quantificação do hexanal, 0,5 mL do headspace foi coletado com uma seringa do tipo *gastight* (1001 RN SYR, Hamilton Company) e injetado manualmente em cromatógrafo gasoso (Shimadzu modelo 17 A Gas Chromatograph) equipado com coluna capilar de sílica (100 m x 0,25 mm x 0,2 µm; SP 2560, Supleco, Sigma-Aldrich, USA). A temperatura inicial da coluna foi de 45 °C durante 5 minutos, aumentando-se 3 °C por minuto até 110 °C, esta temperatura foi mantida por 1 minuto e, a seguir, aumentada à taxa de 3 °C por minuto, para 240 °C. A temperatura do injetor foi mantida a 200 °C. Foi utilizado um detector de ionização de chamas com temperatura de 240 °C. A vazão do gás de arraste (hidrogênio ultrapuro) foi de 2 mL por minuto. A quantificação foi feita por padronização externa (área dos picos) empregando-se o padrão hexanal (Sigma-Aldrich Co., 98 %) nas concentrações de 2,39 a 34,29 nmol.mL⁻¹. Os resultados foram expressos em nmol de hexanal por g⁻¹ de amostra, em base seca.

2.5.2 Determinação do teor de malonaldeído

O teor de malonaldeído, produto da peroxidação lipídica, foi determinado conforme Sharma et al. (2013). Foi homogeneizado 1 g da amostra em 5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 5 %, em vórtex por 1 minuto, em seguida o homogeneizado foi centrifugado a 3200 g por 25 minutos (Centrifuga 5804R, Eppendorf, Hamburg, Germany). A uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante foram adicionados 4 mL do reagente TBA-TCA (ácido tiobarbitúrico 0,5

% em ácido tricloroacético 20 %). A mistura foi incubada a 95 °C por 30 minutos, e a seguir resfriada e centrifugada a 5000 g por 10 minutos. A absorbância do sobrenadante foi lida em espectrofotômetro (Biochrom Libra S22, Cambridge, England) a 532 nm e corrigida pela turbidez não específica da absorbância a 600 nm. O conteúdo de malonaldeído foi calculado através da absorvidade molar do malonaldeído ($\epsilon = 155000$). Os resultados foram expressos em nmol de hexanal por grama de amostra em base seca (nmol.g^{-1}).

2.6 Medida da atividade da α -galactosidase

A enzima α -galactosidase foi extraída de acordo com Carrão-Panizzi e Bordignon (2000). Homogeneizaram-se 0,2 g da amostra em 6 mL de tampão citrato $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$, contendo NaCl $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH 4,5), agitando-se em intervalos de 15 minutos em vórtex por uma hora a temperatura ambiente. A seguir, o homogeneizado foi centrifugado a 4 °C, 3215 g por 20 minutos (Centrifuga 5804R, Eppendorf, Hamburg, Germany) e o sobrenadante foi filtrado (Millex-GV, PVDF hydrophilic membrane, 0.45 μm , Millipore, Billerica, MA, USA) obtendo-se o extrato para a determinação da atividade da enzima.

O substrato cromogênico *p*-nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo (*p*-NPGal) foi empregado para determinação da atividade da α -galactosidase, conforme descrito por Baú, Garcia e Ida (2015). A solução do substrato *p*-NPGal (1 mmol.L^{-1}), e 0,2 mL dos extratos enzimáticos das amostras foram pré incubados, separadamente, em banho-maria a 37 °C, por 10 minutos antes da análise. A seguir, 0,8 mL do substrato foi adicionado ao tubo das amostras, mantendo-se por 15 minutos em banho-maria a 37 °C. A reação foi interrompida pela adição de 1 mL de carbonato de sódio $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$, e a seguir a absorbância do produto da reação (*p*-nitrofenol ou *p*-NP) foi lida a 400 nm em espectrofotômetro (Biochrom Libra S22, Cambridge, England). A curva padrão consistiu de *p*-NP nas concentrações de 8 a 64 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Uma unidade de atividade da enzima (UA)

foi definida como a quantidade de μmol de p-NP liberada em 1 minuto nas condições do ensaio. Os resultados foram expressos em UA.g^{-1} de amostra em base seca.

2.7 Extração e quantificação dos açúcares por HPAEC

Para a extração dos açúcares, 0,2 g da amostra (desengordurada com hexano 1:10 m/v) foi homogeneizada em 8 mL de etanol 80 %, em tubo falcon por uma hora em mesa agitadora orbital a 305 rpm. As amostras foram centrifugadas (Centrifuga 5804R, Eppendorf, Hamburg, Germany) a 4500 g, (4 °C), por 15 minutos. Para determinação de açúcares, conforme Baú et al. (2015), 0,5 mL do sobrenadante foi transferido para tubo de Eppendorf de 2 mL, que foi seco em *speed vacuum*. As amostras secas foram ressuspensas em água ultra-pura e filtradas em filtro (Millex-GV, PVDF hydrophilic membrane, 0.22 μm , Millipore, Billerica, MA, USA) e a quantificação dos açúcares foi feita por cromatografia de troca aniônica de alta performance (HPAEC) (Thermo Scientific ICS 5000, Dionex Canada Ltda, Oakville, Canada), com detector amperométrico (PAD), eletrodo de AgCl, célula amperométrica de ouro e auto injetor de amostras. Foi usada uma pré-coluna CarboPac[®] PA1 (DIONEX 50 mm x 4 mm), e a coluna CarboPac[®] PA1 (DIONEX 250 mm x 4 mm e tamanho de partícula de 10 μM), adotando-se sistema isocrático (90 % da fase móvel A e 10 % da fase móvel B), sendo a fase móvel A, água ultra-pura e a fase móvel B, uma solução de NaOH a 200 mmol.L^{-1} na vazão de 1 mL por minuto⁻¹ a 25 °C. O volume de injeção foi de 10 μL .

Os açúcares foram identificados pelos seus respectivos tempos de retenção, utilizando-se como referência os padrões de galactose, glicose, frutose, sacarose, rafinose e estaquiose. A quantificação foi feita por padronização externa (área dos picos das curvas dos padrões). Os cromatogramas foram analisados por meio do software Chromeleon 6.8 (Dionex

Corporation, Canada). O conteúdo de cada açúcar foi expresso em g por 100 g de amostra, em base seca ($\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$).

2.8 Análise de cor

A cor dos grãos inteiros foi determinada em colorímetro (Konica Minolta, CR 400/410, Japan), iluminante CIE-D 65 e geometria 45/0. Os parâmetros L^* , a^* e b^* foram obtidos diretamente do colorímetro. A tonalidade cromática (h°) foi calculada segundo a equação 2.

$$h^\circ = \arctan (b^*/a^*) \quad (2)$$

2.9 Delineamento experimental e análise estatística

Cada experimento de envelhecimento (EA ou EN) seguiu um delineamento experimental inteiramente casualizado, com duas repetições. O esquema de tratamentos foi em parcelas subdivididas, onde o tratamento principal foi o tempo de armazenamento, e as cultivares o secundário. Em cada repetição do experimento as análises físico-químicas foram feitas em duplicata ($n = 4$) e para a cor foram feitas 15 medidas ($n = 30$). Os dados foram submetidos à ANOVA e teste de comparação de médias de Tukey. O nível de significância foi de 5 %. O programa Sisvar 5.6 foi empregado para as análises (Ferreira, 2014).

3. Resultados e Discussão

3.1 pH dos grãos

Quanto ao controle, a cultivar BRS 257 tinha pH maior do que a BRS 284, porém nos demais tempos de EA não houve diferença entre as cultivares. O pH reduziu 9,95 e

11,85 % para a BRS 284 e a BRS 257, respectivamente, em nove meses de EA (Tabela 1). No EN a redução foi menos acentuada e correspondeu a aproximadamente 2,5 % para ambas as cultivares em 18 meses de armazenamento. A BRS 257 teve maior pH que a BRS 284 em todos os tempos do EN (Tabela 2).

A redução no pH, ou aumento da acidez dos grãos é um dos parâmetros indicativos de ocorrência de envelhecimento. A acidez tem sido associada a compostos originados de reações de hidrólise de lipídeos neutros a ácidos graxos livres, ou também de reações de oxidação de lipídeos e fosfolipídeos que ocorrem durante o envelhecimento dos grãos (Kong et al., 2008; Lambrecht et al., 1996; Sharma et al., 2013; Kamizake, Varéa, et al., 2014, Castilho, 2016). Segundo Kong et al. (2008), quanto maior for a temperatura e umidade relativa a que os grãos forem submetidos, maior será a redução no pH, o que explica a diferença observada no pH dos tempos finais do EA e do EN (Tabelas 1 e 2).

3.2 Oxidação lipídica e atividade das lipoxigenases

No EA das duas cultivares de soja não foram observadas diferenças quanto ao conteúdo de malonaldeído, exceto no nono mês, em que foi maior na BRS 284 (Tabela 1). As cultivares tiveram comportamento distinto ao longo do EA, na BRS 284 o conteúdo de malonaldeído não alterou, enquanto que na BRS 257 houve redução de 21,71 % no nono mês, em relação ao controle. No controle do experimento do EN, a BRS 257 continha mais malonaldeído do que a BRS 284 (Tabela 2). Entretanto, ao final do EN (18° mês), a BRS 284 passou a apresentar maior teor do composto do que a BRS 257. Na BRS 284, notou-se aumento de 8,11 % de malonaldeído no mês 6 e então os valores voltaram a não diferir do controle nos demais meses de EN. Quanto à BRS 257, observou-se redução de 4,8 % no conteúdo de malonaldeído no tempo final (18 meses) (Tabela 2).

O aumento do malonaldeído tem sido observado (Sharma et al., 2013; Tian et al., 2008, Sung, 1996) e relatado como produto secundário da reação de oxidação do ácido linolênico nos grãos de soja durante o armazenamento (Stewart & Bewley, 1980). Entretanto, Castilho (2016) não observou alteração no teor de malonaldeído com o EA (30 °C, 76 % UR, 8 meses) nas cultivares BRS 257 e BRS 284. Já, Stewart et al. (1980), em soja submetida a armazenamento a 45 °C, 100 % UR em dessecador, por até 7 dias, observaram aumento no teor de malonaldeído nos eixos embrionários até o segundo dia. Após este período, observaram uma redução que foi justificada pela oxidação e decomposição do composto em outros produtos, além de uma possível diminuição no conteúdo de seu precursor, o ácido linolênico.

Sendo assim, na cultivar BRS 257, isenta de lipoxigenase, tanto submetida ao EA quanto ao EN, não houve produção de malonaldeído, ou seja, não houve aumento na oxidação lipídica ao longo do armazenamento, mas ocorreu uma decomposição do composto que já estava presente no grão controle. Na soja BRS 284 convencional sob EA, também não houve variação no teore de malonaldeído, enquanto que no EN, notou-se um aumento e posterior redução para os níveis iniciais, indicando sua produção e posterior decomposição.

As lipoxigenases são enzimas que catalisam a hidroperoxidação de ácidos graxos poliinsaturados, em especial do ácido linoleico, originando compostos com sabor indesejável, dos quais o principal é o composto volátil hexanal (Matoba, et al., 1985) e podem estar envolvidas no processo de envelhecimento. Desta forma, a investigação da atividade da enzima e do composto volátil é de interesse.

Foi observada atividade de lipoxigenases na cultivar BRS 257, isenta de lipoxigenases L1, L2 e L3 (Tabelas 1 e 2). Estes resultados estão de acordo com Silva et al. (2009), que observaram atividade na soja BRS 213, cultivar brasileira livre de lipoxigenases de, em média, 1,7 vezes menor do que outras quatro cultivares convencionais, o que foi atribuído a uma possível presença de outras isoenzimas (L4, L5 e L6), como proposto por

Hildebrand (1996), e também a metabólitos gerados durante o período de pós-colheita. Observou-se diferença entre as duas cultivares quanto à atividade da enzima (Tabela 1 e 2). No EA, a cultivar convencional, BRS 284, apresentou maior atividade que a BRS 257 no controle (2,35 vezes) e no terceiro mês (1,74 vezes), mas nos demais tempos de armazenamento as duas cultivares não se diferenciaram.

A BRS 284 mostrou redução (aproximadamente 40 %) na atividade das enzimas no sexto mês de EA e se manteve até nono mês (Tabela 1). Já a BRS 257, não apresentou alteração da atividade nos tempos avaliados, sendo assim, as duas cultivares não diferiram ao final do EA. A atividade das lipoxigenases não sofreu alterações ao longo do EN em ambas as cultivares (Tabela 2), sendo que até o mês 12 a BRS 284 apresentou maiores valores de atividade da enzima, em média 2,5 vezes maior do que na BRS 257.

A redução na atividade de lipoxigenases foi observada em outros estudos de envelhecimento acelerado e natural em diversas condições. A razão desta redução de atividade pode ser o aumento na acidez dos grãos e danos oxidativos que podem causar a desnaturação das enzimas (Narayan et al., 1988; Wang et al., 1990; Sung et al., 1995). Desta forma, os resultados encontrados no EA para a BRS 284 estão de acordo com estes estudos, uma vez que houve redução no pH ou aumento da acidez dos grãos e na atividade das lipoxigenases. No EN, apesar do tempo mais longo, as condições de armazenamento foram mais brandas e talvez não tenham sido suficientes para causar uma diminuição na atividade da enzima.

Comparando-se as cultivares quanto ao teor do composto volátil hexanal, estas não diferiram entre si no controle (Tabela 1 e 2). No EA as duas cultivares apresentaram maior teor de hexanal no sexto mês, comparado aos controles (67,57 % na BRS 284 e 76,29 % na BRS 257) com posterior redução no nono mês em ambas as cultivares, e assim não diferiram do controle. Ainda, destaca-se que nos tempos de armazenamento três e seis meses o teor de hexanal foi maior na cultivar isenta de lipoxigenase do que na convencional (Tabela 1).

No EN as cultivares não se diferenciaram e não houve variações no teor de hexanal ao longo do armazenamento (Tabela 2). Em condições drásticas houve aumento de hexanal independente da presença da enzima lipoxigenase, indicando que o composto é formado também por outros mecanismos.

Há poucos estudos relacionando o teor de hexanal ao envelhecimento da soja. Braccini et al. (2000) observaram aumento do composto em grãos de soja armazenados em condição natural por até seis meses. Em extrato obtido de soja armazenada a 22 °C, 30 % UR por até 10 meses, Achouri, Boye e Zamani (2008) observaram redução no teor de hexanal até o terceiro mês, com uma estabilização até o fim do período, que foi associada pelos autores a uma possível redução concomitante na atividade das lipoxigenases.

As lipoxigenases estão envolvidas na formação de hexanal em soja durante o processamento (moagem e maceração) dos grãos (Matoba et al., 1985). Entretanto, de acordo com Iassonova, Johnson, Hammond e Beattie (2009) há indícios de que este composto também pode ser formado por ação de outra enzima com atividade semelhante à das lipoxigenases, e possivelmente por meio de reações de autooxidação durante o preparo do extrato aquoso (Yuan & Chang, 2007). Enquanto que Shi et al. (2015) não encontraram correlação entre a atividade de lipoxigenases e teor de hexanal em extrato aquoso de 67 cultivares de soja, a qual, segundo os autores, se correlacionou com o conteúdo de ácido linoléico dos grãos. Assim, em condições mais drásticas, como o EA, além das lipoxigenases, outras enzimas e reações de autooxidação, favorecidas pela temperatura e UR elevada, podem levar ao aumento do conteúdo de hexanal.

Castilho (2016) encontrou evidência (por meio de medidas de radicais livres por ressonância paramagnética eletrônica), de que a oxidação lipídica tem papel importante no EA da soja e que esta parece seguir as etapas de iniciação (pouca evidência de oxidação), propagação (há um aumento nos produtos de oxidação lipídica) e terminação (redução nos teores de peróxidos e seus produtos) ao longo do armazenamento. Desta maneira, o aumento

do hexanal pode ter ocorrido durante um período de maior atividade das enzimas e também de outras reações de oxidação nos grãos, e posteriormente, com a redução destes mecanismos nos tempos finais de armazenamento, ocorreu o declínio na produção ou uma possível decomposição do composto em outros produtos de oxidação.

Segundo Sung et al. (1995) e Wang et al. (1990) as lipoxigenases parecem não ser os principais agentes no processo de deterioração dos grãos no envelhecimento, pois há redução em sua atividade com o EA e o EN, e a ausência de pelo menos duas isoenzimas não aumentaria a resistência dos grãos ao envelhecimento. Assim, os resultados aqui encontrados corroboram com os destes autores, uma vez que as duas cultivares estudadas apresentaram um padrão muito semelhante de alterações oxidativas durante o EA e o EN.

3.3 Atividade de α -galactosidase e teores de carboidratos

No EA, a cultivar BRS 284 apresentou maior atividade da enzima α -galactosidase do que a BRS 257, do controle ao sexto mês. Com o EA, as cultivares tiveram redução na atividade da enzima de 27,7 % na BRS 284 e 18,7 % na BRS 257 (Tabela 3). Ao final do EN (18 meses) também notou-se a redução (17,48 %) da atividade da enzima da BRS 257. Enquanto que a BRS 284 apresentou redução (10,8 %) da atividade somente no 12º mês, uma vez que a atividade aos 18 meses não se diferenciou do controle e 12º mês (Tabela 4). Salienta-se que apesar da redução na atividade ao final do EA e do EN, a enzima ainda possuía atividade. Não foram encontrados estudos que avaliassem a atividade da α -galactosidase durante o envelhecimento da soja. Viana et al. (2005) observaram que a α -galactosidase de soja tem atividade máxima a 60 °C e pH 5,0. Sendo assim, a redução no pH ou aumento de acidez observada durante o armazenamento EA e EN (Tabelas 1 e 2) pode ter favorecido a ação da

enzima, em especial no EA, em seus substratos, apesar da temperatura não estar próxima da ótima.

Quanto aos teores de carboidratos das sojas submetidas ao EA (Tabela 3) e ao EN (Tabela 4), notou-se que os controles de ambas as cultivares não foram detectados os monossacarídeos galactose, glicose e frutose, o que está em acordo com os resultados observados por Silva et al. (2009), que também não encontraram monossacarídeos em grãos recém colhidos de soja de diferentes cultivares. Os principais açúcares detectados e quantificados nos grãos controle no presente trabalho foram, em ordem decrescente, sacarose, estaquiose e rafinose (Tabelas 3 e 4), a mesma ordem observada por Silva et al. (2009). De acordo com Silva et al. (2009), cultivares com maior conteúdo de sacarose e frutose, apresentam um sabor mais doce e suave.

Nos controles do EA e do EN de cada cultivar, a soma dos teores do dissacarídeo sacarose e dos oligossacarídeos rafinose e estaquiose correspondia a 100 % dos carboidratos encontrados. Entretanto, ao final do EA, a soma destes carboidratos passou a corresponder a 79 e 83 % dos carboidratos totais na BRS 284 e BRS 257, respectivamente, o que significa uma redução de 2 vezes na BRS 284 e de 2,5 vezes na BRS 257. Observou-se ainda, que houve uma redução no conteúdo de carboidratos totais com o EA, de aproximadamente 1,6 vezes na BRS 284 e de 2,11 vezes na BRS 257.

No EA, as duas cultivares apresentaram aumento dos monossacarídeos, de 20 vezes na BRS 284 e de 17 vezes na BRS 257. No nono mês de armazenamento, os monossacarídeos corresponderam a 21 % dos carboidratos totais na BRS 284 e de 17 % na BRS 257. A galactose foi encontrada a partir do mês 3 em ambas as cultivares no EA, sendo que, do terceiro ao nono mês de armazenamento, ocorreu um aumento de 55 vezes na BRS 284 e de 31 vezes na BRS 257. O mesmo comportamento foi observado para a glicose, sendo que o aumento observado (do terceiro ao nono mês) foi de 15 vezes para a BRS 284 e de 22 vezes

para a BRS 257. Já a frutose foi encontrada somente no nono mês de armazenamento de ambas as cultivares, sendo que na BRS 284 o conteúdo foi maior do que na BRS 257.

Quanto ao dissacarídeo sacarose, durante o EA a BRS 284 apresentou maior teor que a BRS 257 no controle e em todos os tempos de armazenamento. Ao longo desta condição de armazenamento, não houve alteração na BRS 284, enquanto que na BRS 257 notou-se uma redução de 32,6 % ao final do armazenamento. Já para a rafinose, houve redução de, em média, 85,3 % nas duas cultivares. Para este carboidrato, no controle, a BRS 257 continha maior teor do que na BRS 284. Por fim, o mesmo padrão de redução foi observado para a estaquiose, nas duas cultivares ao fim do armazenamento, sendo que na BRS 284 a redução foi de aproximadamente 95 % e na BRS 257 foi de 87 %. As duas cultivares controle não diferiram quanto a este carboidrato, porém ao fim do armazenamento a BRS 257 mostrou maior conteúdo (Tabela 1).

No EN também notou-se redução nos teores de carboidratos totais, de em média 1,24 vezes para as duas cultivares. No entanto, não foi observado aumento no teor de monossacarídeos, sendo que o único encontrado neste experimento foi a galactose a partir do sexto mês na BRS 257 e do 12º mês na BRS 284, cujos conteúdos se mantiveram até o final do armazenamento (18 meses). Com relação à sacarose, houve redução a partir do sexto mês em ambas as cultivares, que atingiu 32,54 % na BRS 284 e 25,4 % na BRS 257 no final. O mesmo foi observado para a rafinose, que no 18º mês teve uma redução de 41,8 % na BRS 284 e de 48 % na BRS 257. Para este oligossacarídeo, a BRS 257 mostrou maior teor durante todos os tempos de armazenamento. Houve aumento de 15,88 % na BRS 284 e de 17,7 % na BRS 257 no teor de estaquiose com o EN nas duas cultivares (Tabela 2), o oposto do observado no EA (Tabela 1).

Hou et al. (2004) observaram redução no teor de açúcares livres em soja durante armazenamento em condição drástica (84 % UR, 30 °C, 9 meses), mas não observaram

alteração em envelhecimento natural até 18 meses. Segundo os autores, a redução ocorreu devido à metabolização dos açúcares, que poderiam ter sido utilizados como fonte de energia para superar o stress causado pelo EA. Sun e Leopold (1993) observaram redução no teor de sacarose e estaquiase nos eixos embrionários de soja submetida ao EA (25 ou 35 °C, 75 % UR, 40 dias), e aumento no teor de rafinose, cujo motivo não foi explicado pelos autores.

Há relatos de redução no teor de açúcares redutores e não redutores e de açúcares solúveis totais em soja submetida a diferentes tempos de envelhecimento natural, devido, possivelmente, à hidrólise enzimática destes açúcares e utilização no processo respiratório dos grãos como forma de obtenção de energia ou, ainda, devido à participação destes açúcares em reações de escurecimento nos grãos como a reação de Maillard (Narayan et al., 1988; Sharma et al., 2013).

Murthy e Sun (2000) e Murthy, Kumar e Sun (2003) avaliaram os teores de carboidratos na leguminosa *Vigna radiata* (Feijão Mungo) durante o EA em diferentes condições. Ambos os estudos mostraram um aumento nos teores de glicose, sendo esse aumento atribuído à hidrólise da sacarose e de oligossacarídeos (como a estaquiase e rafinose) nos grãos. Além disso, os autores observaram que, quanto maior a temperatura do ambiente e a umidade dos grãos, maior era a hidrólise. Segundo Murthy et al. (2000), a hidrólise de açúcares no envelhecimento do feijão está associada com reações de Maillard, e estas reações contribuiriam com os danos observados nos grãos.

Deste modo, os resultados observados (Tabelas 3 e 4) para carboidratos estão em acordo com aqueles relatados na literatura. Durante o EA, as alterações nestes compostos foram mais acentuadas, devido provavelmente a maior temperatura e UR a que foram submetidos. No EN, diferentemente do EA, apesar de não ter havido aumento no teor de monossacarídeos, houve redução da sacarose e rafinose. A redução observada nos carboidratos totais durante o EA e o EN pode ser devido a utilização destes açúcares nos processos

metabólicos do grão para obtenção de energia (Narayan et al., 1988; Sharma et al., 2013). Além disso, a enzima α -galactosidase ao hidrolisar as ligações glicosídicas α (1-6) presentes nos oligossacarídeos da soja, libera o monossacarídeo galactose (Viana et al., 2005). Assim, o aumento deste monossacarídeo é consistente com a ação da α -galactosidase nos grãos, que, apesar da redução na sua atividade (especialmente no EA), ainda foi capaz de hidrolisar os oligossacarídeos.

Ainda, deve-se considerar que durante o envelhecimento dos grãos ocorre a interconversão das formas glicosídicas das isoflavonas para aglicona com liberação da molécula de glicose (Artigo Científico I desta tese), que deve ter contribuído em parte para o aumento deste monossacarídeo, principalmente no EA.

3.4 Cor dos grãos de soja

O EA resultou em escurecimento e avermelhamento dos grãos em ambas as cultivares, representado pela redução nos valores dos parâmetros L^* e h° , respectivamente (Tabela 5). A cultivar BRS 284 foi mais clara do que a BRS 257 até o sexto mês e, em ambas as cultivares, o escurecimento dos grãos teve início no sexto mês de armazenamento. O avermelhamento dos grãos teve início no sexto mês na BRS 257, enquanto que na BRS 284 iniciou-se já no terceiro mês. Enquanto que durante o EN não foi constatado escurecimento dos grãos da cultivar BRS 284, porém, na BRS 257 os grãos apresentaram-se mais escuros do que o controle no sexto mês de armazenamento (Tabela 5). Os grãos de ambas as cultivares tornaram-se mais avermelhados do que o controle a partir do sexto mês de armazenamento.

O escurecimento é uma consequência do envelhecimento e está relacionado a alterações bioquímicas que ocorrem nos grãos durante o armazenamento. Dentre estas alterações estão as reações de escurecimento enzimático (como a oxidação de compostos

fenólicos por enzimas), e não enzimático como a reação de Maillard e possivelmente por reações de oxidação lipídica. (Kamizake, Yamashita et al., 2014; Kong et al., 2008; Hou & Chang, 1998; Narayan et al., 1988). Portanto, as alterações de pH, produtos de oxidação lipídica e nos carboidratos observados no presente estudo contribuíram, ao menos em parte, para o escurecimento dos grãos.

Conclusões

A atividade da enzima lipoxigenase é reduzida com o envelhecimento da cultivar convencional (BRS 284) e se mantém em baixos níveis na cultivar livre de lipoxigenases L1, L2 e L3 (BRS 257).

Há ocorrência de oxidação lipídica com redução do pH, formação de malonaldeído e hexanal, tanto na cultivar convencional quanto na livre das enzimas lipoxigenases L1, L2 e L3, indicando que a ausência das enzimas não protege a cultivar do envelhecimento.

A atividade da enzima α -galactosidase é reduzida no envelhecimento, principalmente no envelhecimento acelerado. Ocorre aumento nos conteúdos de monossacarídeos e redução nos conteúdos de oligossacarídeos. Como consequência, pode haver aumento na doçura nos grãos de soja e redução dos efeitos desagradáveis (flatulência e desconforto abdominal) ao consumidor, o que pode representar vantagem no consumo de grãos da soja envelhecida.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro e concessão de bolsa de estudos e bolsa produtividade em pesquisa aos autores.

Referências

Achouri, A., Boye, J. & Zamani, Y. (2008). Soybean variety and storage effects on soymilk flavour and quality. *International Journal of Food Science and Technology*, 43, 82 – 90.

Bailly, C. (2004). Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Science Research*, 14, 93 – 107.

Baú, T. R., Garcia, S. & Ida, E. I. (2015). Changes in soymilk during fermentation with kefir culture: oligosaccharides hydrolysis and isoflavone aglycone production. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 66, 845 – 850.

Braccini, A. L., Reis, M. S., Moreira, M. A., Sedyama, C. S. & Scapim, C. A. (2000). Biochemical changes associated to soybean seeds osmoconditioning during storage. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 35, 433 – 447.

Carrão-Panizzi, M. C. & Bordingnon, J. R. (2000). Activity of beta-glucosidase and levels of isoflavone glucosides in soybean cultivars affected by the environment. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 35, 873 – 878.

Castilho, S. P. G. (2016). *Implicações do envelhecimento de cultivar de soja convencional ou livre de lipoxigenases nas propriedades físicas e químicas da fração lipídica dos grãos*. (Dissertação de Mestrado em Ciência de Alimentos). Londrina: Universidade Estadual de Londrina.

Embrapa Soja. (2013). *Cultivares de Soja: macrorregiões 1, 2 e 3, centro sul do Brasil*. Londrina: Embrapa Soja.

Ferreira, D. F. (2014). Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. *Ciência e Agrotecnologia* [online], 38, 109 – 112. Available in: ISSN 1413-7054, <<http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542014000200001>>.

Hildebrand, D. (1996). Genetics of soybean lipoxygenases. In: Piazza, G. (Ed.). *Lipoxygenase and lipoxygenase pathway enzymes* (pp. 33 – 38) Illinois: AOCS Press.

Hou, H. J. & Chang, K. C. (1998). Yield and Quality of Soft Tofu As Affected by Soybean Physical Damage and Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4798 – 4805.

Hou, H. J. & Chang, K. C. (2002). Interconversions of isoflavones in soybeans as affected by storage. *Journal of Food Science*, 67, 2083 – 2089.

Hou, H. J. & Chang, K. C. (2004). Storage conditions affect soybean color, chemical composition and tofu qualities. *Journal of Food Processing and Preservation*, 28, 473 – 488.

Iassonova, D. R., Johnson, L. A., Hammond, E. G. & Beattie, S. E. (2009). Evidence of an enzymatic source of off flavors in “Lipoxygenase-Null” soybeans. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 86, 59 – 64.

Kamizake, N. K. K., Yamashita, F. & Prudencio, S. H. (2014). Physical alterations of soybean during accelerated and natural aging. *Food Research International*, 55, 55 – 61.

Kamizake, N. K. K., Varéa, G. S. & Prudencio, S. H. (2014). Physicochemical properties of aged soybean components. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 12, 263 – 268.

Karr-Lilienthal, L. K., Kadzere, C. T., Grieshop, C.M. & Fahey Jr., G. C. (2005). Chemical and nutritional properties of soybean carbohydrates as related to nonruminants: a review. *Livestock Production Science*, 97, 1 – 12.

Kong, F., Chang, S. K. C., Liu, Z. & Wilson, L.A. (2008). Changes of soybean quality during storage as related to soymilk and tofu making. *Journal of Food Science*, 73, S134 – S144.

Lambrecht, H. S., Nielsen, S. S., Liska, B. J. & Nielsen, N. C. (1996). Effect of soybean storage on tofu and soymilk production. *Journal of Food Quality*, 19, 189 – 202.

Liu, K. (1997). *Soybeans: chemistry technology and utilization*. (1st Ed.). New York: Chapman and Hall, (Chapter 2).

Lowry, O. H., Rosbrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R.J. (1951). *J. Biol. Chem*, 193, 265 – 275.

Marcos-Filho, J. (1999). Teste de Envelhecimento Acelerado. In: Krzyzanowski, F. C., Vieira, R. D. & França-Neto, J. B. (Eds.), *Vigor de Sementes: Conceitos e Testes* (pp. 3.1 – 3.24). Londrina: ABRATES.

Matoba, T., Hidaka, H., Narita, H., Kitamura, K., Kaizuma, N. & Kito, M. (1985). Lipoxygenase-2 isozyme is responsible for generation of *n*-Hexanal in soybean homogenate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 33, 852 – 855.

Murthy, U. M. N. & Sun, W. Q. (2000). Protein modification by Amadori and Maillard reactions during seed storage: roles of sugar hydrolysis and lipid peroxidation. *Journal of Experimental Botany*, 51, 1221 – 1228.

Murthy, U. M. N., Kumar, P. P. & Sun, W. Q. (2003). Mechanisms of seed ageing under different storage conditions for *Vigna radiata* (L.) Wilczek: lipid peroxidation, sugar hydrolysis, Maillard reactions and their relationship to glass state transition. *Journal of Experimental Botany*, 54, 1057 – 1067.

Narayan, R., Chauhan, G. S. & Verma, N. S. (1988). Changes in the quality of soybean during storage. Part 1: Effect of storage on some physico-chemical properties of soybean. *Food Chemistry*, 27, 13 – 23.

Sharma, S., Kaur, A., Bansal, A. & Gill, B. S. (2013). Positional effects on soybean seed composition during storage. *Journal of Food Science and Technology*, 50, 353 – 359.

Shi, X., Li, J., Wang, S., Zhang, L., Qiu, L., Han, T., Wang, Q., Chang, S. K. C. & Guo, S. (2015). Flavor characteristic analysis of soymilk prepared by different soybean cultivars and establishment of evaluation method of soybean cultivars suitable for soymilk processing. *Food Chemistry*, 185, 422 – 429.

Da Silva, M. D., Oliveira, M. G. A., Lanna, A. C., Pires, C. V., Piovesan, N. D., José, I. C., Batista, R. B., Barros, E. G. & Moreira, M. A. (2001). *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 13, 316 – 328.

Silva, J. B., Carrão-Panizzi, M. C. & Prudencio, S. H. (2009). Chemical and physical composition of grain-type and food-type soybean for food processing. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 44, 777 – 784.

Stewart, R. R. C. & Bewley, D. (1980). Lipid Peroxidation associated with Accelerated aging of Soybean axes. *Plant Physiology*, 65, 245 – 248.

Sun, W. Q. & Leopold, A. C. (1993). The glassy state and accelerated aging of soybeans. *Physiologia Plantarum*, 89, 161 – 114.

Sung, J. M. & Chiu, C. C. (1995). Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes of naturally aged soybean seed. *Plant Science*, 110, 45 – 52.

Sung, J. M. (1996). Lipid peroxidation and peroxide scavenging in soybean seeds during aging. *Physiologia Plantarum*, 97, 85 – 89.

Tian, X., Song, S. & Lei, Y. (2008). Cell death and reactive oxygen species metabolism during accelerated ageing of soybean axes. *Russian Journal of Plant Physiology*, 55, 33 – 40.

USDA. United States Department of Agriculture. Soybeans & Oil crops: Trade. (2017). <https://www.ers.usda.gov/topics/crops/soybeans-oil-crops/trade/> Accessed 01.08.17.

Viana, S. F., Guimarães, V. M., José, I. C., Oliveira, M. G. A., Costa, N. M. B., Barros, E. G., Moreira, M. A. & Rezende, S. T. (2005). Hydrolysis of oligosaccharides in soybean flour by soybean α -galactosidase. *Food Chemistry*, 93, 665 – 670.

Wang, J., Fujimoto, K., Miyazawa, T., Endo, Y. & Kitamura, K. (1990). Sensitivities of lipoxygenase-lacking soybean seeds to accelerated aging and their chemiluminescence levels. *Phytochemistry*, 29, 3739 – 3742.

Wang, Y., Chen, P. & Zhang, B. (2014). Quantitative trait loci analysis of soluble sugar contents in soybean. *Plant Breeding*, 133, 493 – 498.

Yuan, S. H. & Chang, S. K. C. (2007). Selected Odor Compounds in Cooked Soymilk as Affected by Soybean Materials and Direct Steam Injection. *Journal of Food Science*, 72, S481 – S486.

Tabela 1 – pH, teores de malonaldeído e hexanal e atividade das enzimas lipoxigenases de sojas BRS 257 e BRS 284 submetidas ao Envelhecimento Acelerado.

Cultivares	Tempo de Armazenamento (meses)			
	Controle	3	6	9
pH				
BRS 284	6,63 ± 0,05 ^{Ba}	6,47 ± 0,03 ^{Aa}	6,10 ± 0,02 ^{Ab}	5,97 ± 0,07 ^{Ab}
BRS 257	6,75 ± 0,04 ^{Aa}	6,48 ± 0,04 ^{Ab}	6,06 ± 0,04 ^{Ac}	5,95 ± 0,01 ^{Ac}
Malonaldeído				
BRS 284	23,18 ± 0,44 ^{Aa}	24,54 ± 0,55 ^{Aa}	22,09 ± 1,26 ^{Aa}	21,38 ± 0,91 ^{Aa}
BRS 257	24,36 ± 0,88 ^{Aa}	22,50 ± 1,24 ^{Aa}	21,18 ± 0,51 ^{Aab}	19,07 ± 0,67 ^{Bb}
Lipoxigenase				
BRS 284	142,52 ± 43,34 ^{Aa}	127,23 ± 39,02 ^{Aa}	59,81 ± 8,56 ^{Ab}	57,64 ± 17,59 ^{Ab}
BRS 257	60,66 ± 4,73 ^{Ba}	73,03 ± 8,88 ^{Ba}	65,25 ± 12,26 ^{Aa}	48,49 ± 3,57 ^{Aa}
Hexanal				
BRS 284	51,80 ± 4,98 ^{Ab}	56,81 ± 4,91 ^{Bab}	86,80 ± 3,14 ^{Ba}	64,44 ± 2,86 ^{Aab}
BRS 257	69,04 ± 8,76 ^{Ab}	99,88 ± 10,89 ^{Aab}	121,71 ± 4,47 ^{Aa}	72,99 ± 13,67 ^{Ab}

Valores representam média de duas determinações em cada repetição do experimento (n = 4) ± desvio padrão.

Médias na mesma coluna, seguidas de letras maiúsculas diferentes e na linha, acompanhadas de letras minúsculas diferentes, indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) em cada parâmetro.

Teores de malonaldeído e hexanal expressos em nmol.g^{-1} , atividade de lipoxigenase expressa em $\mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mg proteína}^{-1}$.

Resultados expressos em base seca, exceto lipoxigenases.

Controle: 4 °C e 66 % UR. Envelhecimento Acelerado: até 9 meses, 30 °C e 78 ± 2 % UR.

Tabela 2 – pH, teores de malonaldeído e hexanal e atividade das enzimas lipoxigenases de sojas BRS 257 e BRS 284 submetidas ao Envelhecimento Natural.

Cultivares	Tempo de Armazenamento (meses)			
	Controle	6	12	18
pH				
BRS 284	6,63 ± 0,05 ^{Ba}	6,54 ± 0,04 ^{Bab}	6,43 ± 0,05 ^{Bb}	6,46 ± 0,02 ^{Bb}
BRS 257	6,75 ± 0,04 ^{Aa}	6,63 ± 0,05 ^{Aab}	6,58 ± 0,04 ^{Ab}	6,58 ± 0,03 ^{Ab}
Malonaldeído				
BRS 284	23,18 ± 0,44 ^{Bb}	25,06 ± 0,22 ^{Aa}	24,06 ± 1,13 ^{Aab}	24,18 ± 0,58 ^{Aab}
BRS 257	24,36 ± 0,88 ^{Aab}	25,36 ± 0,43 ^{Aa}	23,72 ± 0,49 ^{Abc}	23,19 ± 0,92 ^{Bc}
Lipoxigenase				
BRS 284	142,52 ± 43,34 ^{Aa}	158,30 ± 39,67 ^{Aa}	143,21 ± 36,01 ^{Aa}	136,32 ± 50,59 ^{Aa}
BRS 257	60,66 ± 4,73 ^{Ba}	62,42 ± 21,50 ^{Ba}	54,38 ± 5,74 ^{Ba}	84,20 ± 14,66 ^{Aa}
Hexanal				
BRS 284	51,80 ± 4,98 ^{Aa}	69,47 ± 6,01 ^{Aa}	78,15 ± 10,06 ^{Aa}	74,04 ± 4,83 ^{Aa}
BRS 257	69,04 ± 8,76 ^{Aa}	72,77 ± 12,09 ^{Aa}	86,24 ± 13,45 ^{Aa}	73,88 ± 8,59 ^{Aa}

Valores representam média de duas determinações em cada repetição do experimento (n = 4) ± desvio padrão.

Médias na mesma coluna, seguidas de letras maiúsculas diferentes e na linha, acompanhadas de letras minúsculas diferentes, indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) em cada parâmetro.

Teores de malonaldeído e hexanal expressos em nmol.g^{-1} , atividade de lipoxigenase expressa em $\mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mg proteína}^{-1}$.

Resultados expressos em base seca, exceto lipoxigenases.

Controle: 4 °C e 66 % UR. Envelhecimento Natural: até 18 meses, temperatura e UR ambiente (variação: 12 a 34,4 °C e 24 a 86 % UR).

Tabela 3 – Atividade da enzima α -galactosidase e teores de carboidratos de sojas BRS 257 e BRS 284 submetidas ao Envelhecimento Acelerado.

Cultivares	Tempo de Armazenamento (meses)			
	Controle	3	6	9
α - galactosidase				
BRS 284	2,78 \pm 0,18 ^{Aa}	2,65 \pm 0,03 ^{Aa}	2,47 \pm 0,08 ^{Ab}	2,01 \pm 0,04 ^{Ac}
BRS 257	2,46 \pm 0,06 ^{Ba}	2,12 \pm 0,13 ^{Bbc}	2,19 \pm 0,05 ^{Bb}	2,00 \pm 0,07 ^{Ac}
Carboidratos				
Galactose				
BRS 284	0,00 ^{Ac*}	0,01 \pm 0,001 ^{Ac}	0,24 \pm 0,04 ^{Ab}	0,55 \pm 0,04 ^{Aa}
BRS 257	0,00 ^{Ac*}	0,01 \pm 0,001 ^{Ac}	0,16 \pm 0,001 ^{Bb}	0,31 \pm 0,02 ^{Ba}
Glicose				
BRS 284	0,00 ^{Ac*}	0,02 \pm 0,01 ^{Ac}	0,16 \pm 0,02 ^{Ab}	0,30 \pm 0,06 ^{Aa}
BRS 257	0,00 ^{Ac*}	0,01 \pm 0,003 ^{Ac}	0,14 \pm 0,003 ^{Ab}	0,22 \pm 0,01 ^{Ba}
Frutose				
BRS 284	0,00 ^{Ab*}	0,00 ^{Ab*}	0,00 ^{Ab*}	0,26 \pm 0,10 ^{Aa}
BRS 257	0,00 ^{Ab*}	0,00 ^{Ab*}	0,00 ^{Ab*}	0,12 \pm 0,02 ^{Ba}
Sacarose				
BRS 284	4,64 \pm 0,33 ^{Ab}	5,18 \pm 0,35 ^{Aa}	3,93 \pm 0,10 ^{Ab}	3,88 \pm 0,18 ^{Ab}
BRS 257	3,74 \pm 0,16 ^{Ba}	3,85 \pm 0,33 ^{Ba}	2,68 \pm 0,14 ^{Bab}	2,52 \pm 0,32 ^{Bb}
Rafinose				
BRS 284	1,41 \pm 0,05 ^{Bb}	2,46 \pm 0,19 ^{Aa}	0,94 \pm 0,08 ^{Bc}	0,20 \pm 0,08 ^{Ad}
BRS 257	1,92 \pm 0,15 ^{Aa}	1,43 \pm 0,06 ^{Bb}	1,09 \pm 0,03 ^{Ac}	0,29 \pm 0,03 ^{Ad}
Estaquiose				
BRS 284	2,33 \pm 0,03 ^{Aa}	2,37 \pm 0,02 ^{Ba}	0,86 \pm 0,03 ^{Bb}	0,12 \pm 0,07 ^{Bc}
BRS 257	2,26 \pm 0,03 ^{Ab}	2,65 \pm 0,15 ^{Aa}	1,47 \pm 0,04 ^{Ac}	0,29 \pm 0,02 ^{Ad}

Valores representam média de duas determinações em cada repetição do experimento (n = 4) \pm desvio padrão.

Médias na mesma coluna, seguidas de letras maiúsculas diferentes e na linha, acompanhadas de letras minúsculas diferentes, indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) em cada parâmetro. * Não encontrado ou encontrado em quantidade abaixo do limite de quantificação do método.

Atividade de α -galactosidase expressa em UA.g⁻¹; Teores de carboidratos expressos em g.100 g⁻¹. Resultados expressos em base seca.

Controle: 4 °C e 66 % UR. Envelhecimento Acelerado: até 9 meses, 30 °C e 78 \pm 2 % UR.

Tabela 4 – Atividade da enzima α -galactosidase e teores de carboidratos de sojas BRS 257 e BRS 284 submetidas ao Envelhecimento Natural.

Cultivares	Tempo de Armazenamento (meses)			
	Controle	6	12	18
α - galactosidase				
BRS 284	2,78 \pm 0,18 ^{Aab}	2,93 \pm 0,04 ^{Aa}	2,48 \pm 0,01 ^{Ac}	2,57 \pm 0,11 ^{Abc}
BRS 257	2,46 \pm 0,06 ^{Bab}	2,56 \pm 0,09 ^{Ba}	2,22 \pm 0,13 ^{Bbc}	2,03 \pm 0,06 ^{Bc}
Carboidratos				
Galactose				
BRS 284	0,00 ^{Ab*}	0,00 ^{Bb*}	0,01 \pm 0,001 ^{Aa}	0,01 \pm 0,001 ^{Aa}
BRS 257	0,00 ^{Ac*}	0,01 \pm 0,001 ^{Aa}	0,009 \pm 0,001 ^{Bb}	0,009 \pm 0,001 ^{Bb}
Sacarose				
BRS 284	4,64 \pm 0,33 ^{Aa}	2,12 \pm 0,06 ^{Bc}	3,12 \pm 0,08 ^{Ab}	3,13 \pm 0,01 ^{Ab}
BRS 257	3,74 \pm 0,16 ^{Ba}	3,03 \pm 0,17 ^{Ab}	2,87 \pm 0,05 ^{Ab}	2,79 \pm 0,03 ^{Bb}
Rafinose				
BRS 284	1,41 \pm 0,05 ^{Ba}	0,67 \pm 0,02 ^{Bc}	0,75 \pm 0,01 ^{Bb}	0,82 \pm 0,02 ^{Bb}
BRS 257	1,92 \pm 0,15 ^{Aa}	1,09 \pm 0,06 ^{Ab}	0,94 \pm 0,03 ^{Ac}	1,00 \pm 0,02 ^{Ac}
Estaquiose				
BRS 284	2,33 \pm 0,03 ^{Ab}	2,13 \pm 0,05 ^{Bc}	2,59 \pm 0,09 ^{Aa}	2,70 \pm 0,02 ^{Aa}
BRS 257	2,26 \pm 0,03 ^{Ac}	2,90 \pm 0,05 ^{Aa}	2,64 \pm 0,04 ^{Ab}	2,66 \pm 0,01 ^{Ab}

Os monossacarídeos glicose e frutose não foram detectados em todos os tempos de armazenamento.

Valores representam média de duas determinações em cada repetição do experimento (n = 4) \pm desvio padrão.

Médias na mesma coluna, seguidas de letras maiúsculas diferentes e na linha, acompanhadas de letras minúsculas diferentes, indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) em cada parâmetro. * Não encontrado ou encontrado em conteúdo abaixo do limite de quantificação do método.

Atividade de α -galactosidase expressa em UA.g⁻¹; Teores de carboidratos expressos em g.100 g⁻¹. Resultados expressos em base seca.

Controle: 4 °C e 66 % UR. Envelhecimento Natural: até 18 meses, temperatura e UR ambiente (variação: 12 a 34,4 °C e 24 a 86 % UR).

Tabela 5 – Parâmetros de cor (L^* e h°) de sojas BRS 257 e BRS 284 submetidas ao Envelhecimento Acelerado e Natural.

Tempo de Armazenamento (meses)				
Cultivares	Controle	3	6	9
Cor L^*				
BRS 284	59,66 ± 3,28 ^{Aa}	58,69 ± 4,05 ^{Aa}	52,38 ± 2,60 ^{Ab}	48,40 ± 2,12 ^{Ac}
BRS 257	56,96 ± 4,29 ^{Ba}	56,78 ± 4,16 ^{Ba}	49,98 ± 3,49 ^{Bb}	49,24 ± 2,55 ^{Ab}
Cor h°				
BRS 284	75,38 ± 1,39 ^{Aa}	73,78 ± 1,23 ^{Ab}	70,18 ± 2,28 ^{Ac}	69,17 ± 2,16 ^{Ac}
BRS 257	74,74 ± 1,43 ^{Aa}	73,67 ± 1,32 ^{Aa}	69,36 ± 2,50 ^{Ab}	69,71 ± 3,09 ^{Ab}
Tempo de Armazenamento (meses)				
Cultivares	Controle	6	12	18
Cor L^*				
BRS 284	59,66 ± 3,28 ^{Aa}	57,90 ± 1,86 ^{Aa}	58,19 ± 1,91 ^{Aa}	58,96 ± 3,18 ^{Aa}
BRS 257	56,96 ± 4,29 ^{Ba}	54,44 ± 2,65 ^{Bb}	55,24 ± 2,97 ^{Bab}	56,48 ± 3,27 ^{Ba}
Cor h°				
BRS 284	75,38 ± 1,39 ^{Aa}	72,37 ± 1,34 ^{Ac}	73,84 ± 1,01 ^{Ab}	73,63 ± 1,10 ^{Ab}
BRS 257	74,74 ± 1,43 ^{Aa}	70,00 ± 1,35 ^{Bc}	73,16 ± 1,30 ^{Ab}	73,15 ± 1,29 ^{Ab}

Valores representam média de 15 determinações em cada repetição do experimento ($n = 30$) ± desvio padrão.

Médias na mesma coluna, seguidas de letras maiúsculas diferentes e na linha, acompanhadas de letras minúsculas diferentes, indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) em cada parâmetro.

L^* = luminosidade (0 = preto; 100 = branco);

h° (tonalidade cromática) = $\arctan(b^*/a^*)$, 0° = vermelho puro; 90° = amarelo puro; 180° = verde puro; 270° = azul puro.

Controle: 4 °C e 66 % UR. Envelhecimento Acelerado: até 9 meses, 30 °C e 78 ± 2 % UR. Envelhecimento Natural: até 18 meses, temperatura e UR ambiente (variação: 12 a 34,4 °C e 24 a 86 % UR).

7 CONCLUSÕES

Quanto às alterações ocorridas nos grãos das cultivares de soja BRS 257, livre de lipoxigenases (L1, L2 e L3) e BRS 284 (convencional) decorrentes do envelhecimento acelerado e natural, pode-se concluir que:

- Ocorrem alterações nos conteúdos e também interconversões das isoflavonas com o envelhecimento acelerado e natural. O envelhecimento acarreta em aumento significativo das isoflavonas agliconas, em especial da genisteína.
- Não há alteração na atividade das enzimas β -glicosidases.
- Não há alterações drásticas na atividade antioxidante durante o envelhecimento acelerado e natural.
- Ocorre oxidação lipídica nos grãos independente da presença ou ausência das enzimas lipoxigenases.
- A ausência da enzima lipoxigenase não protege a cultivar BRS 257 do envelhecimento.
- A atividade da enzima lipoxigenase é reduzida na cultivar BRS 284, mantendo-se em baixos níveis na cultivar BRS 257.
- A atividade da enzima α -galactosidase é reduzida no envelhecimento, principalmente no envelhecimento acelerado.
- O envelhecimento dos grãos de soja acarreta redução do teor de oligossacarídeos e aumento no de monossacarídeos.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os grãos envelhecidos de soja apresentam potencial de consumo devido ao baixo teor de monossacarídeos e assim podem resultar na redução da flatulência e desconforto abdominal no consumidor; provavelmente apresentar sabor mais adocicado pelo aumento dos monossacarídeos em especial a frutose; e por fim ser fonte de isoflavonas agliconas, em especial a genisteína que são melhor absorvidas e apresentam benefícios à saúde.