

**UFRRJ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS**

DISSERTAÇÃO

**Avaliação de diferentes linhagens de soja preta quanto as suas
características físico-químicas, nutricionais e compostos bioativos**

Joana de Novais Pereira

2015



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS**

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES LINHAGENS DE SOJA PRETA
QUANTO AS SUAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS,
NUTRICIONAIS E COMPOSTOS BIOATIVOS**

JOANA DE NOVAIS PEREIRA

Sob a orientação de
Ronoel Luiz de Oliveira Godoy

e co orientação de
Ilana Felberg

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação e Ciências e Tecnologia de Alimentos Área de Concentração em Ciência de Alimentos.

Seropédica-RJ
Fevereiro de 2015

664.7

P436a

T

Pereira, Joana de Novais, 1988-

Avaliação de diferentes linhagens de soja preta quanto as suas características físico-químicas, nutricionais e compostos bioativos / Joana de Novais Pereira. - 2015.

73 f.: il.

Orientador: Ronoel Luiz de Oliveira Godoy.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2015.

Bibliografia: f. 60-73.

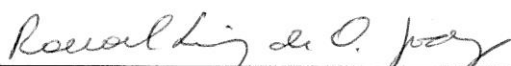
1. Soja - Análise - Teses. 2. Soja - Composição - Teses. 3. Soja - Variedades - Teses. 4. Soja como alimento - Teses. 5. Tecnologia de alimentos - Teses. I. Godoy, Ronoel Luiz de Oliveira, 1951- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS**

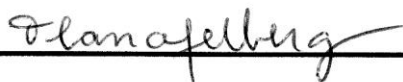
JOANA DE NOVAIS PEREIRA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, área de concentração em Ciência dos Alimentos.

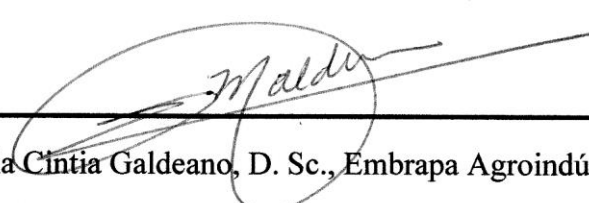
Dissertação aprovada em: 25/02/2015



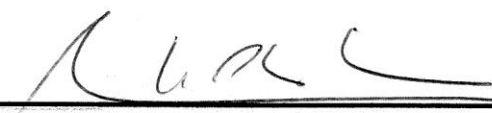
Ronoel Luiz de Oliveira Godoy, D.Sc., Embrapa Agroindústria de Alimentos /UFRRJ
(orientador)



Ilana Felberg, D. Sc., Embrapa Agroindústria de Alimentos
(Co-orientadora)



Melicia Cintia Galdeano, D. Sc., Embrapa Agroindústria de Alimentos



Carlos Wanderlei Piler de Carvalho, D. Sc., Embrapa Agroindústria de Alimentos/UFRRJ

DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação a Deus, à minha mãe Maria Inês, meu maior amor, aos meus irmãos Paulo André e Manoella, a minha avó Adiléa e ao meu pai Paulo Roberto.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela minha vida e por todas às bênçãos a mim concedidas.

À minha amada família, principalmente à minha mãe, o meu maior e melhor exemplo de vida, minha grande incentivadora, minha companheira, meu maior tesouro.

Aos meus irmãos, pelo carinho e amor.

À minha querida avó, minha grande incentivadora, pelo amor incondicional.

Ao meu saudoso avô, por ter sido, durante toda a sua vida um grande homem.

Ao meu pai, pelo incentivo e carinho.

Aos meu primos, Luna Lyang, Tarik, e Ksander, por estarem presentes em minha vida, e por acreditarem que todos os meus sonhos são possíveis e serão realizados.

À Dra. Ilana Felberg pela orientação, pela amizade e por todos os conhecimentos que foram comigo compartilhados ao longo desta jornada. Só tenho à agradecer por todo o carinho, e por ter sido, durante toda essa trajetória o meu maior exemplo de profissional.

Ao professor Dr. Ronoel Luiz de Oliveira Godoy, pela orientação.

À pesquisadora Mercedes Concórdia Carrão Panizzi pela atenção e pelo envio das amostras estudadas no presente estudo.

À professora Verônica Calado pelo auxílio na realização das análises estatísticas.

Aos laboratórios da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), por permitir a realização de todas as análises necessárias para a realização deste trabalho.

À minha maior amiga, Lívia Bastos, pelo incentivo, pela amizade, e por estar presente em minha vida em todos os momentos.

Às amigas de mestrado, Natália e Jéssica pelo companheirismo.

À amiga Thiana pela ajuda nos experimentos. Foi um prazer trabalhar com você.

Aos funcionários do laboratório de cromatografia líquida de alta eficiência, Manuela, Sidney Pacheco e Luzimar pelo auxílio na realização das análises cromatográficas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pela concessão da bolsa de estudos.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada!

RESUMO

PEREIRA, Joana de Novais. **Avaliação de diferentes linhagens de soja preta quanto as suas características físico-química, nutricionais e compostos bioativos.** 2015. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

O grão de soja com tegumento preto (*Glycine max* (L.) Merrill) vem despertando interesse de consumidores e pesquisadores devido o seu consumo estar associado com benefícios à saúde humana, relacionados à presença de metabólitos secundários, isoflavonas e principalmente das antocianinas. A Embrapa dispõe de diferentes linhagens de soja preta que precisam ser avaliadas não somente em relação às suas características agronômicas, mas se são adequadas ao consumo humano. O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar e comparar quatro diferentes linhagens de soja preta desenvolvidas pela Embrapa quanto à composição centesimal, fatores antinutricionais, teores de açúcares, perfil e teores de isoflavonas, antocianinas, aminoácidos, carotenoides, além da atividade antioxidante medida pelo método DPPH e ABTS. Em relação à composição centesimal, não foi observada diferença estatística entre os teores de proteína (41,15 a 41,69 g/100g) e umidade (10,41 a 10,61 g/100g) nas quatro linhagens de soja, enquanto os valores de extrato etéreo (19,12 a 19,79 g/100g), cinzas (5,13 a 5,81 g/100g) e carboidratos (33,38 a 34,22 g/100g) variaram estatisticamente ($p \leq 0,05$). A BRM11-51400 foi a linhagem com o resultado mais expressivo para minerais, uma vez que apresentou o maior teor de potássio (2372,89 mg/100g), mineral mais abundante em todas as amostras avaliadas, fósforo (753,56 mg/100g), magnésio (255,32 mg/100g) e cálcio (257,82 mg/100g). Foi também determinada a concentração de manganês, zinco, cobre, cobalto, selênio, alumínio e ferro em teores significativos (9,04 a 11,52 mg/100g). O maior teor de sacarose (6,46 g/100g) e de rafinose (1,56 g/100g) foi observado na BRM09-50901, enquanto a BRM11-51400 foi a linhagem com a maior concentração de estaquiase (5,24 g/100g). O fitato é um fator antinutricional presente em grão de soja, e foi detectado em teores que variaram de 11,91 a 14,88 mg/100g. Em relação aos compostos bioativos, a linhagem BRM09-50995, apresentou os teores mais elevados de antocianinas monoméricas totais, isoflavonas totais e carotenoides totais. Foram identificadas nas linhagens de soja três antocianinas monoméricas: a cianidina-3-O-glicosídeo, perfil majoritário em todas as amostras (262,27 a 720,45 mg/100g), a delphinidina-3-O-glicosídeo (184,41 a 316,72 mg/100g) e a petunidina-3-O-glicosídeo (6,34 a 153,06 mg/100g). Foram também identificadas as isoflavonas: daidzina, glicitina e a genistina em maiores concentrações, e suas respectivas formas agliconas, daidzeína, gliciteína e genisteína. Não foi observada diferença estatística entre os teores de isoflavonas totais nas linhagens BRM09-50995 (138,65 mg/100g) e BRM11-51400 (140,75 mg/100g), que apresentaram o maior teor deste composto. A maior capacidade antioxidante pelo método DPPH foi observada na linhagem BRM09-50995 (1072,92 g/g DPPH), enquanto a BRM11-51400 apresentou o resultado mais expressivo quando utilizado o método do radical ABTS. Embora a linhagem BRM09-50995 tenha apresentando os maiores teores de compostos bioativos, com base nos resultados obtidos nesse estudo, verificou-se que as quatro linhagens de soja são adequadas ao consumo humano.

Palavras-chave: *Glycine max*, composição centesimal, compostos fenólicos, antocianinas, atividade antioxidante.

ABSTRACT

PEREIRA, Joana de Novais. **Evaluation of different lines of black soybeans as their physical and chemical characteristics, nutritional and bioactive compounds.** Dissertation (Msc in Food Science and Technology), Institute of Food Technology . Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

The soybean with black coat (*Glycine max* (L.) Merrill) is attracting great interest to consumers and researchers because its consumption is associated with benefits to human health, in part associated with the presence of secondary metabolites, mainly isoflavones and anthocyanins. Embrapa has different strains of black soybeans that need to be assessed not only in relation to their agronomic characteristics, but also suitable for human consumption. Therefore, this study aimed to evaluate and compare four different strains of black soybean developed by Embrapa as the chemical composition, antinutritional factors, content and profile of isoflavones, anthocyanins, amino acids, carotenoids and antioxidant activity measured by DPPH method and ABTS. In respect to composition, there was no statistical difference ($p > 0.05$) between the protein (41.15 to 41.69 g/100) and moisture (from 10.41 to 10.61 g/100 g) in four soybean lines, while the ether extract values (19.12 to 19.79 g/100 g), carbohydrates (33.38 to 34.22 g / 100g) and ash (5.13 to 5.81 g / 100g) varied statistically. The BRM11-51400 was the lineage with the most significant result for mineral as it showed the highest potassium content (2372.89 mg / 100g), most abundant mineral in all samples, phosphorus (753.56 mg / 100g), magnesium (255.32 mg / 100 g) and calcium (257.82 mg / 100). It was also determined the concentration of manganese, zinc, copper, cobalt, selenium, iron and aluminum in significant amounts (9.04 to 11.52 mg / 100g). The higher sucrose content (6.46 g / 100 g) and raffinose (1.56g / 100g) was observed in BRM90-50901 while BRM11-51400 was the strain with the highest concentration of stachyose (5.24g /100g). Phytate varied from 11.91 to 14.88 mg / 100g, respectively. In relation to bioactive compounds, the BRM09-50995 lineage showed the highest levels of total monomeric anthocyanins, total isoflavones and carotenoids. In all three soybean lineages monomeric anthocyanins were identified: cyanidin-3-O-glucoside, majority profile in all samples (262.27 to 720.45 mg / 100g), delphinidin-3-O-glucoside (184.41 to 316.72 mg / 100g) and petunidin-3-O-glucoside (6.34 to 153.06 mg / 100g). The isoflavones daidzein, glycitin, genistein were also identified at higher levels, and their aglycone forms, daidzein, glycitein and genistein. It was not found statistically significant difference between the total isoflavone content in BRM09-50995 lineage (138.65 mg / 100 g) and BRM11-51400 (140.75 mg / 100 g), which had the highest content of this compound. The greater the DPPH antioxidant activity was observed in BRM09-50995 (1072.92 g / g DPPH), while BRM11-51400 showed the most significant results when used in the method of ABTS radical. Based on the results obtained in this study, it was found that the four soybean lineages are suitable for human consumption.

Keywords: *Glycine max*, chemical composition, phenolic compounds, anthocyanins, antioxidant activity

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Aminoácidos essenciais e não essenciais.	5
Tabela 2.	Composição em minerais dos grãos de soja.	6
Tabela 3.	Principais classes e fontes de flavonoides em alimentos.	9
Tabela 4.	Principais antocianinas detectadas em alimentos	11
Tabela 5.	Massas dos padrões de isoflavonas para o preparo das soluções estoque.	25
Tabela 6.	Concentração de isoflavonas (mg/100g) em cada ponto da curva.	25
Tabela 7.	Gradiente de eluição da fase móvel.	26
Tabela 8.	Massa molecular das isoflavonas e fator de conversão dos derivados glicosilados.	27
Tabela 9.	Gradiente de eluição das fases móveis para separação das antocianinas.	28
Tabela 10.	Gradiente de eluição das fases móveis para a separação dos carotenoides.	30
Tabela 11.	Preparo das soluções da curva de DPPH.	31
Tabela 12.	Preparo das soluções para a curva padrão.	32
Tabela 13.	Composição centesimal das linhagens de soja preta.	35
Tabela 14.	Teores de minerais (mg/100g) nas linhagens de soja preta (base seca).	37
Tabela 15.	Teores de açúcares (g/100g) nas linhagens de soja preta (base seca).	41
Tabela 16.	Teores de aminoácidos (g/100g de proteína) nas linhagens de soja preta (base seca).	43
Tabela 17.	Necessidade de aminoácidos essenciais segundo a FAO/WHO (2007) para adultos.	44
Tabela 18.	Teores de fitato nas linhagens de soja preta (base seca).	45
Tabela 19.	Teores de isoflavonas (mg/100g) nas linhagens de soja preta.	47
Tabela 20.	Conteúdo de antocianinas individuais e totais (mg/100g) nas cascas das linhagens de soja preta (base seca).	52
Tabela 21.	Teores de carotenoides (µg/100g) presentes nas linhagens de soja preta (base seca).	54
Tabela 22.	Valores da atividade antioxidante dos extratos das linhagens de soja preta determinada pelos métodos DPPH e ABTS.	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Principais produtores mundiais de grãos de soja.	3
Figura 2.	Grãos de soja preta.	4
Figura 3.	Subdivisão de compostos bioativos presentes em alimentos de origem vegetal.	7
Figura 4.	Estrutura básica dos flavonoides.	8
Figura 5.	Estrutura química dos principais tipos de flavonoides.	8
Figura 6.	Estrutura química de antocianina encontrada em alimentos.	10
Figura 7.	Estrutura química da antocianina cianidina-3-O-glicosídeo.	11
Figura 8.	Estrutura química do 17- β -estradiol e da genisteína.	12
Figura 9.	Estrutura química das isoflavonas presentes no grãos de soja.	13
Figura 10.	Classificação dos compostos antioxidantes.	17
Figura 11.	Estabilização do radical ABTS por um antioxidante e sua formação a partir do persulfato de potássio.	18
Figura 12.	Linhagens de grãos de soja preta avaliadas no estudo.	19
Figura 13.	Farinha de soja preta para análises.	20
Figura 14.	Eluição da fração de fitato com solução de HCl 2,0M.	24
Figura 15.	Padrões de isoflavonas (daidzina, glicitina, genistina, daidzeína, gliciteína e genisteína) SigmaR utilizadas para a construção da curva de calibração.	25
Figura 16.	Extratos de isoflavonas.	26
Figura 17.	Cascas de soja moídas e peneiradas.	27
Figura 18.	Extratos de antocianinas.	28
Figura 19.	Lavagem do extrato (a), extrato de carotenoides (b).	29
Figura 20.	Exemplo da curva de DPPH x absorvância da amostra BRM 09-50682	31
Figura 21.	Exemplo da curva padrão de trolox da amostra BRM 09-50995.	33
Figura 22.	Análise estatística dos teores de umidade, cinzas, extrato etéreo, proteína, carboidratos e valor calórico das linhagens de soja preta	36
Figura 23.	Análise estatística dos teores de minerais nas linhagens de soja preta.	38
Figura 24.	Cromatogramas de sacarose, rafinose e estaquiiose.	41
Figura 25.	Teores de açúcares nas linhagens de soja preta.	42
Figura 26.	Cromatograma (1) e espectros de massa UV das isoflavonas (a) daidzina, (b) Glicitina, (c) Genistina, (d) Daidzeína, (e) Gliciteína e (f) Genisteína.	46

Figura 27.	Teores de antocianinas totais quantificados nas diferentes metodologias testadas.	49
Figura 28.	Espectros de massas exatas (Pico (a): delphinidina-3-O-glicosídeo; Pico (b): cianidina-3-O-glicosídeo; Pico (c): petunidina-3-O-glicosídeo) dos perfis de antocianinas isolados das cascas dos grãos de soja preta.	50
Figura 29.	Estruturas químicas das antocianinas detectadas nas cascas das linhagens de soja preta.	51
Figura 30.	Cromatograma dos extratos de antocianinas à 520 nm das linhagens de soja preta e espectros UV	52
Figura 31.	Cromatograma do extrato de carotenoides à 450nm das linhagens de soja preta (A) e espectros de UV (B).	54
Figura 32.	Atividade antioxidante das linhagens de soja preta determinada pelo método do radical DPPH.	56
Figura 33.	Atividade antioxidante das linhagens de soja preta determinada pelo método do radical ABTS.	57

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Objetivo geral	2
1.2 Objetivo específico	2
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Produção de grãos de soja	3
2.2 Grãos de soja	4
2.3 Compostos fenólicos	6
2.4 Antocianinas	9
2.5 Isoflavonas	12
2.6 Carotenoides	14
2.7 Fatores antinutricionais	15
2.8 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	15
2.9 Atividade antioxidante	16
3 MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1 Materiais	19
3.1.1 Matérias primas	19
3.1.2 Reagentes e solventes	19
3.1.3 Equipamentos	20
3.2 Métodos	20
3.2.1 Moagem dos grãos para análise	20
3.2.2 Composição centesimal	21
3.2.2.1 Análise de umidade	21
3.2.2.2 Análise de proteína	21
3.2.2.3 Análise de extrato etéreo	22
3.2.2.4 Análise de cinzas	22
3.2.2.5 Carboidratos	22
3.2.3 Análise de minerais	22
3.2.4 Análise do perfil de açúcares	22
3.2.5 Análise de aminoácidos	23
3.2.6 Análise de fitato	23
3.2.8 Análise de isoflavonas	24
3.2.9 Análise de antocianinas	27
3.2.10 Análise de carotenoides	29
3.2.11 Determinação da atividade antioxidante pelo método do radical DPPH	30
3.2.11 Determinação da atividade antioxidante pelo método do radical ABTS	32
3.2.12 Análise estatística	34
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1 Composição centesimal	35
4.2 Composição em minerais	37
4.3 Análise de açúcares	40
4.4 Determinação de aminoácidos	42
4.5 Determinação dos teores de fitato	45

4.6 Determinação do teor e perfil de isoflavonas	45
4.7 Determinação do teor e perfil de antocianinas monoméricas totais (AMT)	48
4.8 Determinação do teor e perfil de carotenoides	53
4.9 Determinação da atividade antioxidante	55
5 CONCLUSÕES	59
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

1 INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma leguminosa originária da costa leste da Ásia (CNPQ, 2014) e foi plantada oficialmente no Brasil em 1914, no Rio Grande do Sul devido às condições climáticas favoráveis ao seu desenvolvimento (BONETTI, 1981).

O reconhecimento da soja como um alimento benéfico à saúde deve-se não somente às suas características nutricionais, mas também em relação ao seu consumo estar associado à redução do risco de um grande número de enfermidades como câncer de mama, próstata, doenças coronarianas e na redução dos sintomas da menopausa (ZHANG et al., 2011). Desta forma, um grande aumento do consumo de soja e seus derivados direcionados à alimentação humana foi observado no ocidente após a autorização pelo *Food and Drug Administration* (FDA) do uso de alegações de saúde para alimentos proteicos de soja (USFDA, 1999; BRASIL, 2008).

A relação entre o consumo de soja e os seus benefícios à saúde humana tem sido associada principalmente, às suas características nutricionais quer seja pelo considerável teor de proteína de boa qualidade, o conteúdo significativo de minerais, teores reduzidos de gordura saturada (GRIESHOP, 2001) ou ainda pela presença de alguns metabólitos secundários (PREDDY, WATSON e PATEL, 2011), tais como as isoflavonas.

Um tipo de soja ainda não comum no Ocidente, mas que tem despertado a atenção de pesquisadores e consumidores pelo seu potencial promotor de saúde é a soja preta. A soja com tegumento preto tem sido evidenciada pela mídia devido à presença de compostos antioxidantes promovendo uma crescente demanda por este tipo de produto no mercado brasileiro.

Dentre os metabólitos secundários já reportados no grão de soja preta, a antocianina é considerada o mais importante, não somente por sua presença ser exclusiva no grão com esta coloração de tegumento, mas pelo seu consumo estar relacionado à redução do risco de diversas doenças, atribuída em parte à sua atividade antioxidante (PREDDY, WATSON e PATEL, 2011). Ainda que não exclusivas na soja preta, as isoflavonas, são conhecidas como moduladores hormonais por apresentarem efeito preventivo aos sintomas e às doenças relacionadas a desordens hormonais, como o climatério e osteoporose (REYNOLDS et al., 2006; MESSINA, WATANABE e SETCHELL, 2009).

Neste contexto, carecem informações técnico-científicas sobre a caracterização e utilização da soja preta desenvolvida e plantada no Brasil como matéria-prima na produção dos alimentos de soja.

A Embrapa dispõe de diferentes linhagens de soja preta que com certeza permitirá a obtenção produtos com excelente qualidade. Linhagens avançadas com essas características estão sendo avaliadas pela Embrapa em relação a características de rendimento, resistência às principais doenças para serem recomendadas para cultivo comercial. A partir desses materiais, estudos precisam ser conduzidos relacionados à composição e teores de compostos bioativos, em complementação ao trabalho de melhoramento genético.

Este projeto foi realizado em parceria com a Embrapa Agroindústria de Alimentos, com orientação do Dr Ronoel Godoy e co-orientação a Dra Ilana Felberg, sendo este, parte de um projeto aprovado pelo CNPQ, Edital Universal, MCTI / CNPq nº14/2012 – Classe C, liderado pela Dra Mercedes Concórdia Carrão-Panizzi. As atividades experimentais para o desenvolvimento desta pesquisa foram realizadas em planta-piloto e laboratórios de análise de alimentos na Embrapa Agroindústria de Alimentos, localizada em Guaratiba, Rio de Janeiro.

1.1 Objetivo Geral

Avaliar e comparar diferentes linhagens de soja preta desenvolvidas pela Embrapa quanto às suas características físico-químicas e nutricionais e de compostos bioativos.

1.2 Objetivos específicos

- Caracterizar quatro linhagens de soja preta quanto à composição centesimal, teores de minerais, aminoácidos, açúcares e de fitatos.
- Avaliar os teores e perfil dos compostos bioativos, antocianinas, isoflavonas e carotenoides presentes nas linhagens de soja preta por meio da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência.
- Determinar a atividade antioxidante das linhagens de soja preta pelos métodos de radical DPPH e ABTS.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Produção de grãos de soja

A soja é uma planta herbácea, incluída na classe Dicotyledoneae, ordem Rosales, família Leguminosae e gênero *Glycine L.* (GOMES, 1990). Compreende cerca de quinze diferentes espécies, sendo a *Glycine max* (L.) Merrill conhecida como soja comercial. Esta leguminosa é originária de espécies de plantas rasteiras que se desenvolveram na costa leste da Ásia, principalmente ao longo do Rio Amarelo na China (EMBRAPA, 2012).

Apesar de ser conhecida no Oriente por mais de 5 mil anos, foi no século 20 que os Estados Unidos (EUA) iniciaram a exploração comercial do grão. No entanto, a produção dos grãos de soja apresentou crescimento exponencial apenas a partir dos anos sessenta, não apenas nos EUA, mas também no Brasil e na Argentina (Figura 1) (CNPSo, 2014).

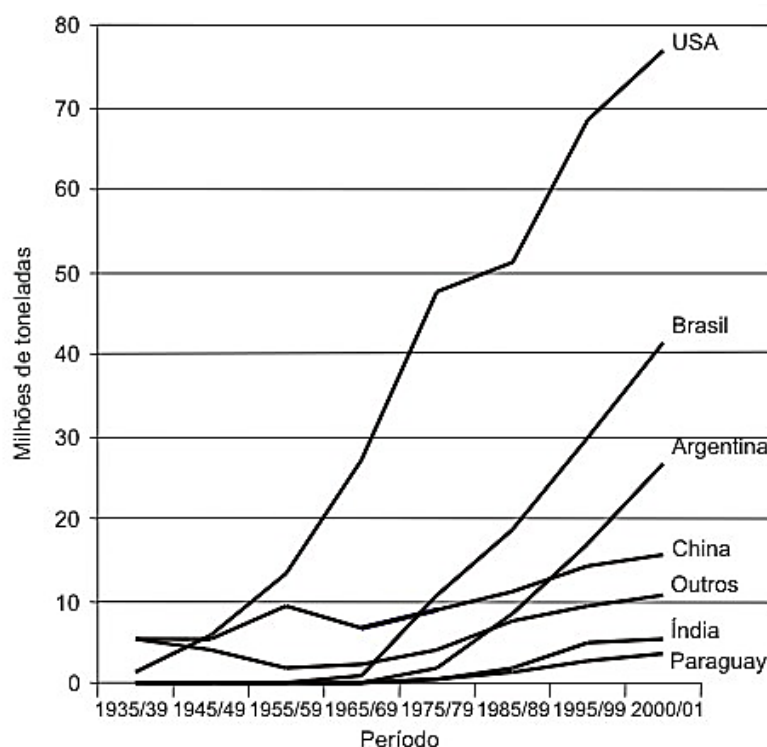


Figura 1. Principais produtores mundiais de soja.

Fonte: Adaptada USDA, 2011.

O primeiro relato sobre o cultivo da soja no Brasil aconteceu em 1882, no estado da Bahia (BLACK, 2000). Em 1891 o grão começou a ser estudado, principalmente em relação às suas características de adaptação, pelo professor da Escola de Agronomia da Bahia Gustavo Dutra (CNPSo, 2014), e no ano de 1908 foi introduzida por imigrantes japoneses na cidade de São Paulo. No entanto, o registro oficial de cultivo do grão no Brasil data de 1914 no Rio Grande do Sul onde, devido às condições climáticas favoráveis, as variedades importadas dos Estados Unidos apresentaram melhores adaptações (BONETTI, 1981).

Na década de 1960, devido à política de subsídios ao trigo, a produção de grãos de soja passou de 206 mil para 1,056 milhões de toneladas, estabelecendo-se, desta forma, como uma cultura economicamente importante para o Brasil. Ainda que tenha ocorrido um significativo crescimento na produção do grão, foi na década de 1970 que a soja consolidou-

se como a mais importante cultura de agronegócio brasileiro, devido principalmente, ao aumento da área cultivada (1,3 para 8,8 milhões de hectares) e ao progressivo incremento da sua produtividade (1,14 para 1,73t/ha) (EMBRAPA, 2012).

Atualmente, considerando a produção mundial de grãos de soja, o Brasil mantém o segundo posto em produção da leguminosa permanecendo apenas atrás dos Estados Unidos, mas com expectativa de superação. A produção brasileira esperada para safra de 2014/2015 é de 95 milhões de toneladas de grãos (USDA, 2015).

2.2 Grãos de soja

Segundo Liu (1999), em relação a sua morfologia, os grãos de soja são formados pela casca ou tegumento (8%), onde se concentram a maior parte das fibras contidas no grão, cotilédones (90%) e hipocótilo (2%) (figura 2) e podem ser classificadas como esféricas, esféricas achatadas, alongada ou alongada achatada (VERNETTI, 1983).

A maior parte dos grãos de soja consumida pelos povos ocidentais apresentam tegumento amarelo, no entanto, outras colorações podem ser observadas incluindo a verde, a marrom e a preta, esta última com teores mais elevados de antocianinas (LIU, 2004).

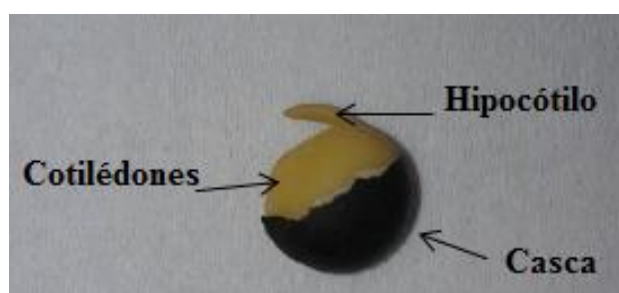


Figura 2. Grão de soja preta.

A composição química da soja depende de diferentes fatores tais como, estágio de maturação, local de plantio, cultivar e condições ambientais de desenvolvimento (LIU, 1999). A literatura é farta em resultados sobre a composição química da soja que apresenta elevados teores de óleo e proteína de boa qualidade, responsáveis pelo valor econômico do grão, podendo estes representar mais de 60% do peso da semente, além dos 35% de carboidratos e 5% de cinzas (HA et al., 2009).

As proteínas são os principais nutrientes estruturais e funcionais de todas as células do corpo e podem atuar como enzimas, como transportadores de membranas, como moléculas sinalizadoras, como hormônios, entre outras funções (FOOD AND NUTRITION BOARD, 2005). Trocar referência.

De acordo com a Resolução nº 18/1999 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), a soja está registrada na categoria de alimentos com propriedades funcionais ou de saúde devido à sua proteína, podendo ser alegado nestes alimentos que "o consumo diário de no mínimo 25 g de proteína de soja pode ajudar a reduzir o colesterol. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis" (BRASIL, 2008).

O valor nutritivo de uma proteína não depende somente do seu conteúdo quantitativo, mas principalmente da qualidade, disponibilidade e digestibilidade de seus aminoácidos

(SGARBIERI, 1996). Os aminoácidos constituem as unidades básicas das proteínas e dos polipeptídeos. São moléculas que apresentam um carbono quiral ligado a uma carboxila (-COOH), uma amina (-NH₂), um hidrogênio e uma cadeia lateral específica para cada aminoácido. Em relação à sua função no organismo humano, servem como precursores de ácidos nucleicos, hormônios, vitaminas e de outras moléculas imprescindíveis à vida (SGARBIERI, 1996).

Do ponto de vista nutricional, os aminoácidos são classificados como aminoácidos essenciais, por não serem sintetizados pelo organismo humano, sendo necessário o seu fornecimento através da dieta ou como não essenciais, aqueles produzidos em quantidades suficientes pelo organismo (Tabela 1).

Tabela 1. Aminoácidos essenciais e não essenciais.

Aminoácidos essenciais	Aminoácidos não essenciais
Histidina	Alanina
Isoleucina	Arginina
Leucina	Asparagina
Lisina	Ácido aspártico
Metionina	Cisteína
Fenilalanina	Ácido glutâmico
Treonina	Glutamina
Triptofano	Glicina
Valina	Prolina
	Serina
	Tirosina

Fonte: VIEIRA et al. (1999).

Os triglicerídeos, formados por ácidos graxos e glicerol, são os principais constituintes da fração lipídica dos grãos de soja (LAWSON, 1995). Por apresentarem baixos teores de ácidos graxos saturados ($\pm 15\%$ do total) e elevados de ácidos graxos insaturados ($\pm 85\%$ do total) o óleo de soja é considerado benéfico à saúde humana. Segundo Slavin e colaboradores (2009), de forma geral, a composição de ácido graxos nos grãos de soja consiste em 53% de ácido linoleico (C18:2) e 7% de ácido linolênico (C18:3), considerados ácidos graxos essenciais por não serem sintetizados pelo organismo, 11% de ácido palmítico (C16:0), 4% de ácido esteárico (C18:0) e 24% de ácido oleico (C18:1), podendo variar, principalmente quanto aos teores de ácido palmítico, oleico e α -linolênico.

Considerando o teor de carboidrato, a soja contém em base seca, aproximadamente 35% de carboidratos. Por outro lado, a sacarose representa 60% do total de açúcares solúveis presentes nestas sementes, enquanto a rafinose e a estaquiase são os oligossacarídeos mais abundantes (NEUS et al., 2005).

Segundo Liu e colaboradores (1999), ainda que sejam responsáveis por algumas características indesejáveis por estarem associados à flatulência (produção de gases), dependendo da microflora do trato intestinal do indivíduo estes oligossacarídeos também são responsáveis pela proliferação de alguns microrganismos probióticos como o *Bacillus bifidus* no trato gastrointestinal humano (TSANGALIS & SHAH, 2004), os quais resultam em benefícios fisiológicos como a redução da microbiota nociva e redução dos níveis séricos de

lipídios (CUMMINGS & MACFARLANE, 2002; MARTEAU & BOUTRON-RUAULT, 2002, OLIVEIRA et al., 2010).

Os teores de minerais presentes na soja dependem das condições ambientais de desenvolvimento, principalmente em relação a composição em minerais do solo utilizado no plantio dos grãos (KARR-LILIENTHAL et al., 2004). Segundo Kagawa e colaboradores (1995), esta leguminosa é constituída, principalmente, de potássio, fósforo, cálcio e magnésio (tabela 2), com destaque para o teor mais elevado de potássio, responsável pela manutenção do equilíbrio eletrolítico do tecido (JAFFE, 1981; LIENER, 1994; MOHAMED et al., 1991).

Tabela 2. Composição em minerais dos grãos de soja.

Minerais	Teores (mg/100g)
Cálcio	240
Fósforo	580
Ferro	9,4
Sódio	1
Potássio	1900
Magnésio	220
Zinco	3,2
Cobre	0,98

Fonte: KAWAGA, et al. (1995).

As diferentes pigmentações dos grãos de soja se devem à presença de componentes como as antocianinas, clorofila e ainda produtos de decomposição desses pigmentos naturais nos tegumentos das sementes (TODD & VODKIN, 1993).

A soja preta, conhecida pela coloração escura de seu tegumento (DUENAS & HERNANDEZ, 2006) proveniente da presença de antocianina na camada da epiderme da casca da semente (HE et al., 2010) têm sido utilizada por centenas de anos na medicina tradicional chinesa.

Recentemente, estudos sobre as atividades biológicas da soja preta têm crescido significativamente, especialmente quanto à investigação dos seus perfis e teores de antocianinas, uma vez que estes compostos bioativos estão relacionados com a redução do risco de diversas doenças, atribuída, em parte, à sua atividade antioxidante (PREDDY, WATSON & PATEL, 2011).

2.3 Compostos fenólicos

Além da dieta diária oferecer os macro e micronutrientes essenciais, responsáveis pelo bom funcionamento do organismo, também disponibiliza alguns componentes químicos, conhecidos como compostos bioativos ou fitoquímicos que exercerem diferentes funções em benefício à saúde humana (CARRATU & SANZINI, 2005). Ainda que apresentem variações em relação as suas estruturas químicas e conseqüentemente em suas funções biológicas, estes compostos podem apresentar algumas características em comum: fazem parte da composição dos alimentos de origem vegetal, são substâncias orgânicas de baixa massa molecular e não

podem ser sintetizados pelo organismo humano, sendo fundamental a sua ingestão através da dieta (HORST & LAJOLO, 2009).

Os compostos bioativos são metabólitos secundários que além de estarem relacionados com aos sistemas de defesa das plantas contra a radiação ultravioleta ou ainda com a proteção às agressões de insetos e patógenos, são responsáveis pela pigmentação e por algumas características sensoriais dos alimentos (MANACH et al., 2004). Por existirem em grande número, podem ser subdivididos em grupos como é apresentado na Figura 3.

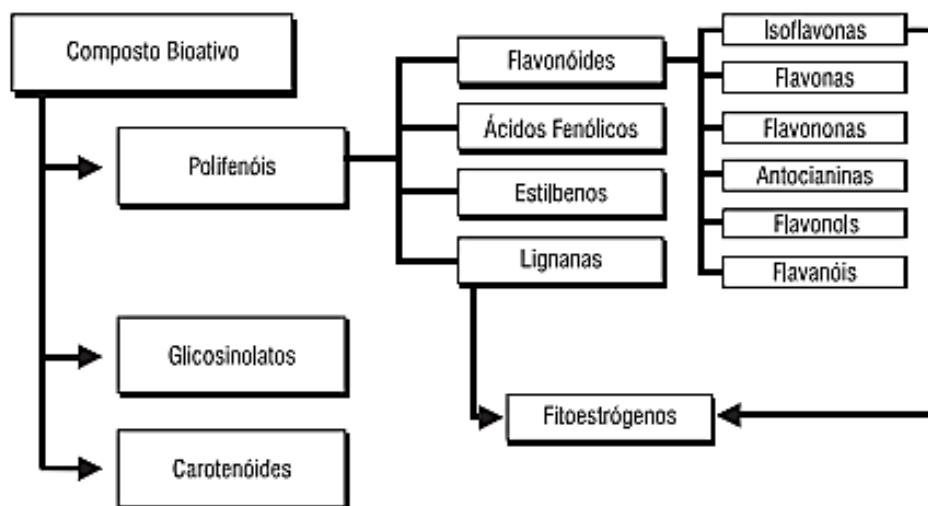


Figura 3. Subdivisão de compostos bioativos presentes em alimentos de origem vegetal.

Fonte: HORST & LAJOLO (2009).

Os compostos fenólicos apresentam uma estrutura química comum derivada do benzeno que se encontra ligada a uma hidroxila. Dependendo de sua estrutura e da forma como os anéis polifenólicos se ligam uns aos outros, estes podem ser classificados em quatro diferentes famílias: flavonoides, ácidos fenólicos, lignanas e estilbenos. Os compostos fenólicos têm recebido especial atenção de pesquisadores principalmente, devido o seu consumo estar associado à atividade antioxidante dos alimentos, modulação da atividade de algumas enzimas específicas, inibição da proliferação celular, bem como ação antibiótica, antialérgica, e anti-inflamatória (MANACH et al., 2004).

Dentre os diversos compostos fenólicos já identificados, os flavonoides representam um dos grupos de metabólitos secundários mais importantes nos alimentos de origem vegetal. Estes compostos são substâncias naturais que apresentam estrutura básica de quinze átomos de carbono (C₁₅), formado por um esqueleto de difenilpropano (C₆-C₃-C₆), dois anéis benzênicos (A e B) ligados por três átomos de carbono e um átomo de oxigênio formando o núcleo flavano (Figura 4).

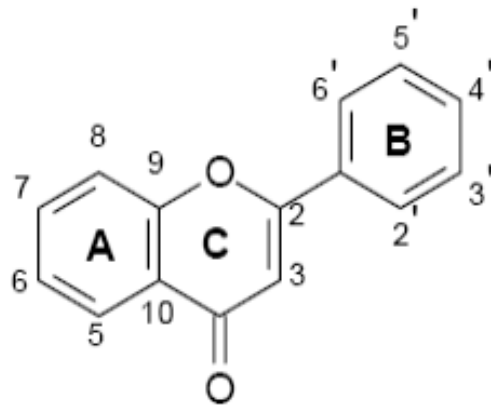


Figura 4. Estrutura básica dos flavonoides.
 Fonte: PEREIRA & VILEGAS (2000).

Dependendo do grau de oxidação e do padrão de substituição do anel C os flavonoides podem ser subdivididos em quatorze diferentes classes, incluindo os seis grupos mais frequentemente relatados em alimentos: flavanóis, flavonóis, flavonas, antocianidinas, isoflavonóides e flavononas (Figura 5) (YILMAZ & TOLEDO, 2004).

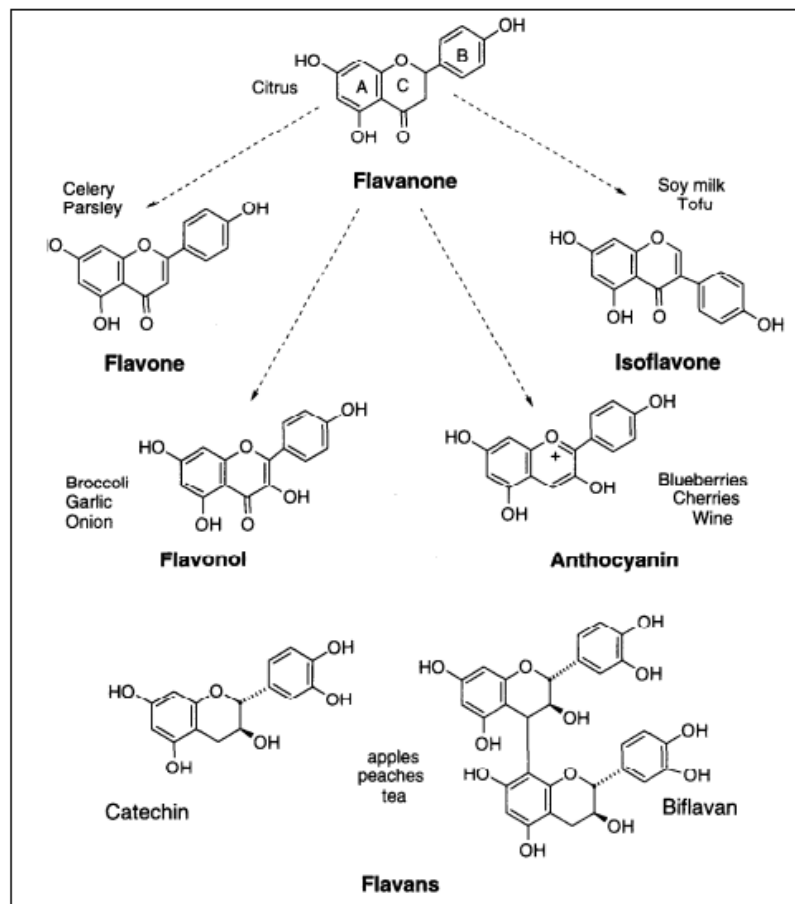


Figura 5. Estrutura química dos principais tipos de flavonoides.
 Fonte: PETERSON & DWYER (1998).

O termo “flavonoide” é derivado do latim *flavus*, que significa amarelo. Desta forma, os grupos flavonoides e flavonas são, em sua maioria, incolores ou amarelo pálido, enquanto a classe das antocianinas apresenta coloração que pode variar do verde ao azul (Tabela 3).

Tabela 3. Principais classes e fontes de flavonoides em alimentos.

Classes	Coloração	Exemplos	Fontes
Antocianinas	Azul, vermelha e violeta	Cianidina, Delfinidina e Petunidina	Predominantes em frutas e flores.
Flavanas	Incolor	Catequina, Epicatequina, Luteoforol, Procianidina, Theaflavina	Encontradas em frutas e chás (verdes ou pretos).
Flavanonas	Incolor para um amarelo pálido	Hesperidina, Naringenina	Encontradas quase que exclusivamente em frutas cítricas.
Flavonas	Amarelo pálido	Apiagenina, Luteolina, Diosmetina, Tangeretina, Nobiletina	Encontradas quase que exclusivamente em frutas cítricas.
Flavonóis	Amarelo pálido	Quercetina, Rutina, Miricetina, Kaempferol	Predominantes em vegetais e frutas.
Isoflavonóis	Incolor	Daidzeína, Genisteína	Encontrados em maiores concentrações nas leguminosas, principalmente nos grãos de soja.

Fonte: LÓPEZ et al. (2000).

2.4 Antocianinas

As antocianinas são os principais flavonoides presentes nas cascas dos grãos de soja preta e estão diretamente relacionadas à uma série de atividades biológicas incluindo anti-inflamatória, antioxidante entre outras (MATSUI et al., 2001). O termo “antocianina”, derivado do grego de flor e azul (*anthos* = flores; *Kianos* = azul) foi criado em 1853 por Marquart para se referir aos pigmentos azuis, característicos de algumas flores (BROUILLARD, 1982).

As antocianinas constituem grupos de pigmentos solúveis em água responsáveis pela maioria das cores azul, roxo, violeta, magenta, vermelha e laranja de diversas flores e vegetais

(DAMODARAN et al., 2008). Diferentemente das clorofilas e carotenoides a absorção das antocianinas compreende toda a região visível do espectro eletrônico (400-700 nm). Segundo Tanaka, Sasaki e Ohmiya (2008), as antocianinas se diferenciam entre si de acordo com o número e com a posição dos grupos metilados e hidroxilados que se encontram ligados à estrutura básica do cátion flavílium (Figura 6).

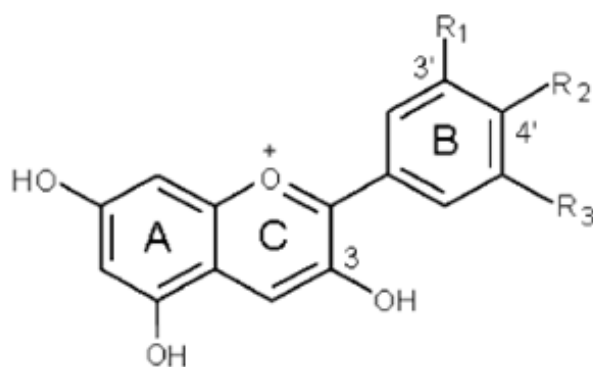


Figura 6. Estrutura química da antocianina encontrada em alimentos.
Fonte: Wu et al., (2006).

Bioquimicamente, as antocianinas são derivadas das antocianidinas, um componente químico que não apresenta em sua estrutura grupos glicosídeos e a maior parte possui hidroxilas localizadas na posição 3, 5 e 7. Nas antocianinas, por sua vez, uma ou mais dessas hidroxilas se encontram ligadas à açúcares sendo os mais comuns a glicose, xilose, arabinose, ramnose e a galactose ou ainda à dissacarídeos constituídos por estes açúcares (HARBONE, 1994), conferindo maior solubilidade e estabilidade a estes pigmentos quando comparados com as antocianidinas (TERCI, 2004).

No entanto, a forma química das antocianinas dependem do pH da solução em que se encontram. Quando em pH ácido, em torno de 1,0, sua estrutura se apresenta na forma de cátion flavílium (2-fenilbenzopirílium), de coloração vermelha, enquanto em pH entre 2,0 e 4,0, a forma de base quinoidal é predominantemente azul. Já quando o meio apresenta pH entre 4,5 e 6,0, as antocianinas sofrem desprotonamento constituindo as formas carbinol e chalcona que são incolores. As chalconas podem ainda apresentar coloração levemente amarela. A degradação das antocianinas ocorre normalmente em pH acima de 7 (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009).

Há uma enorme variedade desses compostos distribuídos na natureza, sendo identificadas até o momento, aproximadamente, 539 antocianinas (FERNANDES et al., 2013) das quais seis são mais frequentes em alimentos: pelargonina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina, e malvidina (Tabela 4) (FRANCIS, 2000). A distribuição das seis antocianinas mais frequentes nos alimentos segue a seguinte proporção: cianidina (50%), petunidina (7%), e malvidina (7%), pelargonina, delphinidina e peonidina (cada uma com 12%) (CARVALHO et al., 2010).

Tabela 4. Principais antocianinas detectadas em alimentos.

Antocianidina	C3	C5	Cores
Delfinidina	OH	OH	Azul e roxa
Cianidina	OH	H	vermelha e carmim
Pelargonidina	H	H	laranja e salmão
Peonidina	OCH3	H	Roxa
Petunidina	OCH3	OH	Vermelha
Malvidina	OCH3	OCH3	Vermelha

Fonte: FRANCIS (2000).

O perfil de antocianinas presente nas cascas dos grãos de soja preta pode ser bastante variável, no entanto, a delfinina-3-O-glicosídeo, a petunidina-3-O-glicosídeo e a cianidina-3-O-glicosídeo, forma majoritária em soja preta (figura 7), são as formas mais frequentemente detectadas neste grão.

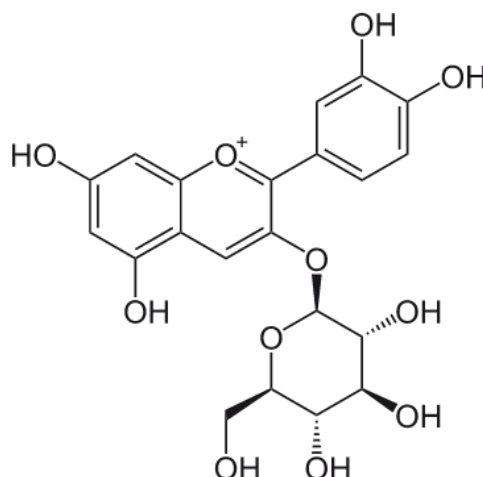


Figura 7. Estrutura química da antocianina cianidina-3-O-glicosídeo.

Choung e colaboradores (2001) identificaram, nas cascas de dez variedades de soja preta, três diferentes antocianinas: a delfinina-3-O-glicosídeo, a petunidina-3-O-glicosídeo e a cianidina-3-O-glicosídeo em concentração mais elevada.

No entanto, estudo realizado por Lee e colaboradores (2009) foi o primeiro a documentar a presença de nove antocianinas em uma variedade de soja preta, incluindo a pelargonidina-3-O-glicosídeo, cianidina, catequina-cianidina-3-O-glicosídeo, delfinidina-3-O-galactosídeo, cianidina-3-O-galactosídeo, peonidina-3-O-glicosídeo, delfinidina-3-O-glicosídeo, petunidina-3-O-glicosídeo e a cianidina-3-O-glicosídeo. Foi identificado, por Cho e colaboradores (2013), o mesmo perfil de antocianinas em cinco cultivares de soja preta, não sendo observada presença deste composto nos grãos de soja com tegumento amarelo, preto e marrom, também avaliados por estes autores.

Estudos realizados *in vitro* e *in vivo* determinam que as antocianinas presentes nas cascas dos grãos de soja preta atuam como agentes antioxidantes, reduzindo os danos celulares causados pelos radicais livres presentes no organismo humano. Xu e Chang (2008) investigaram a capacidade antioxidante do grão de soja preta integral, do grão descascado e

das cascas das sementes em relação aos seus respectivos teores de isoflavonas, antocianinas e fenólicos totais e determinaram que as cascas dos grãos de soja preta contribuíram com 90% da capacidade antioxidante total do grão de soja, devido, principalmente à presença exclusiva de antocianinas na casca dos grãos com esta coloração de tegumento.

Takahashi e colaboradores (2005) afirmam que a ingestão diária de antocianinas presentes nos grãos de soja preta auxilia na redução do colesterol e triglicerídeos sanguíneos, na inibição de oxidação de LDL e na diminuição do risco de doenças cardiovasculares, em parte associado com a reconhecida capacidade antioxidante destes compostos. Outro estudo realizado por Kim e colaboradores (2011) determinou que o extrato de soja preta também apresenta importante ação inibitória sobre a agregação plaquetária e contra o desenvolvimento de doenças trombóticas.

2.5 Isoflavonas

Ainda que não exclusivas na soja preta, as isoflavonas, são fitoestrógenos presentes no broto de alfafa (*Medicago sativa*), trevo vermelho (*Trifolium pratensis* L.), semente de linhaça (*Linum usitatissimum*) e kudzu (*Pueraria lobata*) (COWARD *et al.*, 1993; LIU, 1999; BARNES *et al.*, 2006), apesar de serem encontradas em teores mais elevados nas sementes de soja (0,1 a 5 mg/g) (MESSINA, 2009). No entanto, segundo Kudou e colaboradores (1991) a concentração e o perfil de isoflavonas dependem da parte do grão avaliada, uma vez que foi observado por estes autores que o teor de isoflavonas totais no hipocótilo é de 5,5 a 6 vezes superior à do cotilédone, e que a gliciteína e seus derivados são detectados exclusivamente no hipocótilo do grão.

São compostos provenientes do metabolismo secundário das plantas e apresentam massa molar e distância equivalente (11,5Å) entre as hidroxilas 4' e 7 semelhante ao 17- β -estradiol (DIXON & FERREIRA, 2002; CASSIDY *et al.*, 2006) (Figura 8).

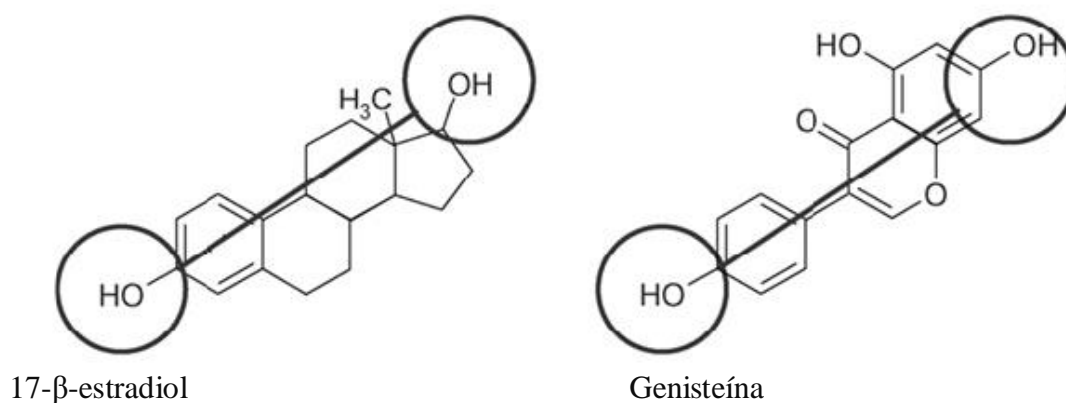


Figura 8. Estrutura química do 17- β -estradiol e da genisteína.
Transcrito de WUTTKE *et al.* (2007).

Dados experimentais e clínicos apontam que as isoflavonas além de serem consideradas uma alternativa promissora na redução do risco de muitas doenças hormônio-dependentes, incluindo câncer de mama, sintomas da menopausa, doenças cardiovasculares e

osteoporose (BARBOSA et al., 2006), são consideradas o principal composto com propriedades antioxidantes presente nos cotilédones e hipocótilo do grão de soja (WEI et al., 1995; MIYAZAWA et al., 1999).

São encontrados, nas sementes de soja, basicamente três tipos de isoflavonas que se apresentam normalmente em quatro diferentes formas químicas, somando assim 12 formas diferentes: as agliconas (daidzeína, genisteína e gliciteína), os β -glicosídeos (daidzina, genistina e glicitina); os derivados glicosilados acetilados (6''-O-acetildaidzina, 6''-O-acetilgenistina e 6''-O-acetilglicitina) e os derivados malonilados (6''-O-malonildaizina, 6''-O-malonilgenistina e 6''-O-malonilglicitina) (Figura 9) (PARK et al, 2002), sendo a daidzeína, genisteína e a gliciteína as principais isoflavonas encontradas nesta leguminosa (SETCHELL, 1998).

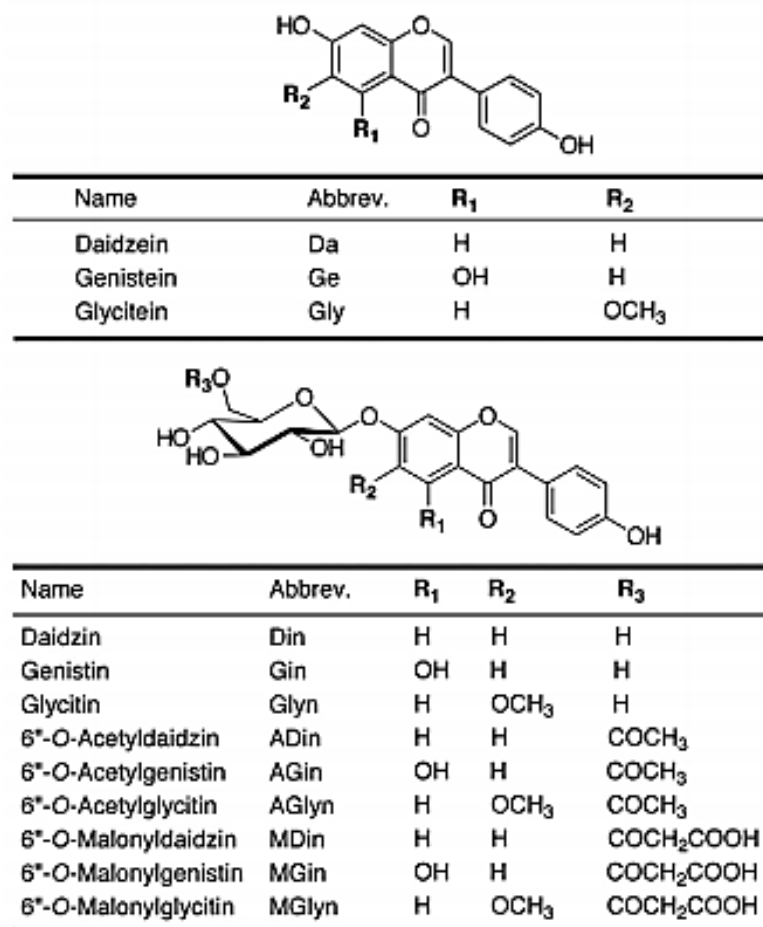


Figura 9. Estrutura química das isoflavonas presentes no grão de soja.

Fonte: PARK et al. (2002).

Xu e Chang (2008) avaliaram o perfil e os teores de isoflavonas presentes nos grãos integrais de soja preta, nos grãos descascados, assim como nas cascas das sementes. Onze isoflavonas (daidzina, genistina, glicitina, malonildaizina, malonilgenistina, malonilglicitina, acetildaidzina, acetilgenistina, acetilglicitina, daidzeína e genisteína) foram detectadas em todas as amostras analisadas. Os grãos de soja descascados apresentaram as maiores concentrações de isoflavonas totais (99,31 mg/100g), seguidos pelos grãos integrais (96,01 mg/100g) e cascas de soja preta (47,75 mg/100g). Diferenças consideráveis nos teores de isoflavonas individuais e totais presentes em grãos de soja com diferentes colorações de tegumentos (amarelo, verde, marrom e preto) foram registradas em pesquisa realizada por

Cho e colaboradores (2013). Os autores avaliaram as formas e concentrações das isoflavonas em duas safras. Os maiores teores de isoflavonas totais foram detectados nos grãos de soja com tegumento verde (307,942 mg/100g) seguido pelo amarelo (239,34 mg/100g), preto (237,94 mg/100g) e marrom (182, 18 mg/100g). Foi ainda observado que o conteúdo de isoflavonas nos grãos de soja da mesma cultivar, plantados no mesmo local, variaram de ano para ano devido às diferentes condições ambientais de desenvolvimento.

Em relação à função deste composto no organismo humano, segundo Park e colaboradores (2002), algumas isoflavonas, principalmente a genisteína, são capazes de controlar o crescimento de células tumorais. Foi observada, em pesquisa realizada por Matsuda e colaboradores (1994), maior capacidade de redução da velocidade de crescimento de células cancerosas na próstata humana associada, principalmente, à presença desta isoflavona no organismo. Além disso, foi reportado por Onozawa e colaboradores (1998), que a atividade antioxidante da genisteína e de outras isoflavonas agliconas foi superior às isoflavonas glicosiladas. Entretanto, segundo Rowland e colaboradores (2003), ainda que as agliconas sejam a forma biologicamente ativa das isoflavonas devido à sua maior hidrofobicidade e peso molecular reduzido, os glicosídeos podem ser hidrolisados durante o processo de digestão, sendo desta forma, absorvidos pelo organismo humano de forma similar às agliconas.

2.6 Carotenoides

Os carotenoides são pigmentos naturais lipossolúveis sintetizados por diversas plantas e microrganismos (VILLELA, 1976). São considerados substâncias bioativas por apresentarem efeitos benéficos à saúde humana (RODRIGUEZ-AMAYA et al., 2008) e encontram-se amplamente distribuídos na natureza, conferindo coloração característica à diversas flores, frutas e vegetais. São constituídos por dois grandes grupos, denominados carotenos, formados por hidrocarbonetos e as xantofilas, hidrocarbonetos que possuem grupos funcionais oxigenados (MALDONADE, 2003).

Embora sejam micronutrientes disponíveis em níveis relativamente baixos nos alimentos (RODRIGUEZ-AMAYA et al., 2008), alguns carotenoides, principalmente o β -caroteno são precursores de vitamina A (SASS-KISS et al., 2005), podendo a sua ingestão auxiliar no combate à deficiência desta vitamina (KRINSKEY, 1994).

Estudos epidemiológicos afirmam que os carotenóides, além de estarem associados à diminuição do risco de doenças crônico-degenerativas, alguns tipos de câncer e doenças cardiovasculares (MACHLIN, 1995), também desempenham um importante papel na prevenção de doenças associadas aos processos de estresse oxidativo (RIBEIRO & SERAVALLI, 2004), uma vez que apresentam capacidade sequestrante de oxigênio singlete que pode ocorrer de duas formas: por transferência física de energia de excitação do oxigênio singlete para o carotenoide ou por meio de uma reação química entre o oxigênio singlete e o carotenoide (RODRIGUEZ-AMAYA et al., 1999).

Segundo Fontana e colaboradores (2000), a ordem crescente de capacidade sequestrante do oxigênio singlete por parte dos carotenos e xantofilas segue a seguinte ordem: licopeno, astaxantina ou cantaxantina, β -caroteno ou bixina, luteína e crocina.

Em um único trabalho encontrado na literatura, Slavin e colaboradores (2009) analisaram a concentração de carotenoides totais e individuais (criptoxantina, luteína, zeaxantina) presentes em cinco cultivares de soja preta. Os teores de carotenoides totais variaram de 9,13 a 2,23 $\mu\text{mol/g}$. Em relação aos teores individuais, a luteína foi o carotenoide

majoritário (1256,0 a 5142,0 µg/g), seguido pela zeaxantina (4,6 a 104,8 µg/g) e criptoxantina (0,1 a 24,1 µg/g).

2.7 Fatores antinutricionais

Apesar de seu reconhecimento como alimento vegetal de excelente fonte proteica, lipídica e componentes biologicamente ativos, a soja apresenta em sua composição fatores antinutricionais como os fitatos e os inibidores de tripsina, entre outros, que dependendo de sua concentração podem comprometer a biodisponibilidade de alguns nutrientes essenciais ao organismo humano (SGARBIERI, 1996).

Os inibidores de proteases são proteínas amplamente distribuídas no reino vegetal (DAMODARAN, 1987) e foram identificados inicialmente, em grãos de soja, por Read e Haas em 1938 (KUNITZ, 1945). São capazes de promover a inibição das enzimas tripsina, quimiotripsina, amilase e carboxipetidase (XAVIER-FILHO & CAMPOS, 1989), responsáveis por promoverem a hidrólise de ligações peptídicas em peptídeos de tamanhos mais reduzidos (SILVA & SILVA, 2000).

Segundo Wilcke e colaboradores (1979), a correta destruição dos inibidores de tripsina através de tratamentos térmicos proporciona grãos de soja e produtos dele derivados com excelente qualidade nutricional. No entanto, a necessidade de manter as características nutritivas originais, principalmente as propriedades funcionais de sua proteína, pode dificultar o uso de elevadas temperaturas durante o seu processamento, favorecendo desta forma, a permanência de 5 a 20% da atividade do inibidor de tripsina originalmente presente na soja bruta (RACKIS & GUMBMANN, 1982).

Outro composto considerado antinutricional em grãos de soja é o ácido fítico, também conhecido como fitato. É um componente de ocorrência natural nos alimentos formado durante o processo de maturação de grande parte das sementes e cereais (TORRE et al., 1991). Apresenta estrutura química cíclica formada por seis grupamentos de fosfato, podendo ser detectado em grãos de soja em uma concentração que pode variar de 1 a 2,3% (ISANGA & ZHANG, 2008).

O ácido fítico pode ser parcialmente desfosforilado, por ação de fitases endógenas, em compostos pentafosfato (IP⁵), tetrafosfato (IP⁴), trifosfato (IP³), inositol difosfato (IP²) e monofosfato (IP¹) (BURBANO et al., 1995), sendo o IP⁵ e IP⁶ os principais responsáveis pelos efeitos negativos na biodisponibilidade de alguns minerais, principalmente o cálcio, o magnésio, o zinco e o ferro (SANDBERG et al., 1989).

Por ser considerado um composto termoestável, o uso de técnicas de fermentação pode ser uma boa alternativa para o decréscimo dos teores de fitato em grãos de soja processados. No entanto, segundo Omosiye e Cheryan (1979) para que a sua redução neste alimento represente cerca de 95% em relação a sua concentração inicial, a utilização de métodos de ultrafiltração e cromatografia de troca iônica pode ser mais eficiente.

2.8 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

O termo “cromatografia (*Chrom* = cor e *graphie* = escrita) foi inicialmente empregado em 1906 e sua utilização está ligada ao botânico Russo Mikael Semenovich Tswett ao descrever suas pesquisas que visavam a separação de componentes presentes em extratos de folhas. Nesse estudo, a passagem do éter de petróleo, utilizado como fase móvel

através de uma coluna de vidro preenchida com carbonato de cálcio (fase estacionária), à qual se adicionou o extrato, levou a separação dos componentes em faixas coloridas (POPPI, 2008).

Desde o início da utilização técnica de cromatografia líquida (CL) em 1950, muitos avanços foram alcançados permitindo o desenvolvimento de várias partículas de fase estacionárias (FE) que permitiram o desenvolvimento de colunas mais seletivas, eficientes e estáveis quimicamente possibilitando uma melhor técnica de separação. Nos últimos anos, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem sido a técnica analítica mais estudada e empregada em laboratórios de análise de alimentos e atualmente é a técnica mais utilizada para a realização da separação de antocianinas presentes nos alimentos, uma vez que esta técnica faz uso de instrumentos sofisticados que podem ser totalmente automatizados (POPPI, 2008).

A CLAE é um tipo de cromatografia líquida que emprega colunas fechadas recheadas de materiais especialmente preparados e uma fase móvel que é eluída a altas pressões, apresentando a capacidade de realizar separações de uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras em uma escala de tempo curto, com alta resolução, eficiência e sensibilidade. Além de permitir excelente separação, esta técnica ainda possibilita a identificação e quantificação de pigmentos antociânicos sem requerer purificação excessiva dos extratos analisados (COLLINS, 2006).

O processo de separação por CLAE consiste na partição de componentes de uma mistura entre a fase móvel e a fase estacionária, que no caso da cromatografia líquida, o fluido é constituído por um solvente e a fase estacionária é constituída de partículas sólidas empacotadas em uma coluna a qual atravessa a fase móvel. A retenção dos solutos sobre a coluna cromatográfica ocorre devido à atuação das forças físicas e químicas entre os solutos e as duas fases utilizadas. É a diferença na magnitude dessas duas forças que irá determinar a resolução e assim, a qualidade da separação dos solutos individuais. Por isso, possíveis variáveis que podem interferir nessas forças intermoleculares poderão influenciar diretamente o grau de separação obtido através da passagem dos solutos pela coluna cromatográfica (COLLINS et al., 1993).

Após a separação dos componentes presentes em alimentos e plantas é realizada a sua identificação através da comparação com padrões que pode ser feita de forma direta, quando o padrão encontra-se disponível ou segundo Harborne (1988), feita comparando cuidadosamente os resultados obtidos com dados da literatura.

Entre os diversos métodos utilizados nas análises de alimentos, a CLAE tem sido reconhecida como o método analítico mais eficaz na identificação e quantificação de inúmeros componentes presentes nos grãos de soja preta, incluindo: as isoflavonas, antocianinas, fenólicos totais, flavonoides, aminoácidos, carotenóides e açúcares (XU & CHANG, 2008; SLAVIN et al., 2009; ZHANG et al., 2011; CHO et al., 2013).

2.9 Atividade antioxidante

Os radicais livres são átomos ou moléculas que apresentam um ou mais elétrons não pareados em seus orbitais externos, tornando-os altamente reativos. Estes são continuamente produzidos nos processos metabólicos e atuam como mediadores na transferência de elétrons em diversas reações bioquímicas (MÉNDEZ FILHO & RODRÍGUEZ, 1997). São exemplo de radicais livres o superóxido ($O_2^{\cdot-}$), a hidroxila (OH^{\cdot}), o hidroperóxido (HO_2^{\cdot}), o óxido nítrico (NO^{\cdot}) e o dióxido de nitrogênio (NO_2^{\cdot}) (BIANCHI & ANTUNES, 1999).

Um antioxidante é definido como uma substância que mesmo em baixas concentrações é capaz de retardar ou prevenir o processo de oxidação do substrato. No entanto, para ser considerado como agente antioxidante, o composto deve apresentar algumas características obrigatórias: a presença de substituintes que sejam capazes de doar elétrons ou hidrogênio ao radical livre; apresentar capacidade de deslocamento do radical formado em sua estrutura; capacidade de quelar metais de transição relacionados ao processo oxidativo; ter fácil acesso ao local da ação, dependendo da sua hidrofília ou lipofília e de seu coeficiente de partição (MANACH et al., 2004).

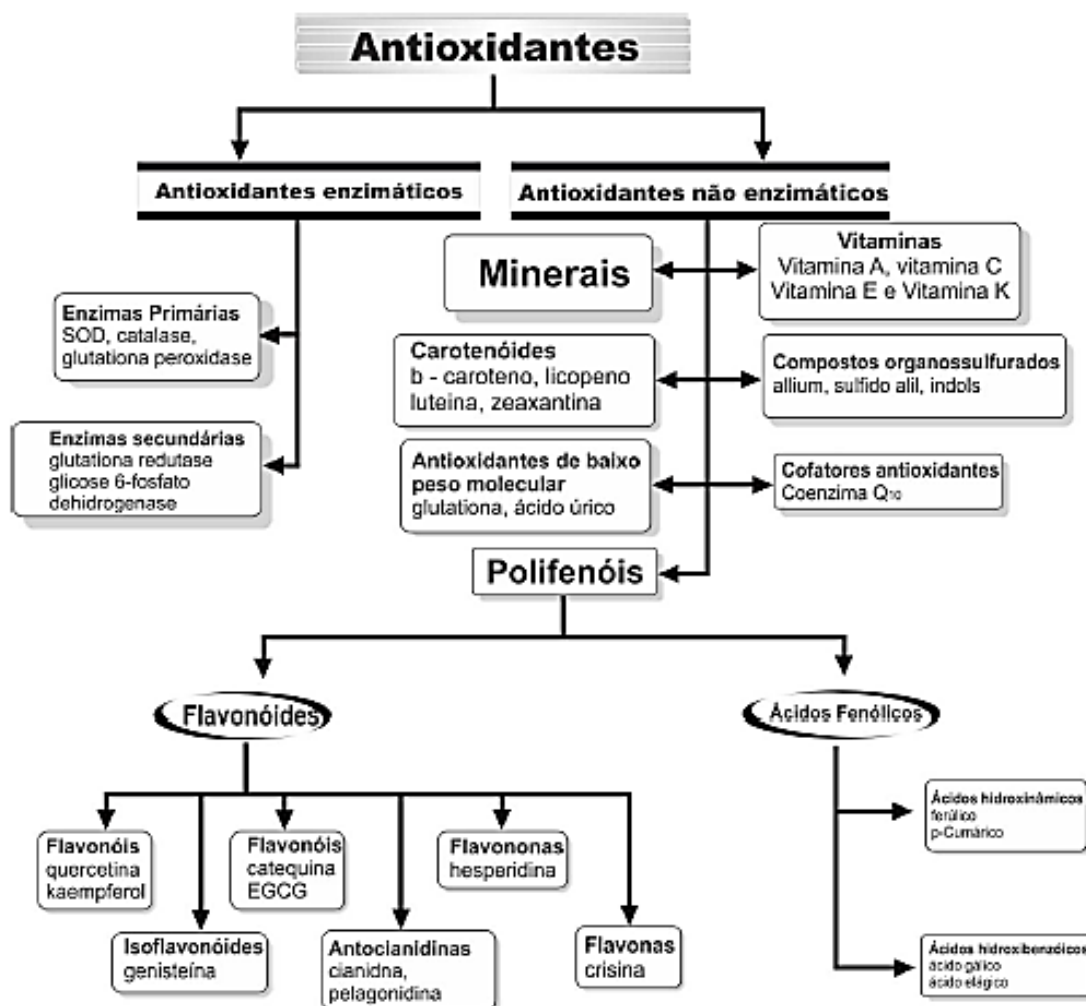


Figura 10. Classificação dos compostos antioxidantes.

Fonte: RATNAM (2006).

O consumo de alimentos com propriedades antioxidantes pode produzir ação protetora contra os processos oxidativos que ocorrem no organismo. De acordo com Halliwell (1996), a ação defensiva dos antioxidantes naturais presentes nos alimentos está relacionada à presença de compostos como os tocoferóis, vitamina C, carotenóides e compostos fenólicos (figura 10).

A avaliação dos efeitos biológicos de um alimento depende, em parte, da determinação de sua capacidade antioxidante. Vários parâmetros podem ser utilizados para expressar a capacidade antioxidante de matrizes complexas (CAO & PRIOR, 1999), incluindo a remoção de um radical peróxil (ORAC - oxygen radical absorbance capacity, TRAP - total reactive

antioxidant potential), a capacidade de redução de metal (FRAP - ferric reducing antioxidant power, CUPRAC - cupric ion reducing antioxidant capacity), a capacidade de remoção de radical orgânico (ABTS - 2,20-azino-bis (ácido 3-ethylbenzthiazoline-6-sulfônico), DPPH - peroxidação do 2,2-difenil-1-picrylhydrazil) e a quantificação dos produtos sintetizados durante a peroxidação de lipídeos (TBARS, a oxidação do LDL, co-oxidação do β -caroteno) (SANCHEZ-MORENO, LARRAURI & SAURA-CALIXTO, 1998). O método do radical ABTS é extensivamente utilizado na determinação da atividade antioxidante de compostos de natureza lipofílica e hidrofílica e se baseia na formação do radical $ABTS^{+\bullet}$ que apresenta coloração característica de azul esverdeado devido à reação do ABTS com o persulfato de potássio. A redução do $ABTS^{+\bullet}$ a ABTS ocorre em função da adição de um agente antioxidante ao sistema, ocasionando descoloração e decréscimo no valor da absorbância do meio reacional (Figura 11). Devido à perda progressiva da coloração inicial, a porcentagem de inibição do radical $ABTS^{+\bullet}$ pode ser determinada em função do trolox, um padrão que é submetido a iguais condições de análise do antioxidante.

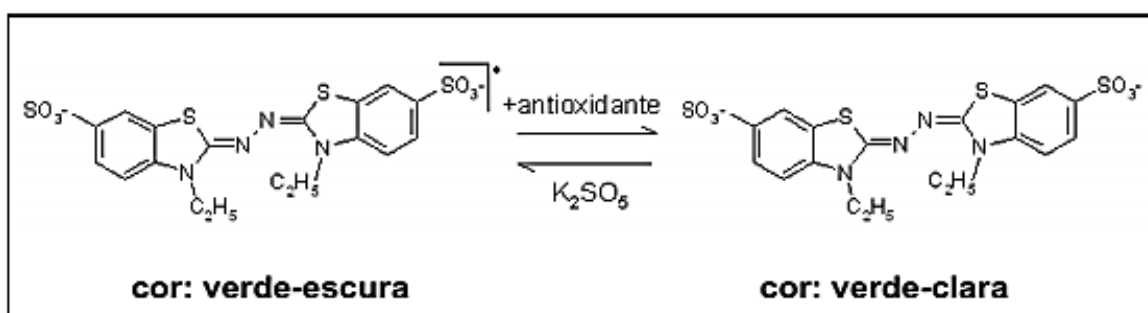


Figura 11. Estabilização do radical $ABTS^{+\bullet}$ por um antioxidante e sua formação a partir do persulfato de potássio.

Fonte: RUFINO et al. (2007).

O método do radical DPPH também é extensivamente utilizado na avaliação da atividade antioxidante de compostos vegetais (BARBOSA et al, 2006). Esta metodologia se baseia na doação de elétrons, por agentes antioxidantes, ao radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) ocasionando decréscimo na absorbância a 515 nm (PRADO, 2009), em função da descoloração da solução.

A capacidade do agente antioxidante em reduzir o radical é evidenciada através da porcentagem de DPPH restante no sistema (SANCHEZ-MORENO, 2002). Sua larga utilização deve-se a vantagem que o método apresenta quando os compostos antioxidantes analisados são mais solúveis em solventes orgânicos e por ser um radical livre disponível comercialmente (LIMA, 2008).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Matérias-primas

Foram utilizadas neste estudo quatro linhagens de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) com tegumento preto e cotilédones amarelos (BRM11-51400, BRM09-50995, BRM09-50901 e BRM09-50682) (Figura 12) desenvolvidas no programa de melhoramento de soja para alimentação humana da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária e colhidas no Estado do Paraná na safra 2012/2013.

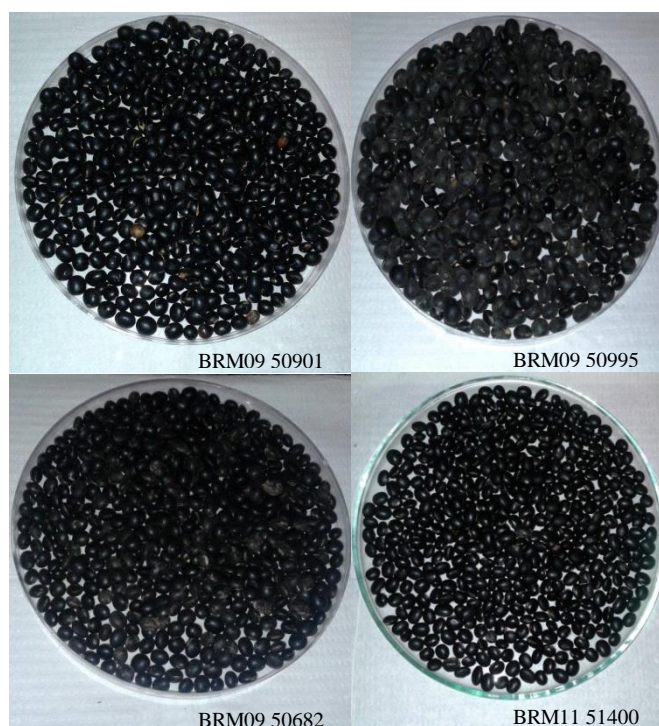


Figura 12. Linhagens de grão de soja preta avaliadas no estudo.

3.1.2 Reagentes e solventes

Os solventes e reagentes utilizados foram: ácido acético glacial grau HPLC; água milli-Q; metanol grau HPLC; hexano PA; éter de petróleo PA; hidróxido de sódio PA; ácido fórmico 96%; acetona grau HPLC; cloreto de sódio para Análise (PA); éter etílico grau HPLC; éter metil-terc-butil grau HPLC; sulfato de sódio anidro PA; acetonitrila grau HPLC, ácido clorídrico concentrado; ácido bromídrico; ácido fórmico; peróxido de hidrogênio 30%; acetona P.A; álcool metílico P.A; DPPH (2,2-Diphenyl-1-picryl-hidrazil); resina de troca aniônica – AG1-Xa, 100-200 mesh, na forma de cloreto (Bio-Rad laboratories); solução cloreto de sódio 0,1M e 0,7M; solução padrão de fosfato; solução de molibdato de amônio; solução de ácido clorídrico 2,4% e 2,0M; solução de hidróxido de sódio 0,1M; solução de ácido etilenodiaminotetracético dissódico-hidróxido de sódio (EDTA).

3.1.3 Equipamentos

Os equipamentos utilizados foram: agitador magnético com aquecimento (Nova técnica NT103); balança analítica com quatro casas decimais (Marte AY220); banho-maria com agitação (Gyromax™ 929); centrífuga (Hsiangtai); cromatógrafo líquido com forno para colunas e injetor automático (Alliance® 2695 Waters); vórtex; rotaevaporador; ultra turrax (Ika-Werke T 25); agitador Mod. 109; coluna C18 (YMC-Pack ODS-AM303, 250x4,5mm e 5µm); coluna C18 (Phenomenex Kinetex, 50x2,1mm e 2,6µm); coluna C18 (Thermo BDS Hypersil, 100x4,6mm e 2,4µm); coluna C18 (ACQUITY UPLC® BEH 2,1x150mm e 1,7µm); colunas de vidro para cromatografia 0,7X15 (Econo-columns, Bio Rad Laboratories) detector de arranjo de fotodiodos UV/Vis (2996 Waters); sistema de aquisição de dados software Empower; sistema de purificação de água Milli-Q A10; cromatógrafo líquido de alta eficiência com forno e injetor automáticos (ACQUITY™ Ultrapformance LC – Waters); espectrômetro de massas q-TOF (SYNAPT mass spectrometry – Waters); espectrômetro de ressonância magnética nuclear (Bruker DRX-500); espectrômetro de emissão atômica por plasma indutivamente acoplado ICP-OES.

3.2 Métodos

3.2.1 Moagem dos grãos para análises

As moagens dos grãos foram realizadas nos dias que antecederam cada uma das análises. Os grãos inteiros de soja foram selecionados, excluindo-se grãos partidos ou avariados, e triturados com casca em moinho de martelo composto por peneira de 0,8µm (Perten Laboratory Mill 3100) (Figura 13). Após este procedimento, as amostras foram armazenadas em câmara de refrigeração uma temperatura de 4°C durante o período de análise.



Figura 13. Farinha de soja preta para análises.

3.2.2 Composição centesimal

3.2.2.1 Análise de umidade

A análise de umidade foi realizada de acordo com o método nº 925.45 B (AOAC, 2005) que se baseia na secagem da amostra em estufa. Inicialmente, a amostra moída (2,0 g) foi acondicionada em pesa filtro seco e tarado e mantida em estufa a 105°C por 3 horas. Após atingir temperatura ambiente em um dessecador, a amostra foi pesada em balança analítica. O pesa filtro foi novamente recolocado em estufa à 105°C durante uma hora e, após atingir temperatura ambiente, foi pesado. O procedimento foi repetido até que a diferença entre os valores de pesagem da amostra fosse menor que 2,0 mg. A análise foi realizada em triplicata e o resultado expresso segundo a equação 1:

$$\% \text{umidade} = 100 - \left[\frac{(M - m)}{M_a} * 100 \right] \quad (\text{equação 1})$$

Onde:

M = Massa do pesa-filtro mais amostra secos;

m = Massa do pesa-filtro;

Ma = Massa de amostra.

3.2.2.3 Análise de proteína

A análise de proteínas foi realizada de acordo com o método nº 46-13 (AACC, 1995) para nitrogênio total com fator de conversão de 6,25 para proteína. As amostras foram pesadas (1,0g) em papel manteiga e transferida para um tubo de digestão onde, foi adicionado catalisador e 8 mL de H₂SO₄. O tubo foi inserido em um bloco digestor e a temperatura ajustada gradativamente de forma que atingisse 350°C. A digestão ocorreu até que o conteúdo do tubo se tornasse claro (verde ou azul claro límpido). A amostra permaneceu por mais uma hora no digestor até atingir temperatura ambiente. Posteriormente, foi realizada a transferência do tubo de digestão para o destilador onde foi adicionado 30 mL de solução de ácido bórico a 5% e 4 gotas do indicador. Em seguida, foram adicionados, 25 mL da solução de NaOH 40% no copo dosador do destilador. Após o início da produção de vapor foi adicionada uma solução de NaOH ao conteúdo do tubo de digestão. A destilação foi realizada até que ocorresse a virada da solução indicadora de rosa para verde. O destilado foi então, titulado com solução de H₂SO₄ 0,05M padronizada até viragem de verde para rosa. A concentração de nitrogênio foi calculada segundo a equação:

$$N (\%) = \left(\frac{(V - V_b) \cdot M \cdot 0,028}{P_a} \right) \cdot 100 \quad (\text{equação 2})$$

Onde:

V = Volume ml de H₂SO₄ gasto na titulação da amostra

Vb = Volume ml de H₂SO₄ gasto na titulação do branco

M = Molaridade do H₂SO₄

Pa = Massa da amostra

3.2.2.4 Análise de extrato etéreo

Os teores de extrato etéreo foram determinados de acordo com o método nº 922.06 (AOAC, 2005). O teor de óleo das amostras (4,0g) foi mensurado por hidrólise ácida em extrator de Mojonnier e a destilação realizada com éter de petróleo e éter etílico.

3.2.2.5 Análise de cinzas

A análise de cinzas foi realizada de acordo com o método nº 923.03 (AOAC, 2005). Foi utilizada 2,0 gramas de amostra devidamente homogeneizada em um cadinho. As cinzas foram inflamadas à 550°C até que se tornassem claras e atingissem peso constante. A amostra foi colocada em dessecador e pesada imediatamente após atingir temperatura ambiente.

3.2.2.6 Carboidratos

O conteúdo de carboidratos foi calculado em base seca, por diferença, segundo a equação:

$$100 - (\text{proteína} + \text{óleo} + \text{cinzas} + \text{água}) \quad (\text{equação 3})$$

3.2.3 Análise de minerais

A análise de potássio, magnésio, cálcio, fósforo, manganês, ferro, zinco, cobre, cobalto, selênio e alumínio foi realizada por mineralização por micro-ondas de cavidade de acordo com AOAC (2012). Os teores de minerais foram determinados por espectrometria de emissão óptica em plasma com acoplamento indutivo (ICP-OES).

3.2.4 Análise do perfil de açúcares

A análise de açúcares foi realizada em cromatógrafo líquido de alta eficiência Alliance 2690/5 (Waters Corporation, Massachusetts, USA) composto por detector de índice de refração (CLAE-IR) W 2410 (Waters Corporation), segundo a metodologia de Macrae (1998). A amostra ($\pm 1,0$ g) previamente solubilizada com 10 mL de água Milli-Q em balão volumétrico de 25 mL foi mantida em ultrassom por 20 minutos para a extração dos açúcares. Posteriormente, foi adicionado ao balão 5 mL de acetonitrila e o conteúdo foi então avolumado com água Milli-Q. A separação cromatográfica foi realizada em coluna ZORBAX Carbohydrate (4,6 mm x 250 mm; 5 μ m) (Agilent Technologies, Dalaware, USA) inserida em forno a 30°C, fase móvel contendo acetonitrila:água (75:25) com fluxo de 1,4 mL/min. Os açúcares foram identificados por comparação dos tempos de retenção e espectros dos picos das amostras com dados disponíveis na literatura. Para a quantificação dos teores de açúcares

usou-se curva de calibração com padrões de rafinose, estaquiose e sacarose adquiridos da Sigma Chemicals Co. (St. Louis, EUA) com pureza de 98%.

3.2.5 Análise de aminoácidos

A determinação dos perfis de aminoácidos foi realizada em sistema Cromatográfico modular composto por bomba analítica W600 e injetor WISP 717plus (Waters Corporation) de acordo com o método da AOAC (2005). O método baseia-se na determinação dos principais aminoácidos (ácido aspártico, serina, ácido glutâmico, glicina, alanina, arginina, prolina, histidina, treonina, tirosina, valina, lisina, isoleucina, leucina, fenilalanina, triptofano) e dos aminoácidos sulfurados (metionina e cisteína) por hidrólise ácida e posterior derivatização com 6-aminoquinolil-succimidil-carbamato (AQC) e determinação de triptofano por hidrólise básica. Todos os aminoácidos foram separados em fase reversa e detectados por fluorescência.

A separação cromatográfica dos principais aminoácidos foi realizada em coluna de fase reversa (C₁₈, Thermo BDS Hypersil, 4,6 mm x 100 mm e 2,4 µm) a 37°C em modo de eluição gradiente seguindo as seguintes condições cromatográficas: Fase Móvel A: solução *AccQ Tag*[®] (Waters, EUA) :água (1:10); Fase móvel B: acetronitrila; Fase móvel C: água; Fluxo: 1,0 mL/min; Detetor Fluorescência: $\lambda_{exc}=250$ nm e $\lambda_{em}=395$ nm; volume padrão de injeção: 5 µL e tempo de corrida: 45 minutos. A determinação dos aminoácidos sulfurados foi realizada em coluna C₁₈ Kinetex (50 mm x 2,10 mm; 2,6 µm) a 45°C em modo de eluição gradiente seguindo as seguintes condições cromatográficas: Fase Móvel A: Tampão; Fase móvel B: acetronitrila; Fluxo: 0,51 mL/min; detetor Fluorescência: $\lambda_{exc}=250$ nm e $\lambda_{em}=395$ nm; Volume padrão de injeção: 1 µL e tempo de corrida: 10 minutos. O aminoácido triptofano foi separado em coluna C₁₈ Symmetry (4,6 mm x 75 mm; 3,5 µm) a 45°C em modo de eluição isocrático seguindo as condições cromatográficas: fase móvel: acetoneitrila: ácido acético: água (15:84:1); fluxo: 0,60 mL/min; detetor fluorescência: $\lambda_{exc}=250$ nm e $\lambda_{em}=395$ nm; volume padrão de injeção: 10 µL e tempo de corrida: 10 minutos. Os resultados foram expressos em gramas de aminoácidos/100g de amostra seca.

3.2.6 Análise de fitato

Preparo da curva padrão de fósforo

Para o preparo de concentrações de 5 ppm, 25 ppm, 60 ppm e 80 ppm de fósforo/50mL foram pipetados 500, 2500, 6000 e 8000 µL da solução padrão monoelementar de fósforo concentrada em balão volumétrico de 50mL e adicionado 30mL de solução de ácido clorídrico 2,0 M. O volume foi avolumado com água destilada.

Determinação de fitato total

O conteúdo de fitato foi determinado de acordo com o método modificado AOAC (2005). A amostra ($\pm 2,0$ g) previamente moída e desengordurada foi suspensa em 40 mL de solução de HCl 2,4% em temperatura ambiente, sob agitação mecânica contínua por 3 h. Em seguida, a amostra foi centrifugada durante 15 minutos e filtrada em papel de filtro Whatman n°1. Foi depositado, em balão volumétrico de 25 mL, 1 mL do filtrado e 1 mL de Na₂EDTA-

NaOH. O sobrenadante foi avolumado com água destilada e transferido quantitativamente para a coluna de vidro (0,7 x 15 cm) (Econo-columns, Bio-Rad Laboratories) contendo 0,5 g de resina de troca aniônica AG 1-Xa (Bio-Rad Laboratories, 100-200 mesh), seguindo o método descrito por HARLAND & OBERLEAS (1986). Visando a remoção do fósforo inorgânico e demais compostos interferentes, foi passado através da coluna 15 mL de NaCl 0,1 M. Os fitatos retidos na coluna foram eluídos da resina com solução de HCl 2,0 M (figura 14). A leitura da absorbância da amostra foi realizada em espectrofotômetro de emissão atômica por plasma indutivamente acoplado ICP-OES a 640 nm e o resultado expresso segundo a equação:

$$\text{Fitato (mg/g)} = \left(\frac{[\text{P}]_{\text{mg}} \times 660}{\text{Kg} \times 186.000} \right) \quad (\text{equação 4})$$

Onde:

$[\text{P}]_{\text{mg/kg}}$ = concentração de fósforo lida pela ICP-OES em mg/kg;

Fitato = Massa molecular de 660 g/mol, contendo 28,2% de fósforo (186g P/mol).



Figura 14. Eluição da fração de fitato com solução de HCl 2,0M.

3.2.7 Análise de isoflavonas

Para o preparo da solução estoque, foram pesados em balança analítica os padrões de isoflavonas adquiridos da Sigma[®], conforme os valores descritos na Tabela 5.

Tabela 5. Massas dos padrões de isoflavonas para preparo das soluções-estoque.

Isoflavona	Massa (mg)
Daidzina	1,5
Genistina	1,5
Daidzeína	3,0
Gliciteína	1,0
Genisteína	3,0
Glicitina	1,0

Os padrões (Figura 15) foram pesados isoladamente, em balão volumétrico de 25 mL, dissolvidos e avolumados com metanol. A solução foi agitada em vórtex até total diluição dos padrões. As concentrações de cada padrão foram determinadas por espectrofotometria, em equipamento Shimadzu modelo UV 1800, considerando o comprimento de onda, a absorvidade molar e a massa individual de cada isoflavona, segundo Murphy e colaboradores (2002).



Figura 15. Padrões de isoflavonas (daidzina, glicitina, genistina, daidzeína, gliciteína e genisteína) Sigma[®] utilizados para a construção da curva de calibração.

Cada ponto da curva foi preparado em vial do injetor automático e injetado em triplicata. A Tabela 6 apresenta a concentração das isoflavonas em cada ponto da curva analítica.

Tabela 6. Concentração das isoflavonas (mg/L) em cada ponto da curva.

Ponto	Daidzina	Glicitina	Genistina	Daidzeína	Gliciteína	Genisteína
1	6,52	9,16	5,86	7,73	3,65	3,99
2	13,04	18,32	11,72	15,46	7,3	7,98
3	19,56	27,48	17,58	23,19	10,95	11,97
4	26,08	36,64	20,64	30,92	14,6	15,96

A determinação das isoflavonas foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) segundo a AOAC (2005) método 2001.10. Foi pesado 5g do grão de soja preta moído em erlenmeyer de 125mL com tampa de vidro e adicionado 40mL de solução de

extração (metanol:água 80:20). Após o travamento da tampa, os frascos permaneceram em banho maria por 2h com agitação mecânica a 65°C. Os frascos foram retirados do banho maria e mantidos em uma capela até atingirem temperatura ambiente (figura 16). Posteriormente, foi adicionado 3mL de solução de hidróxido de sódio 2M e a solução foi agitada por 10 minutos em agitador mecânico. Em seguida, foi adicionado 1mL de ácido acético glacial e o conteúdo do frasco foi transferido para balão volumétrico de 50mL, avolumado com solução de extração (metanol: água 80:20) e filtrado em papel quantitativo. Foi pipetado, para um balão de 10mL, 5mL do filtrado e 4mL de água milliQ e metanol para avolumar. Os extratos foram centrifugados por 5 minutos a 11000rpm e o sobrenadante transferido para um vial do injetor automático.



Figura 16. Extratos de isoflavonas.

A separação cromatográfica foi realizada utilizando fase reversa, coluna C₁₈ (YMC 250x4,6mm, com partícula de 5µm), à 45°C, com fluxo de 1,3mL/min em modo de eluição gradiente de água:metanol:ácido acético 88:10:2 (Fase A) e metanol: ácido acético 98:2 (Fase B) (Tabela 7), tempo de análise de 40 minutos e volume de injeção de 25µL. Foi utilizado faixa de comprimento de onda utilizado de 200nm à 400nm e o espectro foi extraído à 260nm.

Tabela 7. Gradiente de eluição da fase móvel.

Tempo (minutos)	Fase A (%)	Fase B (%)
0,00	90	10
30,00	40	60
30,05	0	100
35,00	0	100
35,05	90	10
45,00	90	10

Fase A: água:metanol:ácido acético (88:10:2); Fase B metanol: ácido acético (98:2).

A quantificação das isoflavonas foi realizada através da curva de calibração externa construída a partir de soluções padrões de todas as isoflavonas avaliadas. As isoflavonas foram identificadas pelo tempo de retenção e pelo espectro de ultra violeta (UV). O teor de isoflavonas totais, definido como a soma do teor de todas as isoflavonas, foi expresso em miligramas de aglicona por 100g de amostra seca. Para isto, foi realizada a conversão das isoflavonas glicosiladas em suas equivalentes agliconas, multiplicando-se o teor do derivado glicosilado por um fator de conversão (Tabela 8), que equivale à razão entre a massa molar da aglicona equivalente e do derivado glicosilado (KLUMP et al., 2001).

Tabela 8. Massa molar das isoflavonas e fator de conversão dos derivados glicosilados.

Isoflavona	Massa molar (g)	Fator de conversão
Daidzina	416	0,6106
Glicitina	447	0,6376
Genistina	432	0,625
Daidzeína	254	-
Gliciteína	285	-
Genisteína	270	-

3.2.8 Análise de antocianinas

Para a análise de antocianinas foram realizados testes preliminares que objetivaram avaliar a metodologia de extração mais eficaz. Foram utilizadas como amostras as cascas dos grãos da linhagem BRM09-50901, descascadas manualmente, moídas e peneiradas em peneira de 0,08 mM (Figura 17).



Figura 17. Cascas de soja moídas e peneiradas.

As quatro metodologias testadas variaram em termos de tempo e temperatura de extração segundo Wang e colaboradores (2014) (50°C/1h), Lee e colaboradores (2013) (4°C/24h), Cho e colaboradores (2013) (4°C/48h), incluindo a extração realizada a 100°C/30 minutos. As amostras de antocianinas (0,01g) foram extraídas com solução de ácido fórmico (10%) em metanol, seguindo as condições de tempo e temperatura anteriormente mencionadas. Em seguida, os extratos foram mantidos em ultrassom por 10 minutos e centrifugados. As extrações foram repetidas até descoloração da solução (Figura 18).

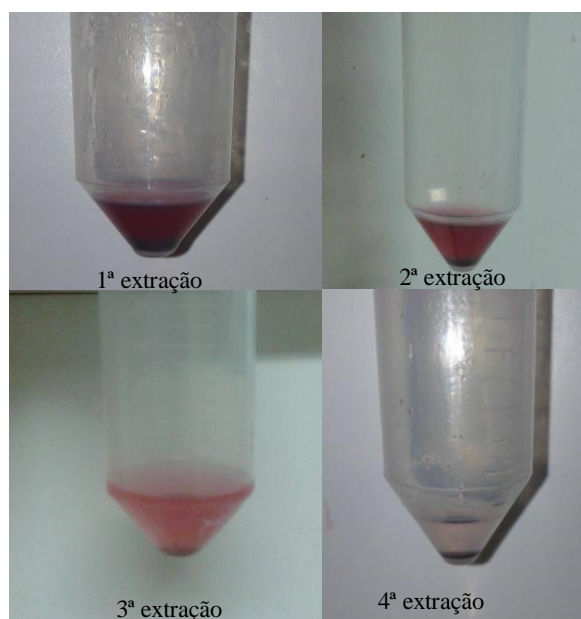


Figura 18. Extratos de antocianinas.

A análise cromatográfica por CLAE-DAD foi realizada de acordo com Gouvêa e colaboradores (2012) e os compostos identificados por comparação do tempo de retenção dos picos das amostras com dados relatados anteriormente na literatura, dos espectros de UV e espectros de massa acurada dos padrões. O método foi baseado na separação cromatográfica dos compostos em coluna de fase reversa (C₁₈, Thermo BDS Hypersil, 100mmx4,6mm e 2,4µm) à 40°C em modo de eluição gradiente (Tabela 9) de ácido fórmico 5% (Fase A) e acetonitrila (Fase B) com fluxo de 1,0mL/min. O volume de injeção foi 50µL e o tempo de corrida de 20 minutos.

Tabela 9. Gradiente de eluição das fases móveis para separação das antocianinas.

Tempo	Fase A (%)	Fase B (%)
0,00	95	5
15,00	87	13
16,50	86	14
18,00	95	5
20,00	95	5

Os picos de antocianinas foram manualmente coletados na saída do detector e posteriormente, injetados no espectro de massas (EM). O espectro de massas das antocianinas

foi determinado por infusão direta em espectrômetro de massas Q-TOF Synapt (Waters®), com ionização por eletronebulização. As condições e voltagens utilizadas no espectrômetro de massas foram: modo positivo, analisador modo V, capilar 3,0kV, cone de amostra 25,0V, cone de extração 4,0kV, temperatura da fonte 120°C, temperatura de dessolvação 500°C, fluxo do gás de dessolvação 750,0L/hr, energia de colisão 6,0eV.

3.2.9 Análise de carotenoides

A extração dos carotenoides foi realizada conforme o método descrito por Rodriguez-Amaya (2001). Os grãos de soja moídos integralmente foram macerados com celite, extraídos com acetona e filtrados em funil de vidro com placa sinterizada, até ausência da coloração característica, indicativa da presença de carotenoides. O extrato foi transferido para um funil de separação contendo éter de petróleo, onde foram realizadas lavagens com água Milli-Q até que não houvesse mais resíduos de acetona (Figura 19).

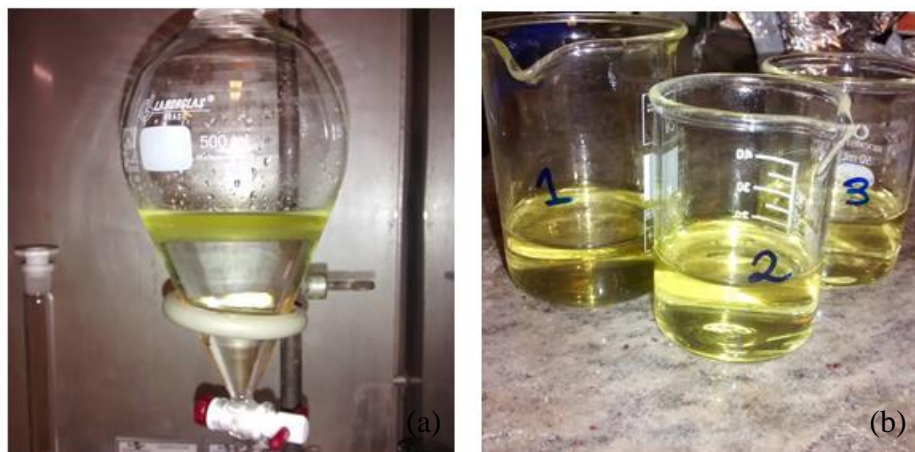


Figura 19. Lavagem do extrato (a), extrato de carotenoides (b).

A solução foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL contendo BHT e avolumada com extrato etéreo. Para reação de saponificação retirou-se uma alíquota de 5mL transferiu-se para vial âmbar, adicionou-se 5mL de solução de KOH 10% (m/v) em metanol. Manteve-se a reação no escuro por 16 horas. Completou-se o volume do frasco com água e agitou-se vigorosamente. Após separação das fases o conteúdo do frasco foi transferido quantitativamente para bureta. Lavou-se a solução etérea com aproximadamente 100mL de água, descartando a fase aquosa. Registrou-se o volume final da solução etérea na bureta. Transferiu-se a solução etérea para vial de 10mL e adicionou-se sulfato de sódio anidro e agitou-se. Uma alíquota desta solução foi utilizada para leitura de carotenoides totais em espectrofotômetro à 450nm. Outra alíquota foi seca sob fluxo de ar comprimido e o resíduo ressuspendido com acetona para análise cromatográfica. O teor de carotenoides totais foi calculado através da Equação 5, para análise quantitativa foi aceito o coeficiente de variação de até 10%.

$$\text{Carotenoides Totais}(\mu\text{T}/100\text{g}) = \frac{\text{ABS} \times V_f \times 1000000}{M \times 2592} \quad (\text{Equação 5})$$

Onde,

ABS=Absorbância;

Vf= Volume final

M = Massa (g)

A análise cromatográfica, segundo Pacheco (2009), foi realizada por CLAE-DAD e os compostos identificados por comparação do tempo de retenção e dos espectros de UV dos padrões. O método baseia-se na separação cromatográfica em coluna de fase reversa (C₃₀, YCM Carotenoid S-3; 4,6 x 250mm) à 33°C em modo de eluição gradiente (Tabela 10) de metanol (Fase A) e éter metil-*terc*-butílico (Fase B) com fluxo de 0,8mL/min, o volume de injeção foi 15µL e o tempo de corrida de 28 minutos.

Tabela 10. Gradiente de eluição das fases móveis para separação dos carotenoides.

Tempo	Fase A (%)	Fase B (%)
0,00	80,0	20,0
0,50	75,0	25,0
15,00	15,0	85,0
15,05	10,0	90,0
16,50	10,0	90,0
16,55	80,0	20,0
28,00	80,0	20,0

Fase A: metanol; Fase B: éter metil-*terc*-butílico.

3.2.10 Determinação da atividade antioxidante pelo método do radical DPPH

A determinação da atividade antioxidante total das linhagens de soja preta pelo método do radical DPPH foi realizada de acordo com Rufino e colaboradores (2007). A extração dos compostos antioxidantes presentes nos grãos inteiros previamente moídos ($\pm 3,0g$) foi inicialmente realizada com 40 mL de metanol 50%/1h à temperatura ambiente. Em seguida, o extrato foi centrifugado (15.000 rpm) durante 15 minutos e o sobrenadante foi transferido para um balão volumétrico de 100 mL. A segunda extração foi realizada com solução de acetona 70% nas mesmas condições anteriormente relatadas. O sobrenadante foi transferido para o balão volumétrico contendo o primeiro sobrenadante e o conteúdo foi avolumado com água Milli-Q.

Determinação da curva do DPPH

A partir da solução inicial de DPPH (60 µM), obtida através da dissolução de 2,4 mg de DPPH em álcool etílico, foi preparada em balões volumétricos de 10 mL, soluções variando a concentração de 10 µM a 50 µM conforme a Tabela 11.

Tabela 11. Preparo das soluções da curva de DPPH.

Solução de DPPH (mL)	Álcool metílico (mL)	Concentração final de DPPH (μM)
0	10	0
1,7	8,3	10
3,3	6,7	20
5	5	30
6,7	3,3	40
8,3	1,7	50
10	0	60

Em ambiente escuro, foi transferida para cubetas de vidro uma alíquota de 4 mL de cada solução de DPPH (10 μM , 20 μM , 30 μM , 40 μM , 50 μM e 60 μM). A leitura das absorvâncias foi realizada em espectrofotômetro a 515 nm.

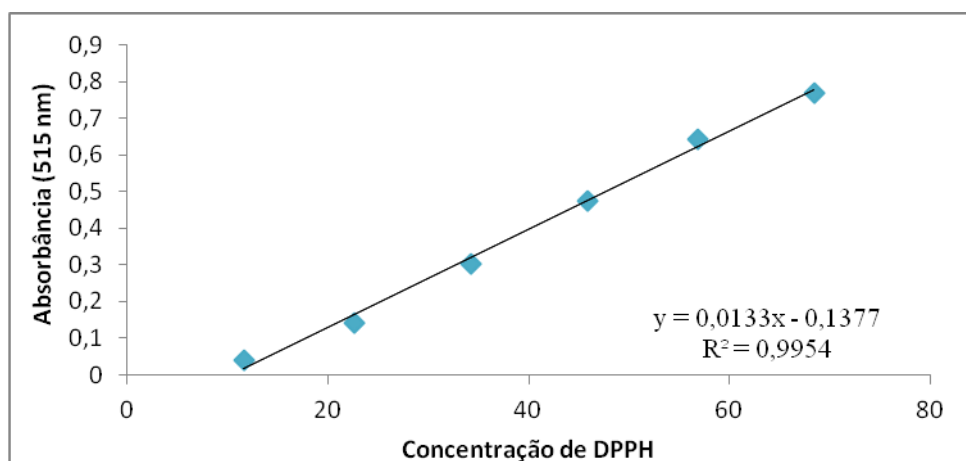


Figura 20. Exemplo da curva de DPPH x absorvância da amostra BRM 09-50682.

A partir da solução obtida com a extração descrita anteriormente, foram preparados tubos de ensaio contendo três diferentes diluições. Em ambiente escuro, foram transferidos alíquotas de 0,1 mL de cada diluição do extrato para frascos âmbar com 3,9 mL do radical DPPH (DPPH 0,06 mM). A leitura da absorvância final (515 nm) para o cálculo EC_{50} foi realizada após a total estabilização da absorvância. Os resultados para a atividade antioxidante foram expressos como EC_{50} , que é definida como a quantidade de antioxidantes necessária para reduzir a concentração inicial de DPPH em 50%

Após a leitura, o valor correspondente a metade da absorvância inicial do controle foi substituído pelo y da equação da curva do DPPH para determinar o consumo em μM DPPH, e em seguida, transformado para g DPPH (Equação 6), figura 20.

Equivalência de controle e DPPH

$$Y = ax - b$$

(Equação 6)

Onde:

Y = Absorbância inicial do controle / 2 (item “determinação da atividade antioxidante total”)

X= resultado em μM DPPH

A conversão para g de DPPH foi realizada através da transformação:

$\text{g DPPH} = (\mu\text{M DPPH} / 1.000.000) \times 394,3$ (massa molecular do DPPH).

3.2.11 Determinação da atividade antioxidante pelo método do radical ABTS

A determinação da atividade antioxidante pelo método do radical ABTS foi realizada segundo Rufino e colaboradores (2007) utilizando as mesmas condições descritas no método DPPH, incluído massa pesada (g), solução e tempo de extração.

Determinação da curva do ABTS

A partir da solução padrão de trolox (2.000 μM), preparada com 25 mg de trolox dissolvido em álcool etílico, foram obtidas soluções com concentrações variando de 100 μM a 1.500 μM , conforme a Tabela 12.

Tabela 12. Preparo das soluções para curva padrão.

Solução padrão de trolox (mL)	Álcool etílico (mL)	Concentração final (μM)
0,5	9,5	100
2,5	7,5	500
5,0	5,0	1.000
7,5	2,5	1.500
10,0	0,0	2.000

Em ambiente escuro, foi transferido uma alíquota de 30 μL de cada solução de trolox (100 μM , 500 μM , 1.000 μM , 1.500 μM e 2.000 μM) (Figura 21) para tubos de ensaio que reagiram com 3,0 mL da solução do radical ABTS^{•+}, preparado a partir da reação de 5 mL da solução estoque ABTS 7 mM com 88 μL da solução de persulfato de potássio 140 mM. As leituras foram realizadas após 6 minutos do início da reação.

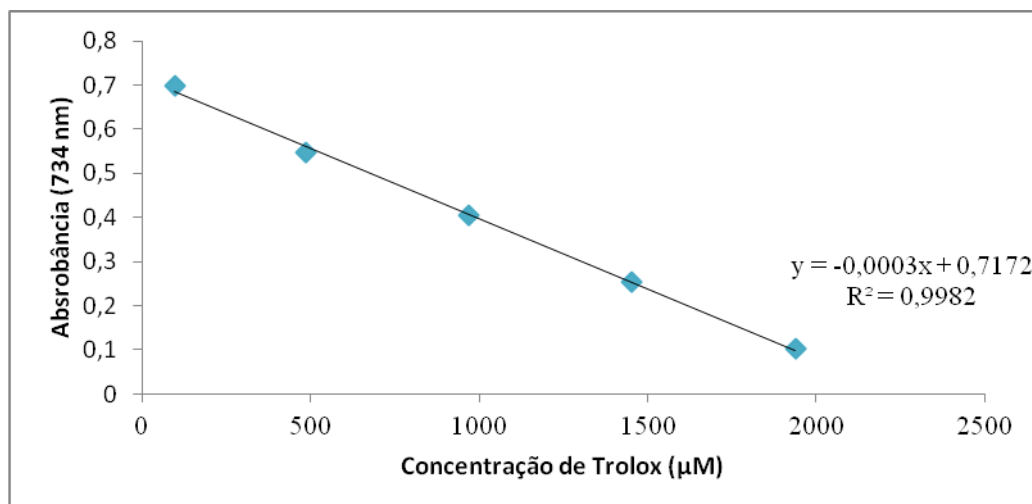


Figura 21. Exemplo da curva padrão de trolox da amostra BRM 09-50995.

Foram preparadas três diferentes diluições a partir do extrato obtido anteriormente. Em ambiente escuro foi transferido uma alíquota de 30 µL de cada diluição do extrato para frascos âmbar contendo 3,0 mL do radical ABTS^{•+}. A leitura (734 nm) foi realizada após 6 minutos do início da reação.

A partir das absorbâncias referentes às diferentes diluições do extrato, o valor das absorbâncias foi inserido no eixo Y e a diluição (mg/L) no eixo X. Em seguida, foi determinado a equação da reta. O cálculo da atividade antioxidante total (AAT) foi realizado a partir da substituição da absorbância equivalente a 1.000 µM do padrão do trolox na equação da reta (equação 7). O valor obtido para o termo X corresponde à diluição d amostra (mg/L) equivalente a 1.000 µM de trolox (equação 8).

Cálculo das diluições do extrato (mg/mL) equivalente a 1.000 µM de trolox:

$$Y = -ax + b \quad (\text{equação 7})$$

Onde:

Y= Absorbância correspondente a 1.000 µM de trolox

X = Diluição da amostra (mg/L) equivalente a 1.000 µM de trolox

O valor encontrado (x) na equação 7, foi dividido por 1.000 para a obtenção do resultado em gramas. O resultado final (equação 8) foi calculado pela divisão de 1.000 (µM) pelo valor de X (g) e multiplicado por 1 (g) para encontrar o valor final (Z) que foi expresso em µM trolox / g de amostra.

Cálculo final expresso em (µM trolox / g):

$$X (g) = x / 1000 \quad (\text{equação 8})$$

$$Z = 1.000 / x (g)$$

3.2.12 Análise estatística

Todos os resultados das análises físico-químicas (composição centesimal, minerais, fitatos) e cromatográficas (antocianinas, isoflavonas, carotenoides, açúcares e aminoácidos) foram tratados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) e teste de médias de Fisher ($p \leq 0,05$), utilizando-se o programa Statistica 7.0 (STATSOFT, 2005). Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em base seca como Média \pm Desvio Padrão (DP).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Composição centesimal

Os dados referentes à composição centesimal das linhagens de soja preta encontram-se na Tabela 13.

Tabela 13. Composição centesimal (g/100g) das linhagens de soja preta (base seca).

Linhasgens	Umidade	Proteína*	Lipídio	Carboidratos**	Cinzas	Valor Calórico (Kcal)***
BRM09-50901	10,56 ^a ±0,1	41,18 ^a ±0,47	19,46 ^{ab} ±0,31	34,22 ^a ±0,45	5,13 ^c ±0,11	476,75 ^{ab} ±1,34
BRM09-50995	10,59 ^a ±0,1	41,15 ^a ±0,21	19,79 ^a ±0,15	33,83 ^{ab} ±0,20	5,24 ^c ±0,08	477,97 ^a ±0,96
BRM09-50682	10,41 ^a ±0,1	41,51 ^a ±0,29	19,44 ^{ab} ±0,35	33,61 ^{ab} ±0,45	5,44 ^b ±0,11	475,42 ^b ±1,45
BRM11-51400	10,61 ^a ±0,16	41,69 ^a ±0,24	19,12 ^b ±0,10	33,38 ^b ±0,32	5,81 ^a ±0,12	472,34 ^c ±0,31

* N x 6,25

** calculado por diferença 100 – (% lipídios totais + % proteínas + % cinzas)

*** Calculado pela soma das porcentagens de proteína e carboidratos multiplicados pelo fator 4 (Kcal/g) e lipídios pelo fator 9 (Kcal/g).

Em relação à composição centesimal dos grãos, não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) entre os teores de umidade e proteína das quatro linhagens de soja preta estudadas. O mesmo não ocorreu em relação às concentrações de lipídios, carboidratos, cinzas e valor calórico que apresentaram diferenças estatísticas ($p \leq 0,05$) (Figura 22).

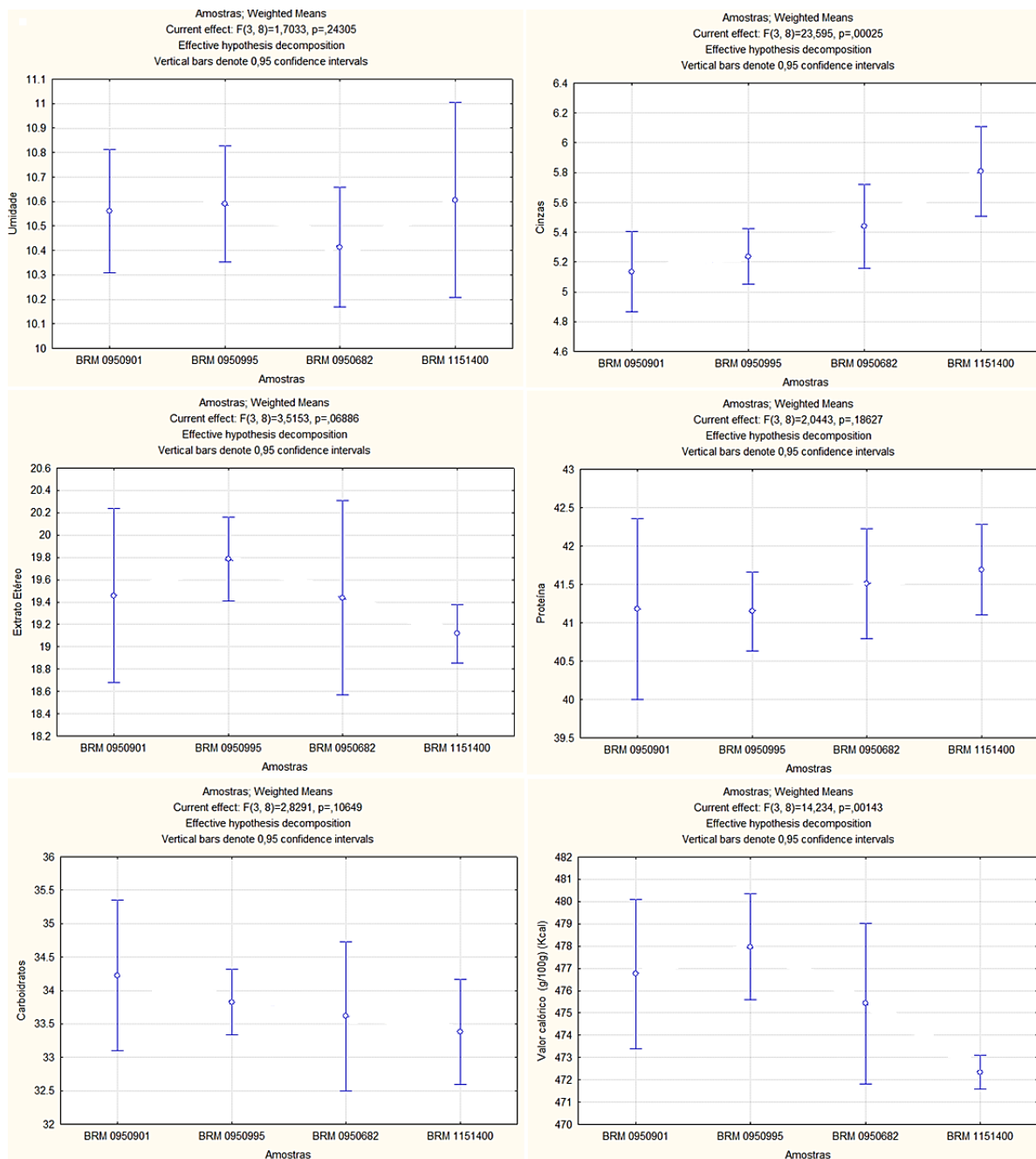


Figura 22. Análise estatística dos teores de umidade, cinzas, extrato etéreo, proteína, carboidratos e valor calórico das linhagens de soja preta.

Os valores de umidade variaram de 10,41 a 10,61 g/100g), proteína, de 41,15 a 41,69 g/100g, lipídio, de 19,12 a 19,79 g/100g, carboidratos, de 33,38 a 34,22 g/100g e cinzas de 5,14 a 5,81 g/100g.

Os teores de proteína e óleo determinam o valor comercial das sementes de soja. As concentrações de proteína obtidas neste estudo foram inferiores aos resultados (45,70 g/100g) apresentados por Shih e colaboradores (2002) ao analisarem uma cultivar de soja preta com cotilédones amarelos, mas estão coerentes com o estudo mais recente realizado por Cho e colaboradores (2013), no qual a concentração de proteína das quatro cultivares de soja preta analisadas variou de 41,38 a 44,32 g/100g de amostra. Os teores de proteína relatados no

presente estudo também encontram-se dentro da faixa apresentada (38,79 a 43,89 g/100g) por Lin e Lai (2006) ao analisarem sete variedades de soja com tegumento preto.

Considerando que não foram observadas diferenças estatísticas entre os valores de proteína nas quatro linhagens de soja preta analisadas, pode-se concluir que as amostras apresentaram a mesma qualidade nutricional em relação aos seus teores proteicos podendo, desta forma, serem igualmente indicadas para o consumo humano quando considerada a presença deste macronutriente.

O maior (5,81 g/100g) e o menor (5,14 g/100g) teor de cinzas foi detectado nas linhagens de soja BRM11-51400 e BRM09-50901, respectivamente. Não foi observada diferença estatística entre os valores de cinzas nas linhagens BRM09-50901 e BRM09-50995. Quando comparados com os resultados apresentados neste estudo, pode-se considerar que resultados semelhantes para cinzas (5,26 a 5,72 g/100g) foram detectados por Lin e Lai (2006).

Os teores de lipídios se apresentaram na faixa de 19,12 a 19,79 g/100g, sendo observada diferença significativa nos valores deste nutriente apenas entre as linhagens BRM09-50995 e BRM11-51400. Valores inferiores (9,36 a 18,01 g/100g) foram determinados por Lin e Lai (2006) em estudo que avaliou sete variedades de soja preta cultivadas em Taiwan. Ao quantificarem a concentração de lipídios em grãos de soja com diferentes colorações de tegumentos (amarelo, preto, marrom e verde) Cho e colaboradores (2013) determinaram que os grãos de soja preta apresentaram a maior concentração de lipídios (20,88 g/100g) quando comparado com os demais grãos analisados.

Segundo Ha e colaboradores (2009) os grãos de soja em geral, apresentam 40% de proteína, 20% de lipídio, 35% de carboidratos e 5% de cinzas. Desta forma, os resultados obtidos para a composição centesimal das quatro linhagens de soja preta encontram-se dentro da faixa citada na literatura, indicando que os grãos avaliados apresentam qualidade em macronutrientes similar as cultivares/variedades desenvolvidas no Brasil e em outros países.

4.2 Composição em minerais

Os teores de minerais presentes nas linhagens de soja preta encontram-se expressos na Tabela 14.

Tabela 14. Teores de minerais (mg/100g) nas linhagens de soja preta (base seca).

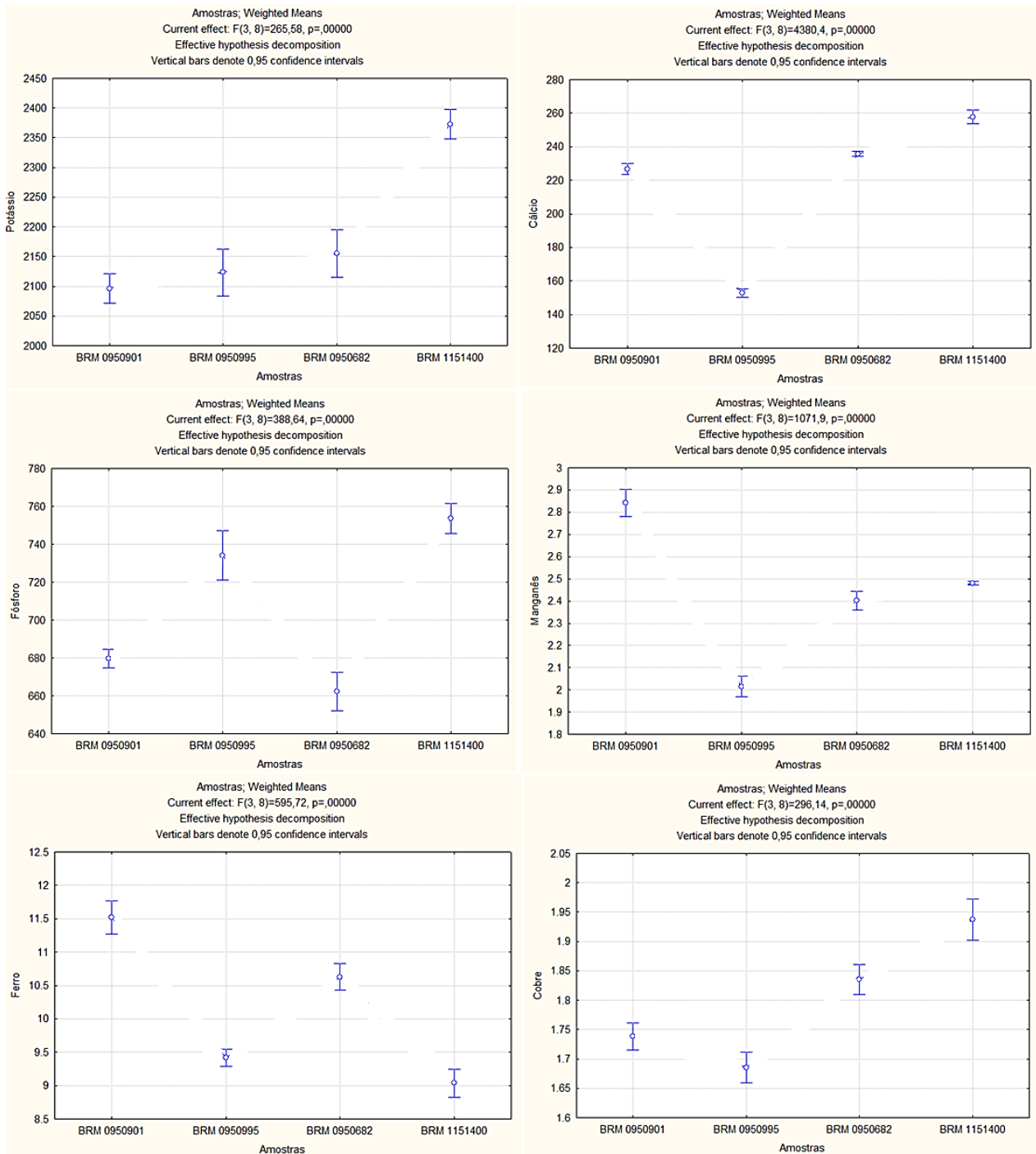
Mineral	BRM09-50901	BRM09-50995	BRM09-50682	BRM11-51400
Potássio	2096,55 ^d ±10,05	2123,32 ^c ±15,86	2155,30 ^b ±16,33	2372,89 ^a ±10,04
Magnésio	247,45 ^b ±0,84	242,76 ^c ±0,69	254,58 ^a ±1,88	255,32 ^a ±0,47
Cálcio	226,65 ^d ±1,28	152,86 ^c ±0,98	235,80 ^b ±0,61	257,82 ^a ±1,64
Fósforo	679,75 ^c ±2,00	734,18 ^b ±5,19	662,28 ^d ±4,16	753,56 ^a ±3,15
Manganês	2,84 ^a ±0,02	2,02 ^d ±0,02	2,40 ^b ±0,02	2,48 ^c ±0,00
Ferro	11,52 ^a ±0,10	9,42 ^c ±0,05	10,63 ^b ±0,08	9,04 ^d ±0,08
Zinco	4,59 ^a ±0,03	4,07 ^c ±0,04	4,31 ^b ±0,04	4,64 ^a ±0,03
Cobre	1,74 ^c ±0,01	1,69 ^d ±0,01	1,84 ^b ±0,01	1,94 ^a ±0,01
Cobalto	0,02 ^a ±0,00	0,01 ^c ±0,00	0,02 ^b ±0,00	0,01 ^c ±0,00
Selênio	0,33 ^b ±0,01	0,35 ^{ab} ±0,03	0,38 ^a ±0,03	0,35 ^{ab} ±0,01
Alumínio	2,77±0,01	NQ	NQ	NQ

NQ - Não Quantificado

Médias com letras diferentes sobrescritas na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de médias de Fisher ($p \leq 0,05$)

O conteúdo de minerais em soja pode apresentar significativa variação devido a múltiplos fatores, principalmente o local de plantio das sementes (SMITH e CIRCLE, 1972). Ainda que sejam encontrados na literatura estudos sobre a composição em minerais de cultivares de soja amarela, dados em relação aos grãos de soja com tegumento preto não foram encontrados.

Pode ser observado, na Figura 23, que houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as concentrações da maior parte dos minerais analisados (potássio, cálcio, fósforo, manganês, ferro e cobre) nas linhagens estudadas.



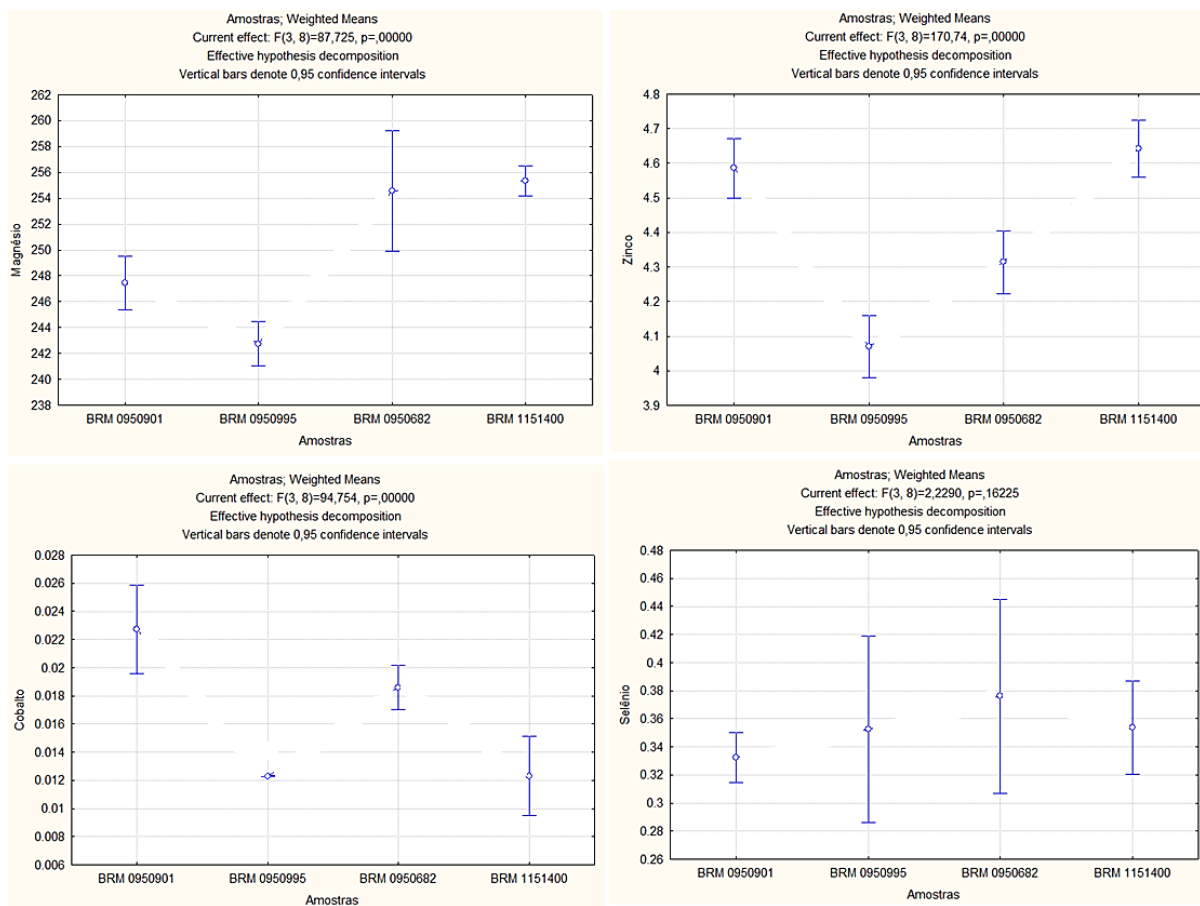


Figura 23. Análise estatística dos teores de minerais nas linhagens de soja preta.

De acordo com Kagawa (1995), os grãos de soja são constituídos, principalmente, de potássio, fósforo, cálcio e magnésio. Nesse contexto, o potássio foi o mineral mais abundante em todas as linhagens estudadas, com teor máximo de 2372,90 mg/100g na linhagem BRM11-51400, que representa 67,60% da recomendação diária deste mineral pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (3510 mg/dia), e mínimo de 2096,55 mg/100g na linhagem BRM09-50901. Segundo Siani e colaboradores (1991) a ingestão de potássio através da dieta humana é essencial devido a sua participação na regulação do ritmo cardíaco, na pressão arterial e na transmissão de impulsos nervosos para o bom funcionamento muscular.

O maior valor de magnésio foi observado na BRM11-51400 (255,32 mg/100g) que não diferiu estatisticamente da amostra BRM09-50682 (254,58 mg/100g). As concentrações de fósforo e cálcio variaram de 662,28 a 753,56 mg/100g e 152,86 a 257,82 mg/100g, respectivamente, sendo os teores mais elevados desses minerais também observados na linhagem BRM11-51400.

Com exceção do teor de fósforo, que foi superior no presente estudo, resultados semelhantes foram relatados por Yamada e colaboradores (2003) para potássio (2097,30 a 2254 mg/100g), magnésio (262,27 a 294,60 mg/100g) e cálcio (185,77 a 239,60 mg/100g) ao analisarem quatro cultivares de soja amarela desenvolvidas em São Paulo. Parengam (2010) obteve resultado inferior, em uma variedade de soja amarela, para potássio (1736,10 mg/100g) e magnésio (188,13 mg/100g) e superior para cálcio (331,37 mg/100g) em comparação aos resultados obtidos neste estudo.

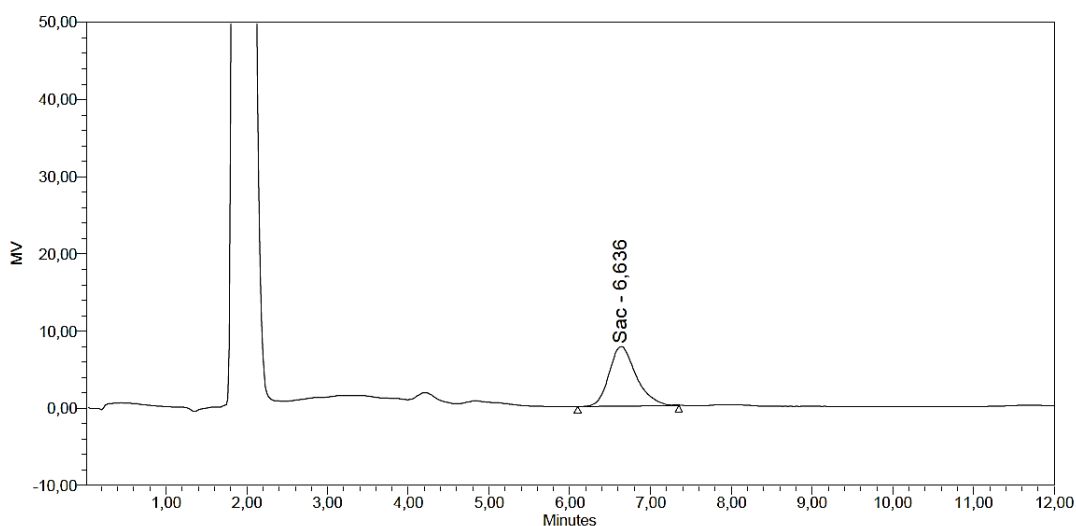
Segundo Bianchi e colaboradores (1992), entre os alimentos de origem vegetal, a soja se destaca por apresentar considerável teor de ferro (9 a 13 mg/100g). Neste contexto, com relação aos teores de ferro nas amostras analisadas (9,04 a 11,52 mg/100g), resultados semelhantes (9,23 mg/100g) foram relatados por Yamada e colaboradores (2003), assim como por Parengam (2010), inferiores por Ologhobo e Fetuba (1984) e Ciabotti e colabores (2006) e superiores (13,39 a 19,12 mg/100g) em pesquisa realizada por Vieira e colaboradores (1999) ao estudarem grãos de soja com tegumento amarelo.

Os minerais manganês, zinco, cobre, cobalto e selênio foram detectados em todas as amostras analisadas em concentrações que variaram de 2,02 a 2,84 mg/100g, 4,07 a 4,64 mg/100g, 1,69 a 1,94 mg/100g, 0,01 a 0,02 mg/100g e 0,33 a 0,38 mg/100g, respectivamente. Resultados superiores para manganês (2,91 mg/100g) e alumínio (4,04 mg/100g) foram expressos por Parengam (2010). A linhagem BRM11-51400 se destacou em termos de composição em minerais por apresentar teores de potássio, magnésio, cálcio, fósforo, zinco e cobre mais significativos que os determinados nas demais amostras avaliadas.

4.3 Análise de açúcares

Devido a sua importância em soja, foi realizado a quantificação dos teores de rafinose e estaquiose nas linhagens de soja preta devido à sua ingestão estar relacionada com sensação de desconforto abdominal (produção de gases) e de sacarose, uma vez que grãos com teores mais elevados deste composto possam ser sensorialmente melhores aceitos.

A ordem de eluição dos açúcares foi: sacarose ($t_R = 6,3$ minutos), rafinose ($t_R = 8,4$ minutos) e estaquiose ($t_R = 15,4$ minutos) (Figura 24). Com exceção à alteração na concentração da fase móvel (acetonitrila 75% para acetonitrila 70 %) e no fluxo (1,4 mL/min para 1,0 mL/min), necessária para a posterior separação da rafinose e estaquiose, as condições de análise cromatográfica destes açúcares foram as mesmas utilizadas para sacarose.



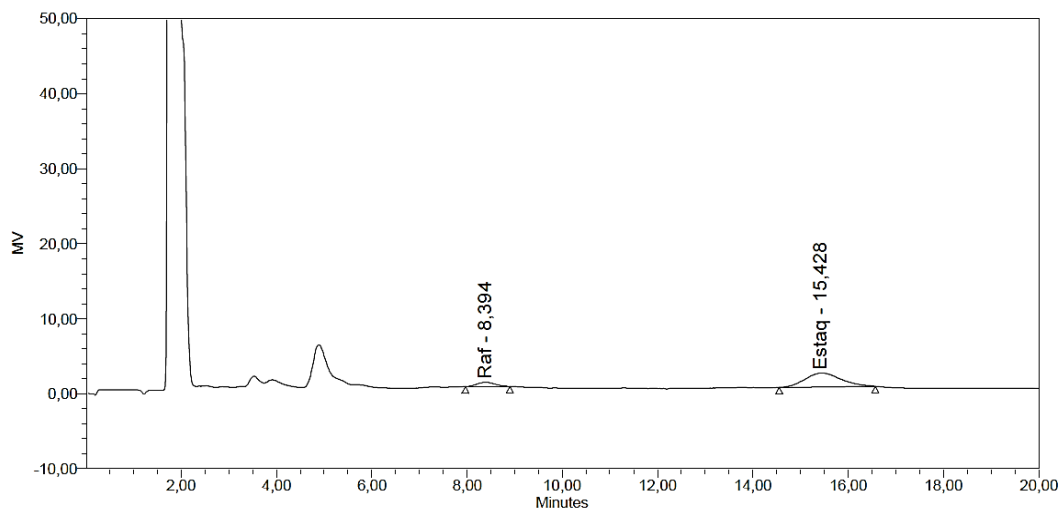


Figura 24. Cromatogramas de sacarose, rafinose e estaquiose.

Os teores de sacarose, rafinose e estaquiose foram na faixa de 3,56 a 6,46 g/100g, 1,41 a 1,56 g/100g e 4,67 a 5,24 g/100g, respectivamente (Tabela 15).

Tabela 15. Teores de açúcares (g/100g) das linhagens de soja preta (base seca).

Linhagem	Sacarose	Rafinose	Estaquiose
BRM09-50901	6,46 ^a ±0,25	1,56 ^a ±0,04	4,67 ^a ±0,14
BRM09-50995	6,42 ^a ±0,17	1,45 ^b ±0,07	4,86 ^a ±0,28
BRM09-50682	3,56 ^c ±0,01	1,47 ^b ±0,02	4,69 ^a ±0,40
BRM11-51400	4,03 ^b ±0,16	1,41 ^b ±0,02	5,24 ^a ±0,35

A sacarose, além de representar cerca de 50% da composição de açúcares totais nos grãos de soja (QURESHI et al., 2001) é considerada um dos principais compostos que influenciam o sabor desta leguminosa. Pode-se considerar que as linhagens BRM09-50901 (6,46 g/100g) e BRM09-50995 (6,42 g/100g) apresentaram os resultados mais satisfatórios para este açúcar, uma vez que, apesar do sabor dos grãos de soja depender da presença de aminoácidos, ácidos orgânicos, sais inorgânicos, flavonoides e saponinas em sua composição, teores elevados de sacarose melhoraram a qualidade sensorial por mascararem o sabor adstringente relacionado a presença de alguns destes componentes (MASUDA, 1991).

Os resultados apresentados no presente estudo estão na faixa descrita na literatura, uma vez que, ao quantificarem a concentração de sacarose em genótipos/cultivares de soja preta e amarela, Oliveira e colaboradores (2010) encontraram teores que variaram de 2,38 a 6,33 g/100g com média de 4,33 g/100g para as sementes com tegumento amarelo e 4,50 g/100g para as sementes com tegumento preto. Foi relatado em estudo realizado por Lee e colaboradores (2013) teor de sacarose de 4,50 g/100g em uma cultivar de soja preta desenvolvida na Coreia.

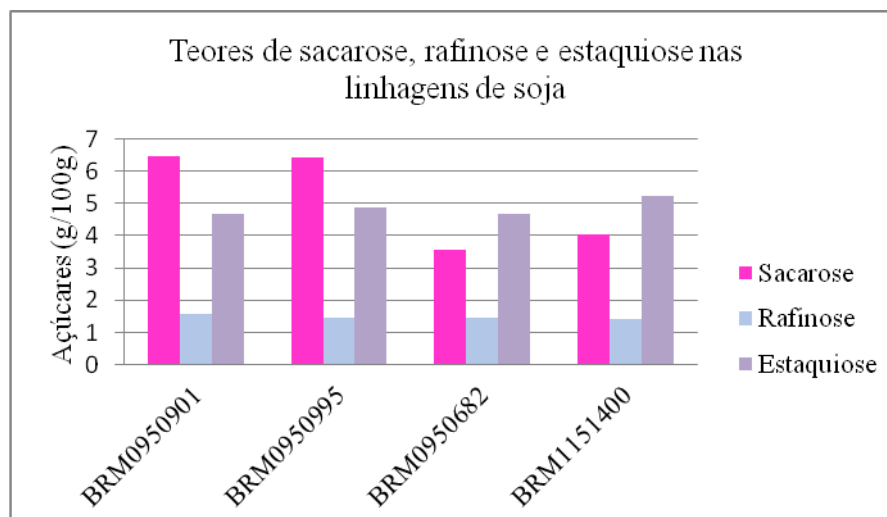


Figura 25. Teores de açúcares nas linhagens de soja preta.

As linhagens BRM09-50995, BRM09-50682 e BRM11-51400 não diferiram estatisticamente em relação ao teor de rafinose que se apresentou na faixa de 1,41 a 1,47 g/100g. É desejável para uso como alimento humano o desenvolvimento de linhagens de soja com reduzida concentração de rafinose. Resultados médios inferiores (0,78 g/100g) foram apresentados por Oliveira e colaboradores (2010) ao quantificarem a concentração deste açúcar em seis genótipos/cultivares de soja preta.

A distribuição dos açúcares na soja varia de acordo com a cultivar estudada, mas em geral, a estaquiouse é o oligossacarídeo detectado em maiores concentrações (PETTERSON & MAKINTOSH, 1994). Os teores de estaquiouse presentes nas quatro linhagens de soja preta variaram de 4,67 a 5,24 g/100g não havendo diferença estatística entre as amostras estudadas. Resultados semelhantes (2,74 a 5,20 g/100g) foram relatados em estudo realizado por Oliveira e colaboradores (2010) ao avaliarem o conteúdo de estaquiouse em seis genótipos/cultivares de soja preta. Menores teores deste açúcar (1,91 g/100g) foram apresentados por Lee e colaboradores (2013) ao analisarem a presença deste componente em uma cultivar soja preta (Ipumgeumjeong).

O estudo do conteúdo de açúcar em linhagem de soja é importante por possibilitar o desenvolvimento de cultivares comerciais com qualidade sensorial mais adequada ao consumo humano. Desta forma, por possuírem teores mais elevados de sacarose, espera-se que as linhagens BRM09-50901 e BRM09-50995 apresentem melhor palatabilidade quando comparadas com as demais linhagens avaliadas. Por outro lado, é possível que o consumo da linhagem BRM09-50901 esteja associado a maior sensação de desconforto abdominal por parte dos consumidores, uma vez que esta apresentou concentração mais elevada de rafinose em sua composição.

4.4 Determinação do teor e perfil de aminoácidos

O conteúdo e o perfil de aminoácidos presentes nas linhagens de soja encontram-se na Tabela 16. Os teores de aminoácidos em g/100g de amostra foram convertidos para g/100g de proteína considerando os valores médios individuais deste macronutriente nas linhagens de soja avaliadas.

Tabela 16. Teores de aminoácidos (g/100g de proteína) nas linhagens de soja preta (base seca).

Aminoácidos	BRM09-50901	BRM09-50995	BRM09-50682	BRM11-51400
Não essenciais				
Ácido aspártico	8,79 ^a ±0,18	8,77 ^a ±0,29	8,17 ^a ±0,24	8,49 ^a ±0,16
Serina	5,20 ^a ±0,23	5,15 ^a ±0,25	4,89 ^a ±0,12	4,75 ^a ±0,11
Ácido glutâmico	14,84 ^a ±0,36	14,82 ^a ±0,52	14,83 ^a ±0,41	14,10 ^a ±0,25
Glicina	3,01 ^a ±0,10	3,52 ^a ±0,25	3,44 ^a ±0,50	2,71 ^a ±0,05
Alanina	3,61 ^a ±0,12	3,62 ^a ±0,13	3,42 ^a ±0,12	3,31 ^a ±0,05
Arginina	9,45 ^a ±0,43	9,28 ^a ±0,44	9,08 ^a ±0,30	9,43 ^a ±0,17
Prolina	5,42 ^a ±0,24	5,39 ^a ±0,25	5,18 ^a ±0,24	4,68 ^a ±0,08
Essenciais				
Histidina	3,04 ^a ±0,16	3,06 ^a ±0,21	2,91 ^a ±0,07	2,83 ^a ±0,05
Treonina	4,59 ^a ±0,22	4,50 ^a ±0,20	4,38 ^a ±0,11	4,13 ^a ±0,08
Tirosina	4,47 ^a ±0,21	4,40 ^a ±0,19	4,36 ^a ±0,15	3,96 ^a ±0,06
Valina	4,66 ^a ±0,19	4,62 ^a ±0,20	4,43 ^a ±0,18	4,10 ^a ±0,08
Lisina	4,32 ^a ±0,11	4,33 ^a ±0,15	4,00 ^a ±0,12	4,17 ^a ±0,05
Isoleucina	4,59 ^a ±0,18	4,52 ^a ±0,20	4,38 ^a ±0,20	4,01 ^a ±0,07
Leucina	7,38 ^a ±0,30	7,63 ^a ±0,35	7,40 ^a ±0,34	6,79 ^a ±0,13
Fenilalanina	6,36 ^a ±0,28	6,25 ^a ±0,26	6,24 ^a ±0,22	5,61 ^a ±0,09
Triptofano	0,83 ^a ±0,05	0,95 ^a ±0,05	0,92 ^a ±0,01	0,79 ^a ±0,05
Aminoácidos sulfurados				
Cisteína	0,75 ^a ±0,03	0,80 ^a ±0,04	0,77 ^a ±0,01	0,89 ^a ±0,03
Metionina	0,68 ^a ±0,03	0,66 ^a ±0,03	0,67 ^a ±0,03	0,72 ^a ±0,01

Médias com letras diferentes sobrescritas na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de médias de Fisher ($p \leq 0,05$).

Segundo Blanco e Bressani (1991) a qualidade de uma proteína é entendida como a sua capacidade em satisfazer às necessidades nutricionais do organismo humano por aminoácidos, principalmente os essenciais, para fins de síntese proteica.

Apesar do reconhecido conteúdo proteico dos grãos de soja, é de extrema importância considerar a qualidade nutricional desta proteína. Segundo Lambein e colaboradores (2005) grande parte dos aminoácidos essenciais ao organismo humano, se encontram disponíveis nas sementes de soja.

Neste contexto, foram identificados, pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, sete aminoácidos não essenciais (ácido aspártico, serina, ácido glutâmico, glicina, alanina, arginina e prolina) e onze aminoácidos essenciais (histidina, treonina, tirosina, valina, lisina, isoleucina, leucina, fenilalanina, triptofano, cisteína e metionina) nas quatro linhagens de soja preta.

Não foi observada diferença estatística entre os teores de aminoácidos presentes nas quatro linhagens de soja preta que apresentaram desta forma a mesma qualidade nutricional em relação ao seu perfil proteico. Os aminoácidos mais abundantes foram a ácido glutâmico, arginina, ácido aspártico e a leucina que se apresentaram na faixa de 14,10 a 14,84 g/100g,

9,08 a 9,45 g/100g, 8,17 a 8,79 g/100g e 6,79 a 7,63 g/100g, respectivamente. Resultados semelhantes foram reportados em estudo realizado por Vieira e colaboradores (1999) que também determinaram maior conteúdo médio de ácido glutâmico (21,49 g/100g), ácido aspártico (13,85 g/100g) e leucina (7,55 g/100g) em seis cultivares de soja amarela.

A cisteína e a metionina foram os aminoácidos detectados em menores concentrações nas quatro linhagens estudadas, assim como observado nos grãos de soja em geral, apresentando valores que variaram de 0,28 a 0,33 g/100g e 0,24 a 0,26 g/100g de proteína, respectivamente. Quando comparado com a recomendação de aminoácidos essenciais para adultos (Tabela 17) (FAO/WHO, 2007), com exceção dos teores de aminoácidos sulfurados e da lisina que foram inferiores, as quatro linhagens de soja preta analisadas apresentaram teores de aminoácidos essenciais superiores ao recomendado.

Tabela 17. Necessidades de aminoácidos essenciais da FAO/WHO (2007) para adultos.

Aminoácidos essenciais	Quantidade recomendada (g/100g de proteína) FAO/WHO (2007)
Treonina	2,3
Valina	3,9
Metionina	1,6
Isoleucina	3,0
Leucina	5,9
Lisina	4,5
Histidina	1,5
Fenilalanina + Tirosina	3,8
Metionina + Cisteína	2,2

Além da quantidade de proteína ingerida diariamente, a qualidade deste macronutriente representada pela sua composição em aminoácidos essenciais, também deve ser considerada, uma vez que a ausência ou a reduzida concentração de um aminoácido essencial resulta em um limitado aproveitamento da proteína pelo organismo humano. Desta forma, considerando que as principais fontes de proteína sejam os alimentos de origem animal, para que indivíduos, principalmente os vegetarianos, obtenham a mesma qualidade nutricional desta proteína, se torna necessária à ingestão de uma mistura complementar de proteínas vegetais.

4.5 Determinação dos teores de fitato

Os teores de fitato determinados nas linhagens de soja preta estão apresentados na Tabela 18.

Tabela 18. Teores de fitato nas linhagens de soja preta (base seca).

Linhagem	Fitato (mg/g)
BRM09-50901	12,21 ^{bd} ±1,17
BRM09-50995	14,88 ^a ±1,08
BRM09-50682	11,91 ^d ±0,75
BRM11-51400	14,04 ^{ba} ±0,97

Os teores de fitato nas quatro linhagens de soja preta variaram de 11,91 a 14,88 mg/g, sendo a BRM09-50995 e a BRM11-51400 as linhagens com o maior conteúdo de fitato. Resultados superiores foram reportados por Mandarino e colaboradores (2004) (17 a 27 mg/g) ao avaliarem uma variedade de soja amarela. Todas as amostras avaliadas estão dentro dos limites aceitáveis para sementes de soja, que segundo Isanga & Zhang (2008), podem variar de 1 a 2,3%.

Segundo Heaney e colaboradores (1991), genótipos de soja com elevados teores de fitato não são desejados para o consumo humano, principalmente devido a ingestão deste componente estar associada com a redução da biodisponibilidade de alguns minerais divalentes, principalmente o zinco, cálcio, ferro, cobre e proteínas. Sendo assim, considerando apenas as propriedades deletérias do fitato, pode-se considerar que a linhagem BRM09-50682 obteve o resultado mais satisfatório por ter apresentando o teor mais reduzido deste fator antinutricional.

Em contrapartida, Harland e Narula (1999) afirmam que além dos efeitos anteriormente citados, o ácido fítico é também considerado um componente bioativo devido principalmente, à sua ação antioxidante. Desta forma, segundo Onomi e Katayama (2004) uma concentração de ácido fítico acima de 10% favorece a atuação deste componente como uma substância antinutricional, enquanto quando detectado em menores concentrações a ação funcional prevalece.

4.6 Determinação do teor e perfil de isoflavonas

O cromatograma e espectros de massa UV das isoflavonas daidzina, glicitina, genistina, daidzeína, gliciteína e genisteína estão apresentados na figura 26.

O tempo de retenção do pico de cada isoflavona foi de: pico 1: $t_R = 3,6$ minutos, pico 2: $t_R = 4,1$ minutos, pico 3: $t_R = 4,4$ minutos, pico 4: $t_R = 6,1$ minutos, pico 5: $t_R = 6,3$ minutos e pico 6: $t_R = 6,6$ minutos.

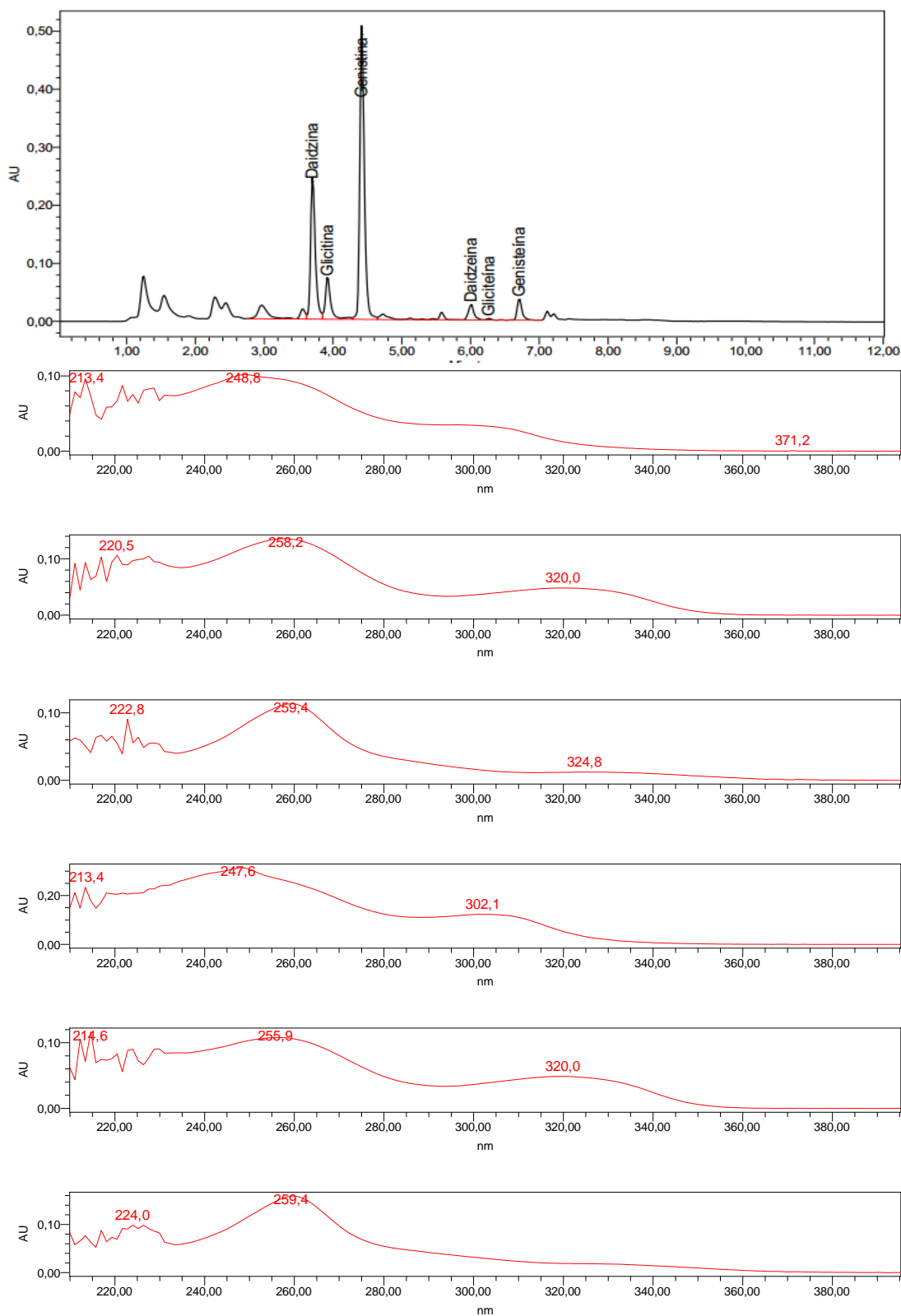


Figura 26. Cromatograma (1) e espectros de massa UV das isoflavonas (a) daidzina, (b) Glicitina, (c) Genistina, (d) Daidzeína, (e) Gliciteína e (f) Genisteína.

Os teores de isoflavonas individuais e totais (mg/100g) presentes nas quatro linhagens de soja preta encontram-se expressos na Tabela 19.

Tabela 19. Teor de isoflavonas (mg/100g) aglicona nas linhagens de soja preta (base seca).

Isoflavona	BRM09-50901	BRM09-50995	BRM09-50682	BRM11-51400
Daidzina	30,55 ^c ±1,38	78,97 ^a ±1,17	49,15 ^b ±1,19	76,16 ^a ±1,06
Glicitina	15,85 ^d ±0,77	30,93 ^a ±0,44	18,76 ^c ±0,70	24,37 ^b ±0,75
Genistina	38,82 ^d ±1,80	87,62 ^b ±1,44	72,19 ^c ±1,50	103,78 ^a ±2,05
Daidzeína	2,85 ^a ±0,08	7,35 ^b ±0,09	5,02 ^c ±0,09	6,83 ^d ±0,08
Gliciteína	1,07 ^d ±0,03	1,47 ^a ±0,03	1,27 ^b ±0,03	1,19 ^c ±0,02
Genisteína	2,88 ^c ±0,14	7,13 ^a ±0,13	6,04 ^b ±0,13	5,83 ^b ±0,02
Totais	59,82 ^c ±2,34	138,65 ^a ±3,67	99,43 ^b ±2,34	140,75 ^a ±3,54

Médias com letras diferentes sobrescritas na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de médias de Fisher ($p \leq 0,05$).

Foi observada diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre os teores de isoflavonas individuais e totais nas linhagens avaliadas. As linhagens BRM09-50995 e BRM11-51400 foram as amostras com os maiores teores de isoflavonas totais, enquanto a BRM09-50901 apresentou o teor consideravelmente mais reduzido (59,82 mg/100g).

As formas glicosídicas de isoflavonas foram detectadas em maiores concentrações, sendo a genistina a isoflavona majoritária em todas as amostras com teores que variaram de 38,82 a 103,78 mg/100g, seguida pela daidzina (30,55 a 78,97 mg/100g) e pela glicitina (15,85 a 30,93 mg/100g). O maior conteúdo de genistina e glicitina foi observado nas linhagens BRM11-51400 (103,78 mg/100g) e BRM09-50995 (30,93 mg/100g), respectivamente. As linhagens BRM09-50995 e BRM11-51400 não diferiram estatisticamente em relação aos seus conteúdos de daidzina. Estes resultados estão de acordo com Fukutake e colaboradores (1996) que afirmaram que as isoflavonas glicosiladas são as formas detectadas nos grãos de soja em teores mais expressivos.

Em relação às formas agliconas, a genisteína foi a isoflavona detectada em maior concentração na linhagem BRM09-50995 (7,13 mg/100g) e em teor mais reduzido na BRM09-50901 (2,88 mg/100g). Esta foi também a forma aglicona observada em teores mais elevados nas linhagens BRM09-50901 (2,88 mg/100g) e na BRM09-50682 (6,04 mg/100g), enquanto a BRM09-50995 e a BRM11-51400 apresentaram maior valor de daidzeína (7,35 e 6,83 mg/100g, respectivamente).

Xu e Chang (2008) avaliaram a concentração de isoflavonas presente nas cascas dos grãos de soja preta, nos grãos de soja preta descascados e inteiros, além de compararem o conteúdo deste composto em sementes de soja com tegumento preto e amarelo. Como resultado, foi observada maior concentração de isoflavonas totais nos grãos de soja descascados (99,31 mg/100g) e inteiros (96,01 mg/100g) e teor mais reduzido nas cascas das sementes (47,75 mg/100g). Foi ainda observado pelos autores um teor mais expressivo de isoflavonas totais nos grãos de soja amarelos (197,80 mg/100g) em relação ao valor detectado nos grãos de soja com tegumento preto (96,01 mg/100g), que foi dentro da faixa observada nas quatro linhagens de soja preta avaliadas no presente estudo (59,82 a 140,75 mg/100g).

No entanto, resultado diferente foi relatado por Cho e colaboradores (2013) em estudo comparativo sobre o conteúdo de isoflavonas presentes em grãos de soja com diferentes colorações de tegumento, uma vez que o teor médio deste componente nos grãos de soja preta (237,40 mg/100g) foi semelhante ao observado na soja amarela (239,34 mg/100g). A semente

de soja verde apresentou o conteúdo mais expressivo de isoflavonas (307,94 mg/100) e o grão de soja com tegumento marrom o valor mais reduzido (182,18 mg/100g).

Quando considerada a concentração de isoflavonas individuais nas quatro linhagens de soja preta avaliadas no presente estudo, considera-se que resultados inferiores de daidzina (8,29 a 31,58 mg/100g), glicitina (6,07 a 13,40 mg/100g), genistina (5,59 a 30,71 mg/100g) e daidzeína (0,24 a 2,86 mg/100g) e superiores gliciteína (0,73 a 3,42 mg/100g) e genisteína (0,37 a 10,05 mg/100g) foram observadas por Ha e colaboradores (2009) ao avaliarem seis cultivares de soja preta desenvolvidas em diferentes localizações. No entanto, com exceção ao conteúdo de glicitina (15,85 a 30,93 mg/100g) que foi superior nas quatro linhagens estudadas, o teor de daidzina (28,04 a 69,45 mg/100g) e genistina (41,05 a 77,31 mg/100g) observado por Lee e Cho (2012) em cinco cultivares de soja preta foi semelhante aos valores relatados nas quatro amostras avaliadas nesta pesquisa (30,55 a 78,97 mg/100 e 38,82 a 103,78 mg/100, respectivamente).

Em relação à presença de isoflavonas totais em grãos de soja preta, pode-se considerar que o conteúdo deste composto nas quatro linhagens de soja (59,82 a 140,75 mg/100g), foi semelhante ao observado por Xu e Chang (2008) (96,01 mg/100g), por Kumar e colaboradores (2010) (46,49 a 147,88 mg/100g) e por Lee e Cho (2012) (75,22 a 160,80 mg/100g), e superior ao relatado por Lee e colaboradores (2010) (77,0 mg/100g). Os teores mais expressivos de isoflavonas totais em sementes de soja com tegumento preto foram observados em estudos realizados por Ha e colaboradores (2009) (98,72 a 297,99 mg/100g) e por Cho e colaboradores (2013) (72,30 a 390,46 mg/100g).

Os resultados observados neste estudo estão de acordo com os dados já reportados em grãos de soja preta. Pode-se ainda considerar que a variação entre os teores de isoflavonas presentes nas linhagens de soja avaliadas, principalmente em relação à reduzida concentração na linhagem BRM09-50901, foi devido, principalmente ao fator linhagem, uma vez que as amostras foram desenvolvidas na mesma época de crescimento, localização geográfica e condições ambientais de desenvolvimento.

4.7 Determinação do teor e perfil de antocianinas monoméricas totais (AMT)

A determinação do perfil e quantificação das antocianinas é fundamental para avaliação de novas linhagens e cultivares de soja preta que começam a ser produzidos no Brasil. No entanto, a extração destes compostos para análise é dificultada devido à complexidade da composição desta matriz. Além da matriz vegetal analisada, diferentes fatores analíticos são responsáveis pela eficácia da metodologia de extração incluindo, o solvente, o pH, a temperatura e o tempo de extração desses compostos.

Os teores de antocianinas totais detectados nos diferentes métodos de extração encontram-se expressos na Figura 27.

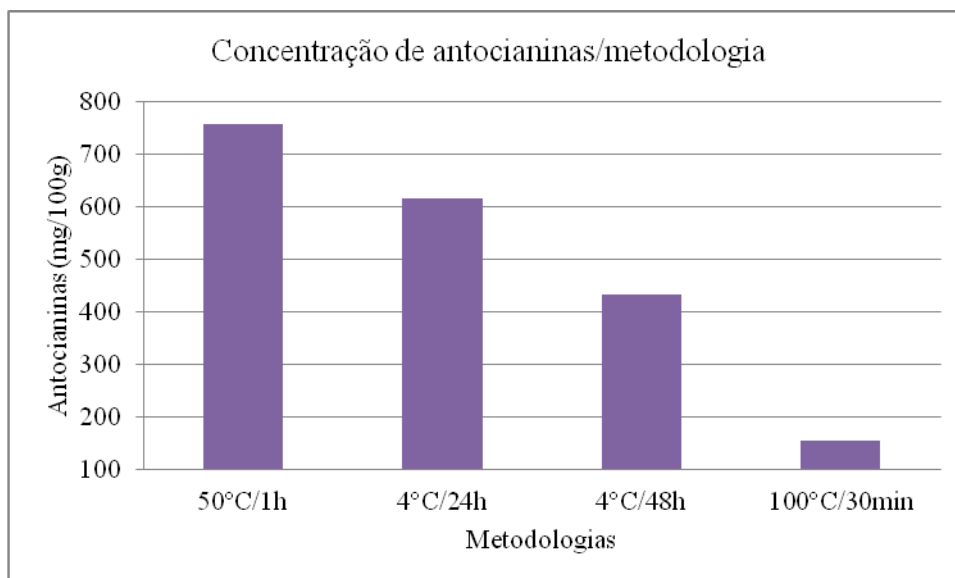


Figura 27. Teores de antocianinas totais quantificados nas diferentes metodologias testadas.

As metodologias testadas variaram em termos de tempo e temperatura de extração de acordo com as condições descritas por Wang e colaboradores (2014) (50°C/1h), Lee e colaboradores (2013) (4°C/24h) e Cho e colaboradores (2013) (4°C/48h), incluindo a extração realizada a 100°C/30 minutos. Os resultados foram comparados em relação à quantidade de antocianinas totais detectadas através das metodologias anteriormente citadas. Os teores de antocianinas foram expressos em miligramas de antocianinas por cem gramas de amostra.

A linhagem utilizada no presente estudo foi a BRM09-50901 desenvolvida no programa de melhoramento de soja para a alimentação humana da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. As antocianinas foram extraídas das cascas dos grãos com metanol, que de acordo com Terci e colaboradores (2004), apesar de sua toxicidade é 20% mais eficiente na extração que o etanol, devendo este último ser utilizado apenas quando o aspecto quantitativo não for relevante.

O conteúdo de antocianinas totais encontrado nos métodos de extração a 50°C/1 hora; 4°C/24 horas; 4°C/48 horas e 100°C/30 minutos foi de 757 mg/100g, 615 mg/100g, 432 mg/100g e 155 mg/100g, respectivamente. No entanto, entende-se que a temperatura ótima assim como o tempo de extração de antocianinas é dependente da matriz estudada. De acordo com Cacace & Mazza (2003), quando extraídas de groselhas, as antocianinas começam a ser degradadas em temperatura superior a 35°C. Por outro lado, segundo Pompeu e colaboradores (2009) a temperatura ótima para a extração de antocianinas presentes nos frutos de açaí é de 58°C enquanto, para Fan e colaboradores (2008) a temperatura utilizada na extração destes pigmentos em batata doce deve ser de 80°C/1hora.

O presente estudo permitiu a escolha da metodologia mais eficaz para a extração das antocianinas presentes nas cascas das linhagens de soja preta. Comparando os resultados obtidos, foi possível concluir que a melhor metodologia para a extração destes compostos foi a realizada a 50°C/1h, uma vez que o teor de antocianinas totais foi superior ao comparado com os das demais metodologias. Desta forma, é importante ressaltar que a eficácia do método de extração de antocianinas depende, principalmente, da matriz analisada, sendo imprescindível a escolha de uma metodologia simples, rápida e de baixo custo.

O perfil de antocianinas presente nas linhagens de soja preta foi determinado por espectrometria de massas. Foi realizado o isolamento das antocianinas por coleta manual na

saída do detector e seus espectros de massa acurada foram posteriormente obtidos por infusão direta em espectrômetro de massas (Q-TOF Synapt (Waters®) (Figura 28).

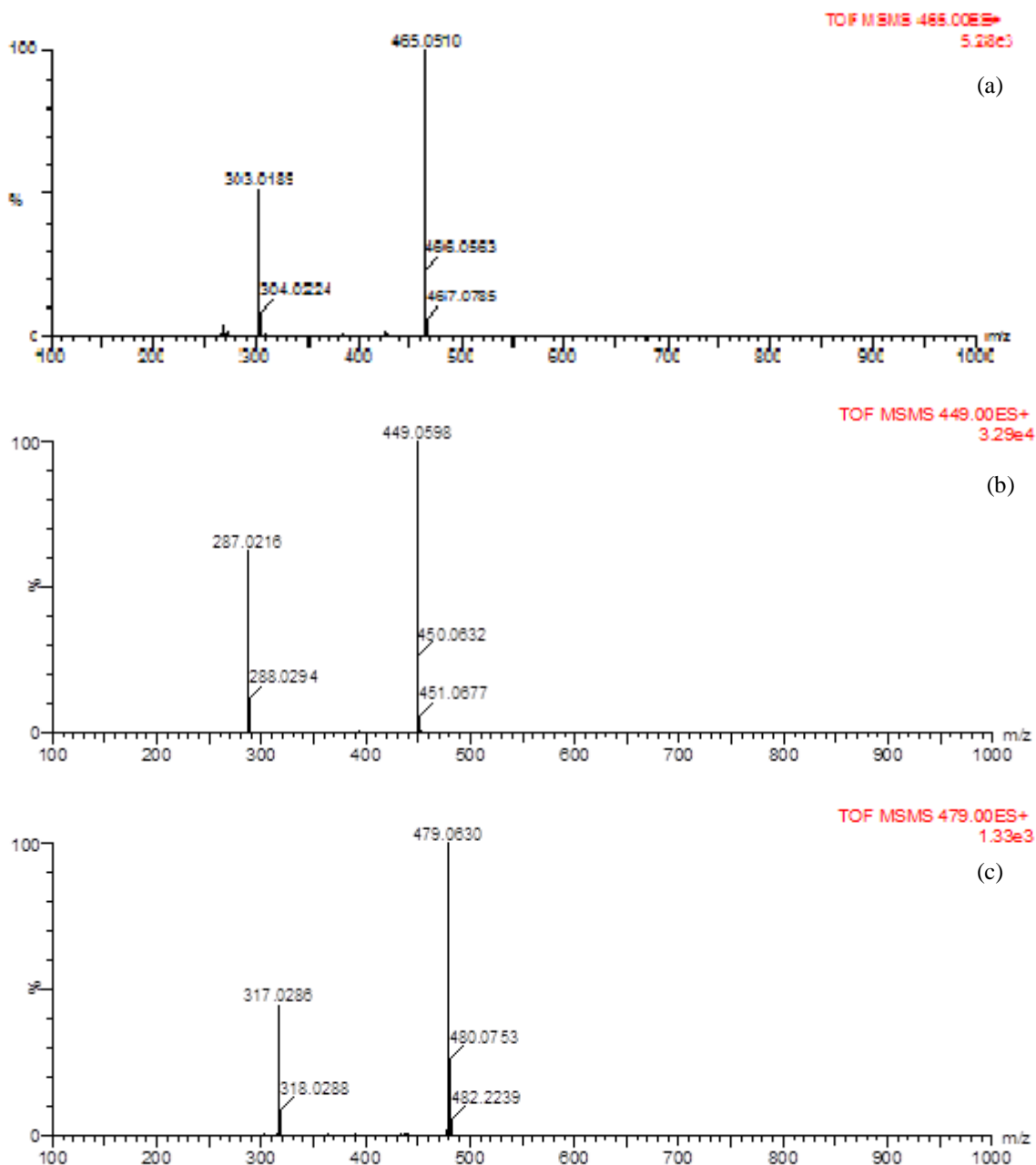
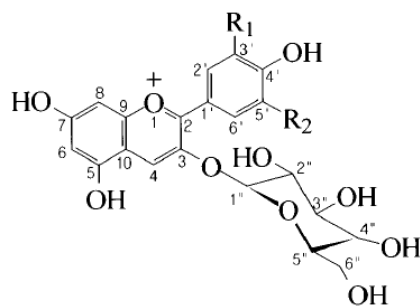


Figura 28. Espectros de massas exatas (Pico (a): delfinidina-3-O-glicosídeo; Pico (b): cianidina-3-O-glicosídeo; Pico (c): petunidina-3-O-glicosídeo) dos perfis de antocianinas isolados das cascas dos grãos de soja preta.

Foram identificadas, por cromatografia líquida de alta eficiência, três antocianinas nas quatro linhagens de soja preta avaliadas: a delfinidina-3-O-glicosídeo, a cianidina-3-O-glicosídeo e a petunidina-3-O-glicosídeo (Figura 29).



-
- 1: Delfinidina-3-O-glicosídeo, R1= OH, R2= OH
 2: Cianidina-3-O-glicosídeo, R1= OH, R2= H
 3: Petunidina-3-O-glicosídeo, R1= OCH3, R2= OH
-

Figura 29. Estruturas químicas das antocianinas detectadas nas cascas das linhagens de soja preta.

Considerando que as antocianinas da soja com tegumento preto se encontram distribuídas exclusivamente nas cascas dos grãos (Kim et al., 2006; Xu e Chang, 2008; Wang et al., 2014), a extração foi realizada apenas nesta parte da semente. Os cromatogramas das antocianinas presentes nas cascas dos grãos das quatro linhagens de soja estão apresentados na Figura 30.

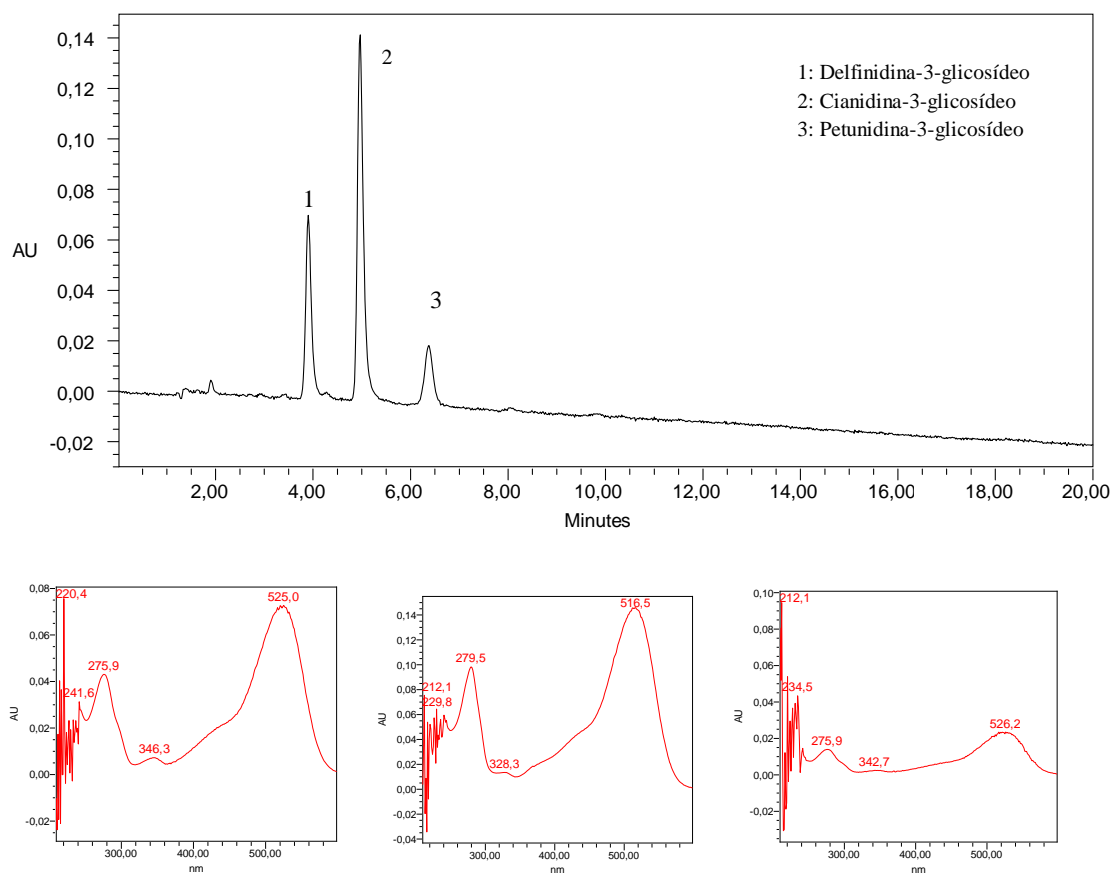


Figura 30. Cromatograma dos extratos de antocianinas à 520 nm das linhagens de soja preta e espectros UV.

Os tempos de retenção da delfinidina-3-O-glicosídeo, cianidina-3-O-glicosídeo e petunidina-3-O-glicosídeo foram, respectivamente: 3,5, 4,4 e 6,3 minutos. Os conteúdos de antocianinas individuais e totais (Tabela 20) foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência que segundo Sánchez-Moreno e colaboradores (2003) e Wu e colaboradores (2006) é o método mais eficaz para a quantificação desses compostos em alimentos.

Tabela 20. Conteúdo de antocianinas individuais e totais (mg/100g) nas cascas das linhagens de soja preta (base seca).

Linhagens	Delfinidina-3-O-glicosídeo	Cianidina-3-O-glicosídeo	Petunidina-3-O-glicosídeo	Antocianinas totais
BRM09-50901	184,41 ^c ±14,34	641,10 ^b ±27,83	21,73 ^b ±2,75	847,25 ^b ±40,62
BRM09-50995	316,72 ^a ±28,60	720,45 ^a ±65,06	153,06 ^a ±10,32	1190,50 ^a ±102,53
BRM09-50682	129,61 ^d ±5,88	262,27 ^d ±17,76	6,34 ^c ±0,51	398,22 ^c ±24,01
BRM11-51400	237,07 ^b ±6,09	494,53 ^c ±6,63	18,62 ^b ±1,14	750,22 ^b ±10,34

Foi observada diferença estatística entre os teores de antocianinas individuais e totais nas linhagens de soja preta. O conteúdo de delfinidina-3-O-glicosídeo, cianidina-3-O-glicosídeo, petunidina-3-O-glicosídeo e antocianinas totais variaram de 129,61 a 316,72 mg/100g, 262,27 a 720,45 mg/100g, 6,34 a 153 mg/100g e 398,22 a 1190,50 mg/100g, respectivamente.

A cianidina-3-O-glicosídeo foi a antocianina majoritária em todas as linhagens estudadas, sendo detectada em maior concentração na linhagem BRM09-50995 e em valor mais reduzido na BRM09-50682. Segundo Lee e colaboradores (2009) e Zhang e colaboradores (2011) a cianidina-3-O-glicosídeo é a antocianina majoritária em grãos de soja com tegumento preto, estando outras (petunidina-3-O-glicosídeo, peonidina-3-O-glicosídeo e delfinidina-3-O-glicosídeo) presentes nas cascas destas sementes em concentrações mais reduzidas.

O maior teor de delfinidina-3-O-glicosídeo foi também observado na linhagem BRM09-50995 (316,72 mg/100g) que diferiu estatisticamente das demais linhagens avaliadas. A petunidina-3-O-glicosídeo foi a antocianina quantificada em menor concentração nas quatro linhagens de soja estudadas. A linhagem BRM09-50995 apresentou teor sete vezes maior (153,06 mg/100g) ao observado nas linhagens BRM09-50901 (21,73 mg/100g) e BRM11-51400 (18,62 mg/100g), que não diferiram estatisticamente entre si, e 24 vezes superior ao relatado na BRM11-50682 (6,34 mg/100g).

As mesmas antocianinas (petunidina-3-O-glicosídeo, cianidina-3-O-glicosídeo e delfinidina-3-O-glicosídeo) foram identificadas em estudo realizado por Choung e colaboradores (2001), no entanto, somente a cianidina-3-O-glicosídeo (94 a 1598 mg/100g) foi detectada nas dez variedades de soja preta estudadas.

Xu e Chang (2008) avaliaram a distribuição de antocianinas em casca de soja preta, em grão de soja preta descascado e em semente de soja com tegumento amarelo. Os autores identificaram a cianidina-3-O-glicosídeo e petunidina-3-O-glicosídeo e a peonidina-3-O-glicosídeo nas cascas dos grãos, não sendo detectada nenhuma antocianina nos grãos de soja preta descascados ou na semente de soja amarela.

Estudo recente realizado por Cho e colaboradores (2013) investigaram a presença de fenólicos solúveis como a antocianinas presentes na casca de grãos de soja com diferentes

colorações de tegumentos, incluindo amarela, marrom, verde e preta. Dentre as diferentes variedades analisadas, as antocianinas foram detectadas exclusivamente nos grãos de soja preta, com concentrações médias de 1104,6 mg/100g de cianidina-3-O-glicosídeo, 197,1 mg/100g de delfinidina-3-O-glicosídeo e 55,7mg/100g de petunidina-3-O-glicosídeo.

Em relação ao conteúdo de antocianinas totais (AMT), o presente estudo relatou teores que variaram de 398,23 a 1190,23 mg/100g, superior a faixa de 22 a 187 mg/100g determinada por Jin-Rui e colaboradores (2007) ao analisarem 127 genótipos de soja preta e inferior ao resultado apresentado por Jeng e colaboradores (2010) (723,0 a 2025,0 mg/100g) em estudo com três variedades de soja preta e por Zhang e colaboradores (2011) (2132 mg/100g) em sessenta variedades de soja preta desenvolvidas na China.

Considerando as linhagens estudadas, a BRM09-50995 apresentou os teores mais elevados de antocianinas individuais (delfinidina-3-O-glicosídeo: 316,72 mg/100g; cianidina-3-O-glicosídeo: 720,45 mg/100g; petunidina-3-O-glicosídeo: 153,06 mg/100g) e totais (1190,23 mg/100g), enquanto a linhagem BRM09-50682 apresentou os menores resultados para todos os perfis detectados (delfinidina-3-O-glicosídeo: 129,61 mg/100g; cianidina-3-O-glicosídeo: 262,27 mg/100g; petunidina: 6,34 mg/100g).

A cianidina-3-O-glicosídeo representou de 60,52 a 75,67% do total de antocianinas e foi o perfil majoritário em todas as linhagens analisadas, assim como em todas as amostras descritas nos estudos anteriormente citados. A delfinidina-3-O-glicosídeo e a petunidina-3-O-glicosídeo contribuíram com respectivamente, 21,77 a 32,55% e 1,59 a 12,86% do total de antocianinas nas quatro linhagens de soja, sendo a petunidina-3-glicosídeo o perfil isolado em menores concentrações.

4.8 Determinação do teor e perfil de carotenoides

O conteúdo de luteína, β -caroteno e carotenoides totais das quatro linhagens de soja preta está expresso na Tabela 21.

Tabela 21. Teores de carotenoides ($\mu\text{g}/100\text{g}$) presentes nas linhagens de soja preta (base seca).

Linhagem	Luteína	β -caroteno	Totais
BRM 0950901	280,64 ^{ab} \pm 23,50	62,98 ^b \pm 9,61	416,66 ^b \pm 32,27
BRM 0950995	331,09 ^a \pm 46,42	103,66 ^a \pm 24,15	563,75 ^a \pm 78,54
BRM 0950682	258,60 ^{bc} \pm 25,13	57,30 ^b \pm 3,93	388,08 ^b \pm 34,97
BRM1151400	214,78 ^c \pm 8,70	76,44 ^b \pm 7,37	360,56 ^b \pm 23,65

Médias com letras diferentes sobrescritas na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de médias de Fisher ($p \leq 0,05$)

Foram detectados, através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, dois diferentes carotenoides nas quatro linhagens de soja preta: a luteína e o β -caroteno com tempos de retenção de 6,6 e 16,4 minutos, respectivamente (Figura 31).

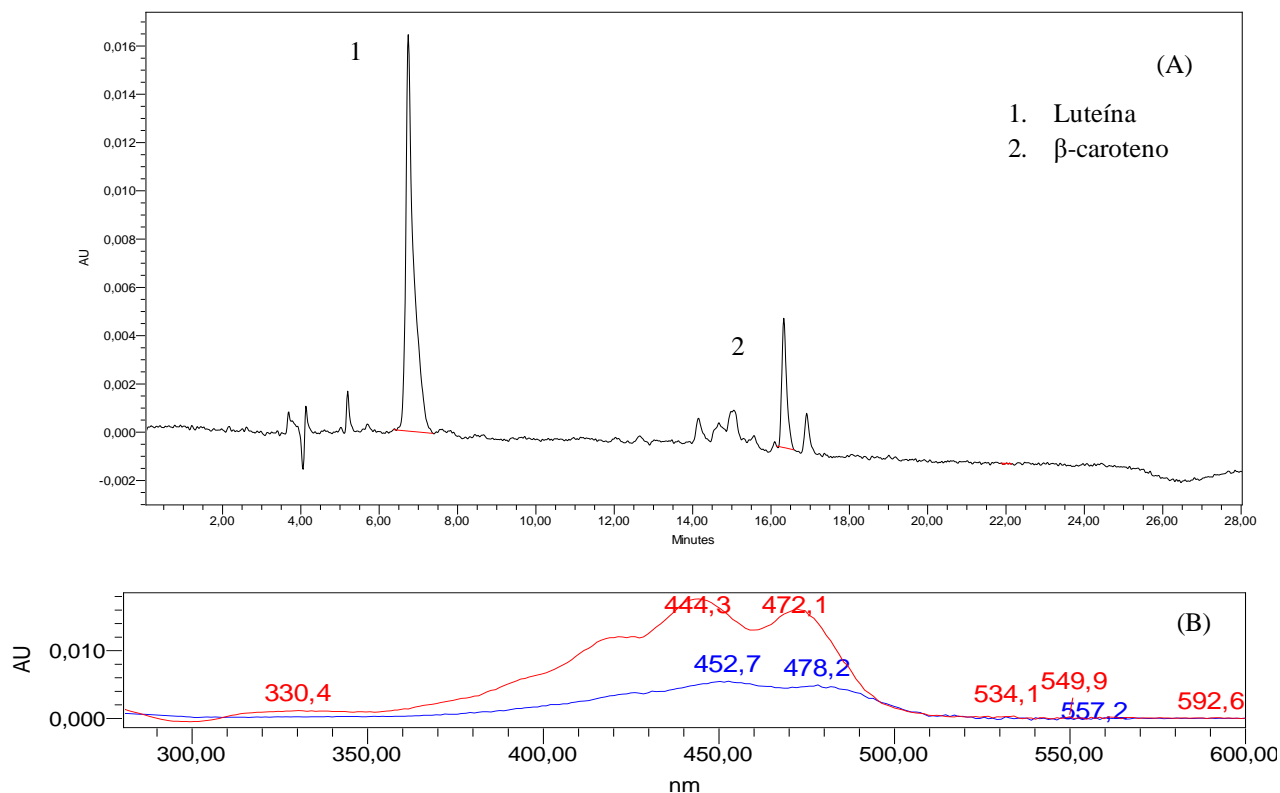


Figura 31. Cromatograma do extrato de carotenoides à 450nm das linhagens de soja preta (A) e espectros de UV (B).

A luteína foi o carotenoide majoritário nas quatro linhagens de soja preta, sendo detectada em teores que variaram de 214,78 a 331,09 $\mu\text{g}/100\text{g}$. Os maiores valores foram observados nas linhagens BRM 0950901 (280,64 $\mu\text{g}/100\text{g}$) e BRM 0950995 (331,09 $\mu\text{g}/100\text{g}$) e representaram, respectivamente, 67,35% e 58,75% do total de carotenoides presentes nestas amostras. A BRM11-51400 foi a linhagem com o teor mais reduzido deste carotenoide, diferindo estatisticamente das demais linhagens.

O conteúdo de β -caroteno nas linhagens de soja foi na faixa de 57,30 a 103,66 $\mu\text{g}/100\text{g}$, sendo a BRM09-50995 a linhagem com o teor mais elevado deste composto, enquanto as linhagens BRM09-50901, BRM09-50682 e BRM11-51400 não diferiram estatisticamente.

Slavin e colaboradores (2009) analisam o perfil e quantificaram os teores de carotenoides na fração etérea do grão de soja preta (μg de carotenoide/g de óleo). Como resultado, foram identificados quatro diferentes carotenoides: a luteína, o β -caroteno, a criptoxantina e a zeaxatina em teores que variaram de 171,8 a 510,3 $\mu\text{g}/\text{g}$, 30,4 a 49,1 $\mu\text{g}/\text{g}$, 1,9 a 6,9 $\mu\text{g}/\text{g}$ e 60,0 a 217,4 $\mu\text{g}/\text{g}$, respectivamente.

4.9 Determinação da atividade antioxidante pelo método do radical DPPH e ABTS

Os valores da atividade antioxidante das linhagens de soja preta determinada pelos métodos DPPH e ABTS e estão representados na Tabela 22.

Tabela 22. Valores da atividade antioxidante dos extratos das linhagens de soja preta determinada pelos métodos DPPH e ABTS.

Linagem	DPPH EC ₅₀ (g/g DPPH)	ABTS (μmolTrolox/g)
BRM09-50901	2471,98 ^b ±194,09	20,97 ^b ±3,08
BRM09-50995	1072,92 ^a ±148,98	41,35 ^a ±2,63
BRM09-50682	6195,02 ^c ±346,44	15,98 ^b ±1,78
BRM11-51400	1337,18 ^a ±87,75	43,79 ^a ±3,17

Os resultados para a atividade antioxidante determinados pelo método DPPH foram expressos como EC₅₀, que é definido como a quantidade de antioxidantes necessária para reduzir a concentração inicial de DPPH em 50%. Desta forma, quanto maior for o consumo de DPPH por uma amostra, menor será o valor de EC₅₀ e maior a sua capacidade antioxidante (ANTOLOVICH et al 2002; LIMA et al, 2008; COSTA et al, 2010). Os resultados da atividade antioxidante das quatro linhagens de soja preta medida pelo método de captura do radical ABTS foram expressos como TEAC (capacidade antioxidante total do composto equivalente ao trolox) que é definido como a concentração de TROLOX que apresenta o mesmo percentual de inibição que uma concentração de mM do composto de referência (LIMA, 2008).

Em relação à capacidade antioxidante das linhagens de soja preta medida pelo método do radical DPPH, a BRM09-50995 e a BRM11-51400 apresentaram os valores mais elevados (EC₅₀=1072,92 g/g e EC₅₀=1337,18 g/g, respectivamente), seguida pela BRM09-50901 (EC₅₀=2471,98 g/g) e BRM09-50682 (EC₅₀=6195,02 g/g) (figura 33).

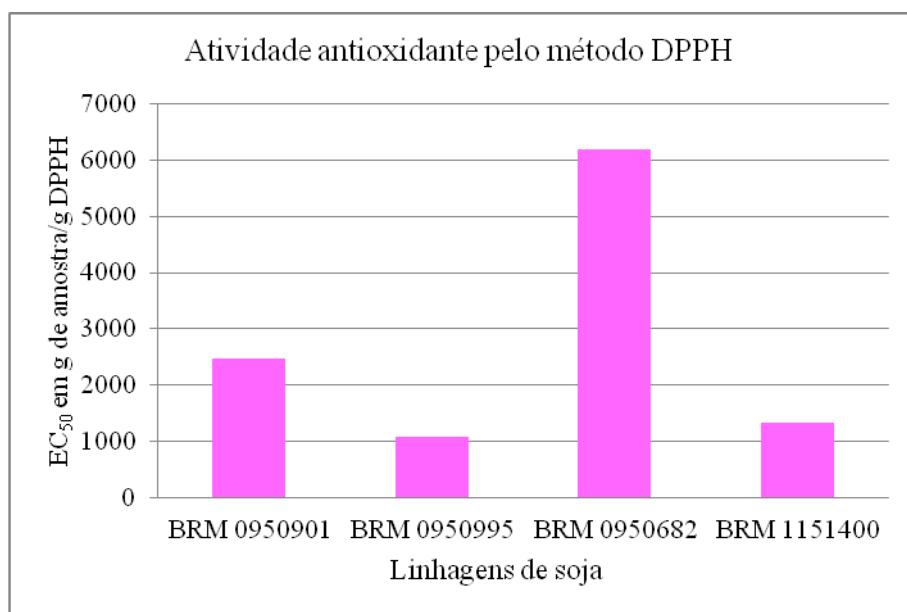


Figura 32. Atividade antioxidante das linhagens de soja preta determinada pelo método do radical DPPH.

A maior capacidade antioxidante foi observada nas linhagens BRM09-50995, que também apresentou o teor mais elevado de antocianinas monoméricas totais (1190,50 mg/100g) e de isoflavonas totais (138,65 mg/100g), e na BRM11-51400 que não diferiu estatisticamente da linhagem BRM09-50995 quanto ao seu teor de isoflavonas totais (140,75

mg/100g). Por outro lado, a linhagem BRM09-50682 com o conteúdo significativamente mais reduzido de antocianinas monoméricas totais (398,22 mg/100g) foi a linhagem com atividade antioxidante menos expressiva. Ainda que não tenha sido observada diferença estatística entre os teores de antocianinas nas linhagens BRM09-50901 (847,25 mg/100g) e BRM11-51400 (750,22 mg/100g) esta última apresentou uma maior capacidade antioxidante, possivelmente, devido ao teor de isoflavonas relativamente superior (140,75 mg/100g) ao observado na BRM09-50901 (59,82 mg/100g).

O resultado referente à atividade antioxidante das linhagens de soja preta determinada pelo método DPPH (BRM09-50995 = BRM11-51400 > BRM09-50901 > BRM09-50682), foi similar ao relato pelo método ABTS (BRM09-50995 = BRM11-51400 > BRM09-50901 = BRM09-50682) (Figura 34), uma vez que em ambos os métodos as linhagens BRM09-50995 e BRM11-51400 apresentaram os maiores valores de atividade antioxidante.

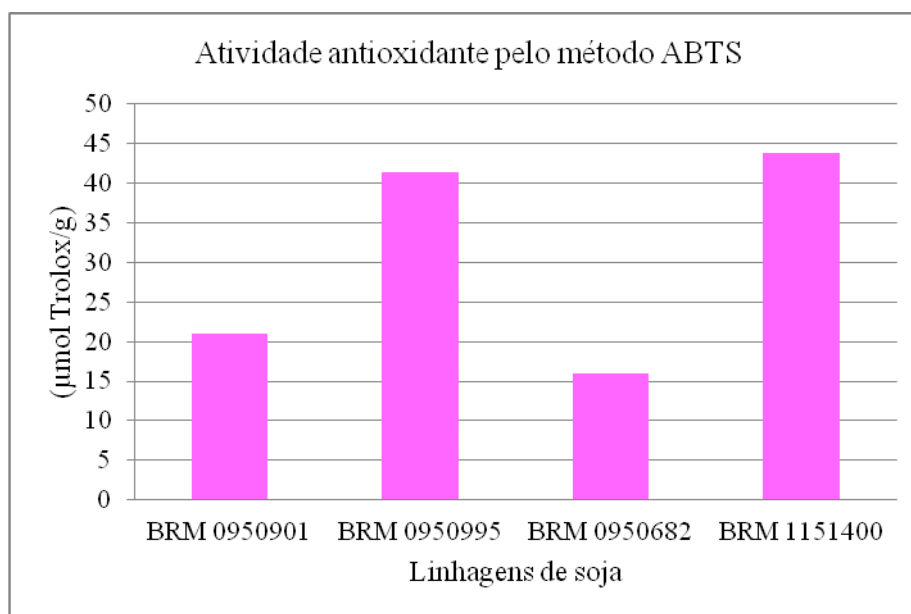


Figura 33. Atividade antioxidante das linhagens de soja preta determinada pelo método do radical ABTS.

Os maiores valores de capacidade antioxidante, determinada pelo método do radical ABTS, foram observados nas linhagens BRM11-51400 (43,79 μmol Trolox/g) e BRM09-50995 (41,35 μmol Trolox/g). Pode-se considerar que o método de captura do radical ABTS, quando comparado à atividade antioxidante medida pelo método DPPH, se mostrou menos sensível à presença de antocianinas nos grãos, uma vez que apesar de serem consideradas estatisticamente semelhantes em relação ao conteúdo de isoflavonas totais, a maior concentração de antocianinas monoméricas na linhagem BRM09-50995 (1190,50 mg/100g) não foi capaz de resultar um maior valor de atividade antioxidante quando medida pelo método em questão.

A menor sensibilidade do método ABTS à presença de antocianinas também foi observada entre os resultados relatados nas linhagens BRM09-50901 (20,97 μmol Trolox/g) e BRM09-50682 (15,98 μmol Trolox/g), uma vez que a concentração duas vezes superior de antocianinas monoméricas totais na BRM09-50901 (847,25 mg/100g) não determinou diferença significativa entre os valores de atividade antioxidante destas amostras, possivelmente devido a maior concentração de isoflavonas totais na linhagem BRM09-50682 (288,37 mg/100g) em relação ao teor de 161,70 mg/100g observado na BRM09-50901. Por

outro lado, quando comparada pelo método do radical DPPH, a capacidade antioxidante da BRM09-50901 (2471,98 g/g DPPH) foi consideravelmente superior a relatada na BRM09-50682 (6195,02 g/g DPPH), determinando, desta forma, maior sensibilidade deste método à presença de antocianinas e menor ao conteúdo de isoflavonas quando comparada com o método ABTS.

Outros estudos também correlacionaram a presença de antocianinas e isoflavonas à maior capacidade antioxidante em grãos de soja preta. Cho e colaboradores (2013) avaliaram a atividade antioxidante pelos métodos de captura do radical DPPH e ABTS, em grãos de soja com tegumento preto, amarelo, marrom e verde. Os resultados de atividade antioxidante medida pelo método do radical DPPH foram os mesmos determinados pelo método do radical ABTS (soja preta > soja marrom > soja verde > soja amarela). Os valores mais expressivos foram determinados nas sementes de soja preta devido à maior presença de antocianinas nas cascas destes grãos. O conteúdo de antocianinas também foi determinante para a atividade antioxidante da soja marrom, uma vez que, apesar de ter apresentado o menor conteúdo de isoflavonas totais, a capacidade antioxidante das sementes com esta coloração de tegumento foi superior à observada nos grãos de soja amarela e verde, desprovidos de antocianinas em sua composição.

Xu e Chang (2008) avaliaram a capacidade antioxidante pelo método DPPH nas cascas, nos grãos inteiros, e nos grãos de soja preta descascados. Como resultado, foi observado, nas cascas dos grãos, o valor mais elevado de atividade antioxidante em relação aos grãos inteiros e descascados, que apresentaram capacidade antioxidante semelhante. Segundo estes autores, estes resultados podem ser explicados devido à presença exclusiva de antocianinas nas cascas dos grãos de soja preta.

Esse resultado está de acordo com o observado nas quatro linhagens de soja preta avaliadas neste estudo e com a pesquisa realizada por Zhang e colaboradores (2011), ao avaliarem sessenta cultivares de soja preta, uma vez que foi relatado, em todos os estudos, uma positiva correlação entre os teores de antocianinas monoméricas totais e a atividade antioxidante dos grãos de soja preta.

5 CONCLUSÕES

- Apesar de apresentarem diferenças significativas ($p \leq 0,05$) em relação aos teores de lipídeos, cinzas as amostras estudadas apresentaram composição centesimal na faixa encontrada para cultivares de tegumento amarelo em geral.
- O potássio foi o mineral mais abundante em todas as linhagens de soja, seguido pelo fósforo magnésio e cálcio. A BRM11-51400 foi a linhagem com o resultado mais expressivo, uma vez que apresentou a maior concentração de potássio, magnésio, cálcio, fósforo, zinco e cobre.
- Em relação aos fatores antinutricionais, os teores de fitatos presentes em todas as linhagens foram dentro dos limites consideráveis aceitáveis para sementes de soja (1 a 2,3%).
- Espera-se que as linhagens BRM09-50901 e BRM09-50995 sejam sensorialmente mais aceitas, uma vez apresentaram as maiores concentrações de sacarose.
- Foram identificados nas amostras avaliadas sete aminoácidos não essenciais, oito essenciais, e dois aminoácidos sulfurados, incluindo a cisteína e a metionina. O ácido glutâmico foi o aminoácido mais abundante, seguindo pela arginina, ácido aspártico e leucina.
- Em relação aos compostos bioativos, foram identificadas nas quatro linhagens de soja preta três antocianinas, (cianidina-3-O-glicosídeo, delphinidina-3-O-glicosídeo e a petunidina-3-O-glicosídeo), seis isoflavonas (daidzina, genistina, glicitina, daidzeína, genisteína e gliciteína) e dois carotenoides (luteína e β -caroteno), observados em teores mais elevados na linhagem BRM09-50995, que também apresentou atividade antioxidante mais expressiva quando determinada pelo método de captura do radical DPPH.
- A linhagem BRM09-50995 apresentou maior concentração de todos os compostos bioativos avaliados, no entanto, o presente trabalho possibilitou determinar que todas as linhagens de soja preta avaliadas são indicadas para o consumo humano.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AACC. AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS. Approved methods of AACC. 9 ed. St. Paul: AACC, 1995.

ALVES-RODRIGUES, A.; SHAO, A. The science behind lutein. *Toxicology Letters*, n. 150, p. 57-83, 2004.

AL-WESALI, M.; LAMBERT, N.; WELHAM, T.; DOMONEY, C. The influence of pea seed trypsin inhibitors on the in vitro digestibility of casein. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.68, p.431-437, 1995.

ANDRADE-WARTHA, E. R. S. Propriedades antioxidantes de clones do pedúnculo do caju (*Anacardium occidentale* L.): efeito sobre a lipoperoxidação e enzimas participantes do sistema antioxidante de defesa do organismo animal. Tese. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P. D.; PATSALIDES, E.; MACDONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. **Journal Royal Society Chemistry**, v. 127, p. 183-198, 2002.

AOAC. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 18th ed. (ed. W. HOROWITZ), Washington, DC. 2005. 1 CD-ROM.

AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY). **Official methods of analysis**. 19.ed. Gaithersburg, 3000p, 2012.

ARMSTRONG, G. A. Genetics of eubacterial carotenoid biosynthesis: a colorful tale. **Annual Review of Microbiology**, v. 51, p. 629-659, 1997.

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.

BARNES S.; PRASAIN J.; D'ALESSANDRO T.; WANG C.; ZHANG H.; KIM H. Soy Isoflavones. In: HEBER, D.; BLACKBURN G.L; GO V.L.W, MILNER. **Journal Nutritional oncology**, 2nd ed. St. Louis: Academic Press, p. 559-571, 2006.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, p. 123-30, 1999.

BIANCHI, M. L. P.; SILVA, H. C.; OLIVEIRA, J. E. D. Considerações sobre a biodisponibilidade do ferro dos alimentos. **Archivos Latino-americanos de Nutricion**, v. 42, n. 2, p. 94-100, 1992.

BLACK, R. J. Complexo soja: fundamentos, situação atual e perspectiva. In: CÂMARA, G. M. S. (Ed.). Soja: tecnologia de produção II. Piracicaba: ESALQ, p.1- 18, 2000.

BLANCO, A.; BRESSANI, R. Biodisponibilidad de aminoácidos in el frijol (*Phaseolus vulgaris*). **Archivos Latinoamericano de Nutrición**, v. 41, p. 38-51, 1991.

BOHLAND, A. R.; GARNER, G. B.; O'DELL, B. L. Identification and properties of "phytate" in cereal and oilseed products, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 23, p. 1186, 1975.

BONETTI, L. P. Distribuição da soja no mundo: origem, história e distribuição. In : MIYASAKA, S.; MEDINA, J.C. (Ed.). A soja no Brasil. Campinas : ITAL, p. 1-6, 1981.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Alimentos. Comissões e Grupos de Trabalho. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos. Atualizado em julho de 2008. IX -Lista das Alegações Aprovadas. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>. Acesso em: 05 abr. 2012.

BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H. Carotenoids today and challenges for the future. In: Carotenoids: isolation and analysis. Switzerland: BIRKHAUSER, v. 1A, Capítulo. 2, p. 13-26, 1995.

BROUILLARD, R. Anthocyanins as food colors; Markakis, P., ed.; Academic Press: New York, capítulo 1, 1982.

BURBANO, C.; MUZQUIZ, M.; OSAGIE, A.; AYET, G.; CUADRADO, C. Determination of phytate and lower inositol phosphates in spanish legumes by HPLC methodology. **Food Chemistry**, v.52, p.321- 325, 1995.

CACACE. J. E.; MAZZA, G. Optimization of extraction of Anthocyanins from Black Currants with Aqueous Ethanol. **Journal of Food Science**, v. 68, p. 240-248, 2003.

CAO, G.; PRIOR, R. L. Measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 50-62, 1999.

CARRÃO-PANIZZI, M. C.; BELÉIA, A. P.; KITAMURA, K.; OLIVEIRA, M. C. N. Effects of genetics and environment on isoflavone content of soybean from different regions of Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, p. 1787-1795, 1999.

CARRATU, E.; SANZINI, E. Sostanze biologicamente attive presenti negli alimenti di origine vegetale. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanità**, v. 41, p. 7-16, 2005.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 3 ed. Campinas: Fundação Cargill, p. 428, (2010).

CASSIDY, A.; ALBERTAZZI, P.; NIELSEN, IL.; HALL, W.; WILLIAMSON, G.; TETENS, I.; ATKINS, S.; CROSS, H.; MANIOS, Y.; WOLK, A.; STEINER, C.; BARNCA, F. Critical review of health effects of soybean phytoestrogens in postmenopausal women. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 65, p. 76-92, 2006.

CASTAÑEDA-OVANDO, A.; PACHECO-HERNANDEZ, M. L.; PAEZ-HERNANDEZ, M. E.; RODRIGUEZ, J. A.; GALAN-VIDAL, C. A. Chemical studies of anthocyanins: A review. **Food Chemistry**, v. 133, p.859-871, 2009.

CHO, K. M.; HA, T. J.; LEE, Y. B.; SEO, W. D.; KIM, J. Y.; RYU, H. W.; JEONG, S. H.; KANG, Y. M.; LEE, J. H. Soluble phenolics and antioxidante properties of soybean (*Glycine mal L.*) cultivars with varying seed coat colours. **Journal of Functional Foods**, v. 5, p. 1065-1076, 2013.

CHO, S. J., JULLERAT, M. A., LEE, C. H. Cholesterol lowering mechanism of soybean protein hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 55, p. 10599-10604, 2007.

CHO, S. J.; JULLERAT, M. A.; LEE, C. H. Identification of LDL-receptor transcription stimulating peptides from soybean hydrolysate in human hepatocytes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 56, p. 4372-4376, 2008.

CHOUNG, M. G.; BEAK, I. Y.; KANG, S. T.; HAN, W. Y.; SHIN, D. C.; MOON, H. P. Isolation and determination of anthocyanins in seed coats of black soybean (*Glycine max (L.) Merr.*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 5848–51, 2001.

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

CNPSo. Embrapa Soja. *Soja: história*. Disponível em < [http:// www.cnpso.embrapa.br/](http://www.cnpso.embrapa.br/)> Acesso em 07.08.2014.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Fundamentos de cromatografia. Campinas, SP: Editora da UNICAMP. 2006.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Introdução a métodos cromatográficos. 5ª ed. Campinas: Editora da Unicamp, 1993.

CONAB, 2014. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento de safra brasileira: grãos, sétimo levantamento, abril 2012 / Companhia Nacional de Abastecimento. Brasília: **Conab, 2012**.

CORNWELL, T.; COHICK, W.; RASKIN, I. Dietary phytoestrogens and health. **Phytochemistry**, v. 65, p. 995-1016, 2004.

COSTA, L. M.; MOURA, N. F.; MARANGONI, C.; MENDES, C. E.; TEIXEIRA, A. O. Atividade antioxidante de pimentas do gênero *Capsicum*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, supl. 1, maio, 2010.

COWARD, L.; BARNES, N.C.; SETCHELL, K.D.R.; BARNES, S. Genistein, daidzein, and their β -glycoside conjugates: Antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, p. 1961-1967, 1993.

CUMMINGS, J. H.; MACFARLANE, G. T. Gastrointestinal effects of prebiotics. **British Journal of Nutrition**, v.87, p.145-151, 2002.

DAMODARAN, S.; KIRK, P.; FENNEMA, O.R. **Food Chemistry**. 4^a ed. CRC Press, p. 1144, 2008.

DELI, J.; MOLNÁR, P.; OSZ, E.; TÓTH, G.; ZSILA, F. Epimerisation of lutein to 3'-epilutein in processed foods. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, n.14, p. 925-928, 2004.

DIXON, R. A.; FERREIRA, D. Molecules of interest: genistein. **Phytochemistry**, v. 60, p. 205-211, 2002.

DUENAS, M.; HERNADEZ, T. E. Assessment of in vitro antioxidant activity of the seed coat and the cotyledon of legumes in relation to their phenolic contents. **Food Chemistry**, v. 98, p. 95–103, 2006.

EMBRAPA. **Soja no Brasil**, 2012. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/producaosojanoBrasil.htm>. Acesso em 10 abr 2014.

FAN, G.; HAN, Y.; GU, Z.; CHEN, D. Optimizing conditions for anthocyanins extraction from purple sweet potato using response surface methodology (RSM). **LWT – Food Science and Technology**, v. 41, 155-160, 2008.

FAO/WHO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION & WORLD HEALTH ORGANIZATION. Energy and protein requirements. Report of a joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation. Technical Report Series N^o. 724. Geneva, Switzerland:WHO, 1985.

FAO/WHO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION & WORLD HEALTH ORGANIZATION. Evaluation on protein and amino acid requirements in human nutrition. Report of the joint FAO/WHO/ONU Expert consultation on protein and amino acid requirement inhuman nutrition. Geneva: United Nation University. Who Technical Report Series N^o 935; 2007.

FERNANDES, I.; FARIA, A.; CALHAU, C.; FREITAS, V.; MATEUS, N. Bioavailability of anthocyanins and derivatives. **Journal of functional foods**, v. 7, p. 54-66, 2013.

FONTANA, J. D.; MENDES, S. V.; PERSIKE, D. S.; PERACETTA, L.; PASSOS, M. Carotenoides cores atraentes e ação biológica. **Biotechnology, Ciência e Desenvolvimento**, v. 13, p.40-45, 2000.

FOOD AND NUTRITION BOARD. Institute of Medicine. Dietary References Intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids (Macronutrients). Washington DC: The National academies Press, 2005.

FRANCIS, F. J. Anthocyanins and betalains: composition and applications. **Cereal Foods World**, v. 45, p. 208-213, 2000.

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

GOMES, Pimentel: A soja. 5ª ed. São Paulo. Nobel, p.149, 1990.

GOUVÊA, A. C. M. S.; ARAUJO, M. P.; SCHULZ, D. F.; PACHECO, S.; GODOY, R. L. DE O.; CABRAL, L. M. C. Anthocyanins Standards (cyanidin-3-O-glucoside and cyanidin-3-O-rutinoside) isolation from freeze-dried açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) by HPLC. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 32, p. 1-4, 2012.

GRIESHOP, C. M.; FAHEY, G. C. Comparison of quality characteristics of soybeans from Brazil, China and the United States. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 2669-2673, 2001.

HA, T. J.; LEE, J. H.; SHIN, S.; SHIN, S.; HAN, S.; KIM, H.; KO, J.; LEE, M.; PARK, K. Changes in anthocyanin and isoflavone concentrations in black seed-coated soybean at different planting location. **Journal of Crop Science and Biotechnology**. v. 12, p. 78-86, 2009.

HALLIWELL, B. Antioxidants in human health and disease. **Annual Review of Nutrition**, v. 16, p. 33-50, 1996.

HARBORNE, J. B. The flavonoids: recent advances. **Plant Pigments**, p.298–343, 1988.

HARLAND, B. F.; NARULA, G. Phytate and its hydrolysis products. **Nutrition Research Reviews**, v. 19, p. 947-996, 1999.

HE, J.; GIUSTI, M. M. Anthocyanins: natural colorants with health promoting properties. *Food Science and Technology - Annual Reviews*, v. 1, p. 163-187, 2010.

HEANEY, R. P.; WEAVER, C. M.; FITZSIMMONS, M. L. Soybean phytate content: effect on calcium absorption. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 53, p.745-747, 1991.

HORST, M. A.; LAJOLO, F. M. Biodisponibilidade de compostos bioativos de alimentos. In: COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. v. 3, Barueri: Manole, capítulo. 36, p. 772-807. 2009.

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

ISANGA, J.; ZHANG, G. N. Soybean bioactive components and their implications to health – A review. **Food Reviews International**, v. 24, p. 252-276, 2008.

JAFFE, G. Phytic acid in soybeans. **Journal of the American Oil Chemists's Society**, v. 58, p. 493-495, 1981.

JENG, T. L.; SHIH, Y. J.; WU, M. T.; SUNG, J. M. Comparisons of flavonoids and anti-oxidative activities in seed coat, embryonic axis and cotyledon of black soybeans. **Food Chemistry**, v. 123, p. 1112–1116, 2010.

JIN-RUI.; ZHANG, M. W.; XING-HUA, L.; ZHANG-XIONG, L.; RUI-FEN.; LING, S.; LI-JUAN, Q. Correlation between antioxidant and the content of total phenolics and anthocyanin in black soybean accessions. **Agricultural Science in China**, v. 6, p. 150-158, 2007.

JOHN, J. A.; SHAHADI, F. Phenolic compounds and antioxidant activity of Brazil nut (*Berholleta excelsa*). **Journal of Functional Foods**, v. 2, p. 196-209, 2010.

KAGAWA, A. ed. Standard table of food composition in Japan. Tokyo: University of Nutrition for women, p. 104-105, 1995.

KARR-LILIENTHAL, L. K.; GRIESHOP, C. M.; MERCHEN, N. R.; MAHAN, D. C.; FAHEY, G. C. Chemical composition and protein quality comparisons of soybeans and soybean meals from five leading soybean-producing countries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 6193-6199, 2004.

KIM, K.; LIM, K. M.; KIM, C. W.; SHIN, H. J.; SEO, D. B.; LEE, S. J.; NOH, J. Y.; BAE, O. N.; SHIN, S.; CHUNG, J. H. Black soybean extract can attenuate thrombosis through inhibition of collagen-induced platelet activation. **Journal of Nutritional Biochemistry**. v. 22, p. 964-970, 2011.

KIM, KW, THOMAS, RL. Antioxidative activity of chitosans with varying molecular weight. **Food Chemistry**. v. 101, p. 308-313, 2006.

KLUMP, S. P.; ALLRED, M. C.; MACDONALD, J. L.; BALLAN, J. M. Determination of isoflavones in soy and selected foods containing soy by extraction, saponification, and liquid chromatography: collaborative study. **Journal of AOAC internation**, v. 84, p. 1865-1883, 2001.

KRINSKEY, N. I. The biological properties of carotenoids. *Pure and Applied Chemistry* 66. 1003 1010, 1994. KUNITZ, M. Crystallization of a trypsin inhibitor from soybeans. *Science*, 101, 688, 1994.

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

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

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; TRONCOSO, A. M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, p.726-732, 2005.

LAMBEIN, F.; KUO, Y-H.; IKEGAMI, F.; KUSAMA-EGUCHI, K.; ENNEKING, D. Grain legumes and human health. Proceedings of the Fourth International Food Legumes Research Conference (IFLRC-IV), P.18–22, 2005.

LAWSON, H. Food oils and fats: technology, utilization, and nutrition. New York: [s.n.], p. 339, 1995.

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

LEE, J.; HWANG, Y. S.; CHANG, W. S.; MOON, J. K.; CHOUNG, M. G. Seed Maturity differentially mediates metabolic responses in black soybean. **Food Chemistry**. v .141, p. 2052-2059, 2013.

LEE, J. H.; KANG, N. S.; SHIN, S. O.; SHIN, S. H.; LIM, S. G.; SUH, D. Y.; BAEK, I. Y.; PARK, K. Y.; HA, T. J. Characterisation of anthocyanins in the black soybean (*Glycine max* L.) by HPLC-DAD-ESI/MS analysis. **Food Chemistry**, v. 112, p. 226–231, 2009.

LIAO, H. F.; CHEN, Y. J.; YANG, Y. C. A novel polysaccharide of black soybean promotes myelopoiesis and reconstitutes bone marrow after 5-fluorouracil and irradiation-induced myelosuppression. **Life Science**, v. 77, p. 400–413, 2005.

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

LIMA, A. Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante *in vitro e in vivo*, e identificação dos compostos fenólicos presentes no Pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.). Tese (Doutorado)- Faculdade de Ciência Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental. São Paulo 182p, 2008.

LIN, P. Y.; LAI, H. M. Bioactive compounds in legumes and their germinated products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 3807-3814, 2006.

LIU, K. Nonfermented oriental soyfoods. In LIU, K. (Ed.). *Soybeans: Chemistry, Technology, and Utilization*. New York: Aspen Publishers, p.532, 1999. LIU, K. Soybean as a powerhouse of nutrients and phytochemicals. In: LIU, K. (Ed.) *Soybeans as functional foods and ingredients*. Champaign, Illinois: AOCS Press. p. 1-22, 2004.

LÓPEZ O. P.; JIMÉNEZ A. R.; VARGAS F. D. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains – characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.40, p.173-289, 2000.

MACHLIN, L. J. Critical assessment of epidemiological data concerning the impact of antioxidant nutrients on cancer and cardiovascular disease. **Critic Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 35, 41–50, 1995.

MACRAE, R. HPLC in food analysis. 2^a ed. New York. Academic Press (Food Science and technology: a series of monographs), p. 77, 1998.

MALDONADE, I. R. Produção de carotenóides por leveduras. Tese de Doutorado- Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas- São Paulo, 2003.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMENEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, p.727-747, 2004.

MANDARINO, J. M. G. Caracterização química de cultivares de soja desenvolvidas pela Embrapa Soja. In: REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL, 26., 2004, Ribeirão Preto. Resumos. Londrina: Embrapa Soja, Fundação Meridional, p. 47-48. (Embrapa Soja. Documentos, 234), 2004.

MARTEAU, P.; BOUTRON-RUAULT, M. C. Nutritional advantages of probiotics and prebiotics. **British Journal of Nutrition**, v.87, p.153-157, 2002.

MASUDA, R. Quality requirement and improvement of vegetable soybean. In: SHANMUNGASUNDARAM, S. Vegetable soybean: research needs for production and quality improvement. WORKSHOP HELD AT KENTING. Proceedings. Taiwan: Asian Vegetable Research and Development Center, p. 92-102, 1991.

MATSUDA, S.; NORIMOTO, F.; MATSUMOTO, Y.; OHBA, R.; TERAMOTO, Y.; OHTA, N.; UEDA, S. Solubilization of novel isoflavone glycoside hydrolyzing β -glucosidase from *Lactobacillus casei* subsp. *Rhamnosus*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 77, p. 439-441, 1994.

MATSUI, T.; UEDA, T.; OKI, T.; SUGITA, K.; TERAHARA, N.; MATSUMOTO, K. α -Glucosidase inhibitory action of natural acylated anthocyanins. 2. α -Glucosidase inhibition by isolated acylated anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, p. 1952-1956, 2001.

MCBRIDE, J. It plants pigments pait an oxidant substance rainbow. **Agricultural Research**, v. 44, p. 4-8, 1996.

MÉNDEZ FILHO, J. D.; RODRÍGUEZ, H. G. R. Sobre los beneficios de los radicales libres. **Revista Medica del IMSS**, v. 35, p. 309-313, 1997.

MESSINA, M.; WATANABE, S.; SETCHELL, K. D. R. Report on the 8th International Symposium on the Role of Soy in Health Promotion and Chronic Disease Prevention and Treatment. **The Journal of Nutrition**. v. 139, p. 7965-8025, 2009.

MIYAZAWA, M.; SAKANO, K.; NAKAMURA, S.; KOSAKA, H. Antimutagenic activity of isoflavones from soybean seeds (*Glycine max* Merrill). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 1346-1349, 1999.

MOHAMED, A. I.; MEBRAHTU, T.; RANGAPPA, M. Nutrient composition and anti-nutritional factors in selected vegetable soybean (*Glycine max* [L.]Merr.). **Plant Foods for human Nutrition**, v.41, p. 89-100, 1991.

MUNROE, I.; HARWOOD, M.; HLYWKA, J.; STEPHEN, A.M.; DOULL, J.; FLAMM, G. ADLERCREUTZ, H. Soy isoflavones: A safety review. **Nutrition Reviews**, v. 61, p.1-33, 2003.

MURPHY, P.A.; BARUA, K.; HAUCK, C. C. Solvent extraction selection in the determination of isoflavones in soy foods. **Journal of Chromatography B**, v. 777, p. 129–138, 2002.

NEUS, J. D.; FEHR, W. F.; SCHNEBLY, S. R. Agronomic and seed characteristics of soybean with reduced raffinose and stachyose. **Crop Science**, v. 45, p. 589-592, 2005.

OLIVEIRA, M. A.; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; LEITE, R. S.; CAMPOS FILHO, P. J.; VICENTINI, M. B. Quantificação dos teores de açúcares, oligossacarídeos e amido em genótipos/cultivares de soja (*Glycine Max* (L) Merrill especiais utilizados para alimentação humana. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 13, p. 23-29, 2010.

OLOGHOBO, A.D.; FETUGA, B.L. Biochemical assessment of some new varieties of soybeans. **Food Chemistry**, v.13, p.103-115, 1984.

OMOSIYE, O.; CHERYAN, M.; Low-phytate, full-fat protein product by ultrafiltration of aqueous extracts of whole soy beans, **Cereal Chemistry Journal**, v. 56, 58-62, 1979.

ONOMI, T.; KATAYAMA, Y. O. Effect of dietary level of phytic acid on hepatic and serum lipid status in rats fed a high-sucrose diet. **Bioscience, Biotechnology, Biochemistry**, v. 68, p.1379-1381, 2004.

ONOZAWA, M.; FAKUDA, K.; OHTANI, M.; AKAZA, H.; SUGIMURA, T.; WAKABAYASHI, K. Effects of soybean isoflavones on cell growth and apoptosis of the human prostatic cancer cell line LNCaP. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, v. 28, p. 360-363, 1998.

PACHECO, S. Preparo de padrões analíticos, estudo de estabilidade e parâmetros de validação para ensaio de carotenoides por cromatografia líquida. 2009. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Ciência dos Alimentos) – Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2009.

PARENGAM, M.; JUDPRASONG, K.; SRIANUJATA, S.; JITTINANDANA, S.; LAOHAROJANAPHAND, S.; BUSAMONGKO, A. Study of nutrients and toxic minerals in rice and legumes by instrumental neutron activation analysis and graphite furnace atomic absorption spectrophotometry. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, p. 340–345, 2010.

PARK, Y. K.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; MASCARENHAS, H. S.; SCAMPARINI, A. R. P. Conversão de malonil- β -glicosilsoflavonas em isoflavonas glicosiladas presentes em alguns cultivares de soja brasileira. **Ciência e Tecnologia dos alimentos**, v. 22, p. 130-135, 2002.

PEREIRA C. A.M.; VILEGAS J. H. Y. Constituintes químicos e farmacologia do gênero *Passiflora* com ênfase a *P. alata*, *P. edulis* e *P. incarnata*: revisão da literatura. **Revista Brasileira de Medicina**, v.3, p.1-12, 2000.

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

PETERSON, J.; DWYER, J. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. **Nutrition Research**, v. 18, p. 1995- 2018, 1998.

PETTERSON, D. S.; MAKINTOSH, J. B. The Chemical Composition and Nutritive Value of Australian Grain Legumes, Grains Research and Development Corporation, Brisbane, Australia, p. 10–13, 38-41, 1994.

PÍPOLO, A. E. Influência da temperatura sobre as concentrações de proteína e óleo em sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill). 128p. 2002. (Tese) Doutorado - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

POMPEU, D. R.; SILVA, E. M.; RONGEZ, H. Optimisation of the solvent extraction of phenolic antioxidant from fruits of *Euterpe oleracea* using Response Surface Methodology. **Bioresource Technology**, v.100, 6076-6082, 2009.

POPPI, R. J.; MARÇO, P. H. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. **Química nova**, vol. 31, p. 1218-1223, 2008.

PRADO, A. Composição fenólica e atividade antioxidante de frutas tropicais. Dissertação [Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos] - Universidade de São Paulo; 2009.

PREDY, V. R.; WATSON, R. R.; PATEL, V. B. Nuts and seeds in health and disease prevention. Academic Press, p. 1189, 2011.

PRICE, K. R.; LEWIS, J.; WYATT, G. M.; FENWICK, G. R. Flatulence-causes, Relation to diet and remedies. *Nahrung*, v. 32, p. 609-626, 1988.

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

QURESHI, N.; LOLAS, A.; BLASCHEK, H. P. Soy molasses as fermentation substrate for production of butanol using *Clostridium beijerinckii* BA101. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 290-295, 2001.

RACKIS, J. J.; GUMBMANN, M. R. Proteases inhibitors: physiological properties and nutritional significance. *Antinutrients and Natural Toxicants in Foods*, v. 203, 1982.

RANGEL, M. A. S.; CAVALHEIRO, L. R.; CAVICHIOLLI, D.; CARDOSO, P. C. Efeito do genótipo e do ambiente sobre os teores de óleo e proteína nos grãos de soja, em quatro ambientes da Região Sul de Mato Grosso do Sul, safra 2002/ 2003. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste (Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 17), 2004.

RATNAM, D. V.; ANKOLA, D. D.; BHARDWAJ, V.; SAHANA, D. K.; RAVI KUMAR, M. N. V. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. **Journal of Controlled Release**, v. 113, p. 189-207, 2006.

REYNOLDS, K.; CHIN, A.; LEES, K. A.; NGUYEN, A.; BUINOWSKI, D.; HE, J. A metaanalysis of the effect of soy protein supplementation on serum lipids. **The American Journal of Cardiology**, v. 98, p. 633-640, 2006.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. **Química de Alimentos**. 1ª edição, Instituto Mauá de Tecnologia, Editora: Edgard Blücher Ltda, São Paulo, p. 155-157, 2004.

RODRIGUES-AMAYA, D. A Guide to Carotenoid Analysis in Foods, OMNI Research: ILSI Press: Washington D. C. 1999.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J. Fontes brasileiras de carotenóides – **Tabela brasileira de composição de carotenóides em alimentos**, Ministério do Meio Ambiente, 2008.

ROWLAND, I.; FAUGHNAN, M.; HOEY, L.; WAHALA, K.; WILLIAMSON, G.; CASSIDY, A. Bioavailability of phyto-oestrogens. **British Journal of Nutrition**, v. 89, p. S45-S58, 2003.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS +. Comunicado técnico, 128, 2007.

RUFINO, M. S. M. Propriedades Funcionais de frutas tropicais brasileiras não tradicionais. Tese. Universidade Federal do Semi-árido, Mossoró- RN, 2008.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; CAO, G.; OU, B.; PRIOR, R. L. Anthocyanin and proanthocyanidin content in selected White and red wines. Oxygen radical absorbance capacity comparison with nontraditional wines obtained from highblush blueberry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 4889-4896, 2003.

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

SANDBERG, A.S., CARLSSON, N.G., SVANBERG, U. Effects of inositol tri-, tetra-, penta- and hexaphosphates on in vitro estimation of iron availability. **Journal of Food Science**, v. 54, p.159-161, 1989.

SASS-KISS, A.; KISS, J.; MILOTAY, P.; KEREK, M. M.; TOTH-MARKUS, M. Differences in anthocyanin and carotenoid content of fruits and vegetables. **Food Research International**, v. 38, 1023–1029, 2005.

SETCHELL, K. D. R.; BROWN, N. M.; NECHEMIAS, L. Z.; BRASHEAR, W. T.; WOLFE, E.; KIRSCHNER, A. S.; HEUBI, J. E. Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 76, p. 447-453, 2002.

SETCHELL, K. D. R.; COLE, S. J. Variations in isoflavone levels in soy foods and soy protein isolates and issues related to isoflavone databases and food labeling. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 4146-4155, 2003.

SETCHELL, K. D. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. **American Journal Clinical of Nutrition**, Bethesda, v. 134, p.1333S-1343S, 1998.

SGARBIERI, V. C. Proteínas em alimentos protéicos. São Paulo: Varela, p. 517 p, 1996.
SGARBIERI, V. C.; WHITAKER, J. R.; Physical, chemical, and nutritional properties of common bean (*Phaseolus*) proteins. **Advances in Food Research**, v. 28, p. 93-166, 1982.

SHIH, M. C.; YANG, K. T.; KUO, S. J. Quality and antioxidant activity of black soybean tofu as affected by bean cultivar. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 67, p. 480-484, 2002.

SIANI, A.; STRAZZULLO, P.; GIACCO, A.; PACIONI, D.; CELENTANO, E.; MANCINI, M. Increasing the dietary potassium intake reduces the need for antihypertensive medication. **Annals Internal Medicine**, v. 115, p. 753-9, 1991.

SILVA, M. R.; SILVA, M. A. A. P. Fatores antinutricionais: inibidores de proteínas e lecitinas. **Revista de Nutrição**, v. 13, p. 3-9, 2000.

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

SMITH, A.K.; CIRCLE, S. J. Chemical composition of seed. In: SMITH, A. K.; CICLE, S. J (ed). Soybeans: Chemistry an Technology, Westport: Tha AVI Perblishing, v. 1, p. 61-92, 1972.

TAKAHASHI, R.; OHMORI, R.; KIYOSE, C.; MOMIYAMA, Y.; OHSUZU, F.; KONDO, K. Antioxidant activities of black and yellow soybeans against low density lipoprotein oxidation. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 53, p. 4578-4582, 2005.

TANAKA, Y.; SASAKI, N.; OHMIYA, A. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. **Plant Journal**, v. 54, p. 733-749, 2008.

TERCI, D. B. L. Aspectos analíticos e didáticos de antocianinas extraídas de frutas,2004. Tese de Doutorado, Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, 2004.

TODD, J. J.; VODKIN, L. O. Pigmented soybean (*Glycin max*) seed coats accumulate proanthocyanidins during development. **Plant Physiology**, v. 102, p. 663-670, 1993.

TORRE, M.; RODRIGUEZ, A. R.; SAURA-CALIXTO, F. Effects of dietary fiber and phytic acid on mineral availability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.1, p.1-22, 1991.

TSANGALIS, D.; SHAH, N. P. Metabolism of oligosaccharides and aldehydes and production of organic acids in soymilk by probiotic bifidobacteria. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 39, p. 541-554, 2004.

USDA – UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURAL RESEARCH SERVICE. Oilseeds: World Market and trade, 2015. Disponível em: <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/Data/SR16/sr16.html>. Acesso em:jan, 2015.

USFDA. Food labeling:Health claims. Soy protein and coronary heart disease (CHD). 21 CFR part 101.82. Federal Register 64:57699, v. 64, n. 206, October 26, 1999.

VERNETTI, F, J. Produção de sementes de soja. Caracterização de cultivares. EMBRAPA-UEPAE, Circular Técnica, p. 36, 1983.

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.

VILLELA, G. G. Pigmentos animais: Zoocromos. Editora: Academia Brasileira de Ciências, p. 5-31, 1976.

WANG, D.; MA, Y.; ZHANG, C.; ZHAO, X. Thermal characterization of the anthocyanins from black soybean (*Glycine max* L.) exposed to thermogravimetry. **Food Science and Technology**, v. 55, p. 645-649, 2014.

WANG, J.; MAZZA, G. Effects of anthocyanins and other phenolic compounds on the production of tumor necrosis factor alpha in LPS/IFN-gamma-activated RAW 264.7 macrophages. *J Agric Food Chem*, v.50, p.4183-4189, 2002.

WEI, H.; BOWEN, R.; CAI, Q.; BARNES, S.; WANG, Y. Antioxidant and antipromotional effects of the soybean isoflavone genistein. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicin.**, v. 208, p. 124-130, 1995.

WILCKE, H. L.; HOPKINS, D. T.; WAGGLE, D. H. Soy protein and human nutrition. Academic Press, New York, 1979.

WU, X.; BEECHER, G.; HOLDEN, G. R, HOLDEN, J. M.; HAYTOWITZ, D. B, GEBHARDT, S.; PRIOR, R. L. Concentrations of Anthocyanins in Common Foods in the United States and Estimation of Normal Consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, p. 4069–4075, 2006.

WUTTKE, W.; JARRY, H.; SEIDLOVÁ-WUTTKE, D. Isoflavones-Safe food additives or dangerous drugs? **Ageing Research Reviews**, v. 6, p. 150-188, 2007.

XAVIER-FILHO, J., CAMPOS, F. A. P. Proteinase inhibitors. In: CHEEK, P.R. Toxicants of plant origin. CRC Press. v.3: p.1-27, 1989.

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

YAMADA, L. T. P.; BARCELOS, M. F. P.; SOUSA, R. V.; LIMA. Composição química e conteúdo de ferro solúvel em soja [*Glycine max* (L.) Merrill]. *Ciência e Agrotecnologia*, v.27, p. 406-413, 2003.

YANG, Z.; ZHAI, W. Identification and antioxidant activity of anthocyanins extracted from the seed and cob of purple corn (*ZEA mays* L.). **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 11, p. 169-176, 2010.

YILMAZ, Y.; TOLEDO, R. T. Health aspects of functional grape seed constituents. **Food Science and Technology**, v. 15, p. 422-433, 2004.

ZHANG, R. F.; ZHANG, F. X.; ZHANG, M. W.; WEI, Z. C.; YANG, C. Y.; ZHANG, Y.; TANG, X. J.; DENG, Y. Y.; CHI, J. W. Phenolic Composition and Antioxidant Activity in Seed Coats of 60 Chinese Black Soybean (*Glycine max* L. Merr.) Varieties. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 5935–5944, 2011.