UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Estudo comparativo de características físico-químicas e nutricionais da
soja preta e amarela

Diana Figueiredo de Rezende

Dissertação para obtenção de grau de
MESTRE

Orientadora:
Prof^a Dr^a Ursula Maria Lanfer Marquez

São Paulo
2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Estudo comparativo de características físico-químicas e nutricionais da
soja preta e amarela

Diana Figueiredo de Rezende

Dissertação apresentada ao programa
de Programa de Pós-Graduação em
Ciência dos Alimentos para obtenção
do título de Mestre em Ciência dos
Alimentos

Orientadora:
Prof^a Dr^a Ursula M. Lanfer Marquez

São Paulo
2012

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

R467e Rezende, Diana Figueiredo de
Estudo comparativo de características físico-químicas e
nutricionais da soja preta e amarela / Diana Figueiredo de
Rezende. -- São Paulo, 2012.
118p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição
Experimental.

Orientador: Lanfer Marques, Ursula Maria

1. Alimento : Composto fenólico : Ciência dos alimentos
2. Alimento : análise : Ciência dos alimentos I. T. II. Lanfer Marques,
Ursula Maria, orientador.

Diana Figueiredo de Rezende

Estudo comparativo de características físico-químicas e nutricionais da
soja preta e amarela

Comissão Julgadora da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof^a Dr^a Ursula M. Lanfer Marquez
orientadora/presidente

Prof^a Dr^a Helena Teixeira Godoy
2º. examinadora

Prof^a Dr^a Inar Alves de Castro
3º. examinadora

São Paulo, 03 de setembro de 2012.

*A Deus,
por me proporcionar a vida, seu sentido e todos os bens.*

*Aos meus pais, Ketty e Pedro,
pelo constante apoio, incentivo e amor incondicional.*

*Aos meus irmãos,
Daniel e Adriana, Susanna, Joel, Beatriz, Djenane e Denise,
pelo carinho, alegria e motivação que sempre recebo de vocês.*

AGRADECIMENTOS

À professora Ursula Maria Lanfer Marquez, pela orientação nesta pesquisa, por compartilhar o seu conhecimento e valiosa experiência. Obrigada pela oportunidade, aprendi muito trabalhando com você!

Aos professores Adriana Zerlotti Mercadante, Jorge Mancini Filho e Beatriz Rosana Cordenunsi, pelas colaborações neste estudo e por me proporcionarem, tão cordialmente, a chance de trabalhar em conjunto com os seus laboratórios.

À amiga Fabiana Kawassaki Hirashima, por toda a paciência, por cada explicação e pela inestimável ajuda no decorrer destes experimentos. Você foi fundamental no meu aprendizado para o desenvolvimento desta pesquisa! Obrigada, ainda, por todo o apoio e incentivo, pelas horas de conversa, pelos almoços e cafés... enfim, por toda a amizade!

À amiga Isabel Louro Massaretto, pelos sábios conselhos, pela força nos momentos difíceis, por tirar minhas dúvidas e por desbravar o mundo das antocianinas comigo☺! Obrigada pelas muitas e muitas conversas, pelas centenas de cafés e por compartilhar tantas histórias e risadas!

À amiga Luciana Tedesco Yoshime, sempre tão alegre, delicada, solícita, disposta a ouvir e aconselhar, a dar um novo impulso, uma injeção de ânimo... ou mesmo para oferecer uma ajuda fotográfica ou uma assistência técnica de computador! Obrigada por todo o carinho e amizade!

Às amigas Natascha Galvão e Angela Sueko Mikaro, pela ajuda nos experimentos e pelas muitas conversas descontraídas, sempre animando o nosso dia! Muito obrigada!

Aos técnicos de laboratório, Rosa Maria, Elias, Rosângela e Lucia, pela amizade, por todo o auxílio e sempre boa disposição em ajudar. MUITÍSSIMO obrigada!

Às amigas e aos colegas, Mayra, Andressa, Érica, Elizandra, Cristina, Tathyana, Jaqueline, Cynthia, Andreia, Simone, Vanilda, Lenny, Adriana, Bianca,

Ellen, Guto, Alexandre Bera, Renatto, Aline, Karine, Caio, Gabriel, Alexandre e Davi, por tornarem os dias mais alegres e divertidos! Sou muito agradecida por este tempo de convivência com vocês!

Às amigas Marcella Marques e Lilian Mariutti, pela importante contribuição neste trabalho. Foi um prazer trabalhar com vocês! Muito obrigada!

Às queridas Fernanda Collares-Queiroz e Farayde Matta Fakhouri por me acompanharem nos primeiros passos na área de pesquisa, sempre sorridentes e dispostas a ajudar e aconselhar. Jamais esquecerei o exemplo de vocês!

Às queridas amigas de Altavila, Jacamar e Delta, pelo apoio inicial, pelo encorajamento a cada etapa e pela força na finalização! E às queridas amigas do Pontal e da Casa do Moinho, por todo amparo e carinho, fundamentais para que eu pudesse realizar este projeto! Muito, muito, muito obrigada!

A toda a minha família, por estar sempre ao meu lado, por desejar sempre minha felicidade e realização, por todo o apoio, amor, carinho... por tudo, simplesmente tudo!

A Empresa Naturalle®, especialmente Rita Maria Alves de Moraes, pelo apoio e pelo fornecimento das amostras de soja.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de mestrado, processo nº 130305/2010-3.

Aos funcionários do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental e da Secretaria de Pós-Graduação (FCF/USP), especialmente Mônica, Edilson, Jorge e Eliane, sempre solícitos.

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, o meu muito obrigada!

“...ut operaretur...” (Gen 2, 15)

*O trabalho é a vocação inicial do homem,
é uma bênção de Deus,
e enganam-se lamentavelmente
os que o consideram um castigo.*

*Tu, por seres cristão – pesquisador,
literato, cientista, político, trabalhador... –,
tens o dever de santificar essas realidades.
(São Josemaría Escrivá)*

RESUMO

REZENDE, D.F. **Estudo comparativo de características físico-químicas e nutricionais da soja preta e amarela.** 118f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciência Farmacêuticas. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

O Brasil é o segundo maior produtor de soja (*Glycine max*, L.), sendo responsável por quase 30% da colheita mundial. Mais de 80% da produção total é destinada à extração de óleo e proteína para a alimentação humana, sendo que o consumo na forma de grão e de produtos industrializados vem crescendo, como alternativa a proteínas de origem animal e devido aos potenciais benefícios à saúde. Grande parte da literatura científica refere-se à soja amarela, enquanto estudos sobre soja preta ainda são escassos. Este projeto visou estudar e comparar as características físicas e de composição química, incluindo os compostos fenólicos e atividade antioxidante da soja preta e amarela, cultivadas no Brasil em condições climáticas e ambientais similares. Fez parte do escopo do projeto avaliar o efeito do cozimento sobre os compostos polifenólicos e a atividade antioxidante. Não foi observada diferença significativa no conteúdo de nutrientes e no perfil de ácidos graxos entre a soja preta e amarela, nem nas características físicas, como massa, capacidade de hidratação e tempo de cozimento dos grãos. Porém, a soja preta apresentou teores muito mais elevados de compostos fenólicos totais (CFT) e de flavonóides em relação à soja amarela. Os teores na soja preta foram, em média, de 4,78 mg eq. ácido gálico/g e de 1,75 mg eq. catequina/g, de CFT e de flavonoides, respectivamente. A soja amarela apresentou em média 40% a menos de CFT e aproximadamente 60% a menos de flavonóides. Ao contrário da soja amarela que é desprovida de antocianinas, na soja preta foi encontrado um teor médio de 0,92 mg eq. cianidina-3-O-glicosídeo/g. Empregando a técnica de HPLC-DAD-MS/MS foram identificadas duas antocianinas, a cianidina-3-O-glicosídeo e a peonidina-3-O-glicosídeo, além da cianidina. A soja preta apresentou atividade antioxidante 70% superior à soja amarela pelo método de DPPH[•] e 50% superior, pelo método de ORAC. O cozimento dos grãos reduziu em pelo menos 40% o teor de compostos fenólicos e a atividade antioxidante, tanto na soja preta como na amarela. Foi observada uma forte correlação entre os teores de CFT, flavonóides e a atividade antioxidante, antes e após o cozimento. Assim, o consumo de soja preta ou mesmo a produção de novos alimentos a partir desses grãos poderá oferecer ao consumidor a possibilidade de diversificar a sua dieta, introduzindo um alimento com a mesma qualidade nutricional da soja amarela e, possivelmente, maiores benefícios à saúde. Vislumbra-se a possibilidade de expansão do cultivo da soja preta, inclusive por pequenos produtores, criando um novo nicho de mercado para um alimento diferenciado.

Palavras chave: soja preta, *Glycine max*, composição química, compostos fenólicos, antocianinas, atividade antioxidante

ABSTRACT

REZENDE, D.F. **A comparative study of chemical and nutritional characteristics of black and yellow soybeans.** 118p. Thesis (Master's Degree) – Faculdade de Ciência Farmacêuticas. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Brazil is the second largest producer of soybean (*Glycine max*, L.), accounting for almost 30% of the world's production. Over 80% of the total production is destined to oil extraction and protein for human consumption. Soybean and soy-product consumption has been rising as an alternative to animal protein and due to its potential health benefits. Most of the scientific literature refers to yellow soybeans, while studies on black soybeans are still scarce. This project aimed to study and compare black and yellow soybeans, cultivated in Brazil in similar climatic and environmental conditions, as to their physical characteristics and chemical composition, including phenolic compounds and antioxidant activity. The effect of cooking on phenolic compounds and antioxidant activity was also investigated. No significant difference was observed between black and yellow soybeans as to nutrient content, fatty acid composition and physical characteristics, such as seed-weight, hydration capacity and cooking time. However, black soybeans had a much higher content of total phenolic compounds (TPC) and flavonoids than yellow soybeans. TPC and flavonoid contents in black soybeans were 4.78 mg gallic acid equivalents/g and 1.75 mg (+)-catechin equivalents/g, respectively. Yellow soybeans had on average 40% less TPC and approximately 60% less flavonoids. Unlike yellow soybeans which lack anthocyanins, black soybeans were found to have an average content of 0.92 mg cyanidin-3-O-glucoside equivalents/g. High performance liquid chromatography coupled to photodiode array and mass spectrometry detectors (HPLC–DAD–MS/MS) was used to identify two anthocyanins, namely cyanidin-3-O-glucoside and peonidin-3-O-glucoside, and cyanidin. Black soybeans also showed a 70% higher DPPH-free radical scavenging activity than yellow soybeans, and a 50% higher ORAC value. Cooking reduced at least 40% of phenolic compounds and antioxidant capacity in all soybean samples, both black and yellow. High correlations between phenolic compositions and antioxidant activities were observed, before and after cooking. These results suggest that black soybean consumption or new processed food products from these crops may offer consumers an opportunity to diversify their diet with food nutritionally equivalent to yellow soybeans, but possibly with greater health benefits. The possibility of expanding black soybean cultivation, including small-scale production, may create a new market niche for a value-added food product.

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

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	I
LISTA DE TABELAS.....	III
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IV
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Produção e consumo de soja	3
2.2. Classificação botânica e estrutura da soja	8
2.3. Macronutrientes da soja.....	9
2.4. Micronutrientes da soja.....	15
2.5. Fatores antinutricionais.....	18
2.6. Compostos bioativos.....	20
2.6.1. Compostos fenólicos e atividade antioxidante	21
2.6.1.1. Flavonóides	26
2.6.1.1.1. Antocianinas	29
2.6.1.1.2. Isoflavonas	34
2.6.1.2. Não-flavonóides	36
2.7. Soja preta e sua relação com a saúde	39
3. OBJETIVOS.....	41
3.1. Geral	41
3.2. Específicos.....	41
4. MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1. Reagentes.....	42
4.2. Amostras de soja	42
4.3. Características físicas.....	43
4.3.1. Massa de 100 grãos	43
4.3.2. Dimensões do grão	43
4.3.3. Capacidade de hidratação.....	43
4.3.4. Tempo de cozimento	44
4.4. Análise de composição centesimal.....	44
4.4.1. Preparo das amostras de soja.....	44

4.4.2.	Determinação de umidade	45
4.4.3.	Determinação de resíduo mineral	45
4.4.4.	Determinação de proteínas	45
4.4.5.	Determinação de lipídeos.....	46
4.4.6.	Determinação de fibra total (solúvel e insolúvel).....	47
4.4.7.	Teor de carboidratos por diferença	47
4.5.	Determinação de ácidos graxos	47
4.6.	Análise de compostos fenólicos	48
4.6.1.	Cozimento das amostras.....	48
4.6.2.	Preparo das amostras	49
4.6.3.	Extração de compostos fenólicos totais e antocianinas monoméricas totais.....	49
4.6.4.	Quantificação de compostos fenólicos totais (CFT)	49
4.6.5.	Quantificação de flavonóides	50
4.6.6.	Quantificação de antocianinas monoméricas totais (AMT)	50
4.7.	Análise qualitativa das antocianinas por HPLC–DAD–MS/MS.....	51
4.7.1.	Preparo do extrato.....	51
4.7.2.	Separação e identificação por HPLC-DAD-MS/MS.....	52
4.8.	Atividade antioxidante.....	53
4.8.1.	Método de sequestro do radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH').....	53
4.8.2.	Método ORAC (<i>oxygen radical absorbance capacity</i>).....	54
4.9.	Análise estatística	54
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
5.1.	Características físicas.....	56
5.2.	Composição centesimal.....	60
5.3.	Análise de ácidos graxos.....	67
5.4.	Análise de compostos fenólicos	72
5.4.1.	Comparação de solventes e de metodologias para a extração de compostos fenólicos.....	72
5.4.2.	Determinação de teor de compostos fenólicos totais (CFT)	75
5.4.3.	Determinação de teor de flavonóides.....	78
5.4.4.	Determinação de teor de antocianinas monoméricas totais (AMT).....	80
5.5.	Separação e identificação das antocianinas e das isoflavonas por HPLC-DAD-MS/MS.....	82

5.6.	Atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH [•]) e pelo método de <i>oxygen radical absorbance capacity</i> (ORAC).	91
5.7.	Correlação entre compostos fenólicos totais e atividade antioxidante	93
6.	CONCLUSÕES.....	95
7.	REFERÊNCIAS	96

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Soja preta e amarela.....	1
Figura 2. Evolução do plantio de soja no mundo.	3
Figura 3. Produção de soja no mundo em 2011.	5
Figura 4. Evolução da percepção do consumidor quanto à identificação da soja como um alimento saudável, de 1998 a 2011.	6
Figura 5. Vendas de produtos à base de soja de 2000 a 2010 nos EUA.	7
Figura 6. Estrutura básica de grão de soja.	9
Figura 7. Isômeros de tocoferol.....	16
Figura 8. Estruturas químicas de flavonóides.	27
Figura 9. Sítios possíveis para a complexação de flavonóides com o íon Al^{3+}	29
Figura 10. Estrutura básica das antocianidinas mais comuns.	30
Figura 11. Estruturas moleculares encontradas em solução aquosa com diferentes valores de pH.	31
Figura 12. Estrutura de um estrógeno (estradiol) e uma isoflavona (genisteína).	36
Figura 13. Exemplo de estilbeno e lignana.	37
Figura 14. Exemplo de tanino e proantocianidina.	37
Figura 15. Ácidos hidroxicinâmicos encontrados com maior frequência.	38
Figura 16. Dimensões e volume do grão de soja (n = 10, por genótipo).	57
Figura 17. Composição centesimal de soja, em base seca.	66
Figura 18. Perfil de ácidos graxos majoritários na soja, por coloração de tegumento.	71
Figura 19. Espectro de absorção de antocianinas monoméricas totais, variando o número de extrações sucessivas e o volume do meio extrator.	74
Figura 20. Cromatograma, obtido por HPLC-DAD, das antocianinas de soja preta crua NT 7001 (I) e NT 7002 (II) e de soja preta cozida NT 7001 (III) e NT 7002 (IV). Picos identificados de acordo com a Tabela 12.....	83
Figura 21. Espectro de massas de cianidina-3-O-glicosídeo.....	84
Figura 22. Espectro de massas da isoflavona daidzina.	85

Figura 23. Espectro de massas das isoflavonas glicitina (I) e genistina (II).....	87
Figura 24. Espectro de massas de daidzeína (I), gliciteína (II) e genisteína (III).	88
Figura 25. Espectro de massas de malonil-daidzina (I), malonil-glicitina (II), e malonil-genistina (III).....	89
Figura 26. Espectro de massas de acetil-daidzina.....	90
Figura 27. Espectro de massas da acetil-glicitina.	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características dos genótipos de soja.	43
Tabela 2. Massa de 100 grãos.	56
Tabela 3. Capacidade de hidratação.	58
Tabela 4. Teores de umidade, resíduo mineral e proteínas.	60
Tabela 5. Teores de lipídeos, em base seca.	63
Tabela 6. Teores de fibra, em base seca.	64
Tabela 7. Comparação da composição centesimal de soja, em base seca.	67
Tabela 8. Perfil de ácidos graxos na soja.	70
Tabela 9. Teor de compostos fenólicos totais, em base seca.	75
Tabela 10. Teor de flavonóides totais, em base seca.	78
Tabela 11. Teor de antocianinas monoméricas totais, em base seca.	80
Tabela 12. Características cromatográficas e espectroscópicas, obtidas por HPLC-DAD-MS/MS, das antocianinas de soja preta crua e cozida.	84
Tabela 13. Características cromatográficas e espectroscópicas das isoflavonas, obtidas por HPLC-DAD-MS/MS, de soja preta e amarela, crua e cozida.	86
Tabela 14. Atividade antioxidante dos extratos de compostos fenólicos.	91
Tabela 15. Correlação pelo teste de Spearman ($p < 0,05$) entre os compostos fenólicos e a atividade antioxidante.	94

LISTA DE ABREVIATURAS

IAC	Instituto Agronômico de Campinas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
ORAC	<i>oxygen radical absorbance capacity</i>
TRAP	<i>total radical trapping antioxidant parameter</i>
HOSC	<i>hydroxyl radical scavenging capacity</i>
DPPH [·]	1,1-difenil-2-picril-hidrazil
FRAP	<i>ferric ion reducing antioxidant power</i>
ABTS ^{·+}	2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico
TEAC	<i>Trolox equivalence antioxidant capacity</i>
CFT	compostos fenólicos totais
eq.	equivalentes
mg EAG/g	mg equivalentes de ácido gálico/g
mg EC/g	mg equivalentes de (+)-catequina/g
AMT	antocianinas monoméricas totais
mg CyE/g	mg equivalentes de cianidina-3-O-glicosídeo/g
b.s.	base seca
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
DAD	<i>diode array detection</i>
ESI	<i>electro spray ionization</i>
MS	<i>mass spectrometry</i>
RMN	ressonância magnética nuclear

1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) apresenta grande importância econômica mundial e, com sua crescente produção no Brasil desde 1950, tornou-se uma das *commodities* agrícolas mais importantes no país (EMBRAPA, 2012). A soja é adaptável a uma grande variedade de solos e climas o que torna o seu plantio extenso principalmente nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil.

Há numerosas pesquisas em que se avaliam a composição e as substâncias bioativas presentes em soja com casca amarela. No entanto, apenas recentemente houve um aumento dos estudos com soja de outra cor que não amarela. Os grãos de soja também podem ser encontrados com casca verde, marrom ou preta.

Apesar de a soja preta estar ganhando destaque em algumas feiras internacionais, ela ainda é pouco comercializada no Brasil e pode ser encontrada em lojas especializadas.

O diferencial mais conhecido da soja preta em relação à amarela (**Figura 1**) é a presença de antocianinas, que é frequentemente utilizado como *marketing* devido à atividade antioxidante desses compostos. Alguns autores (KIM *et al.*, 2006a; JIN-RUI *et al.*, 2007; XU & CHANG, 2007a, b; XU & CHANG, 2008a, b; KUMAR *et al.*, 2010; WHENT *et al.*, 2011; MALENCIC *et al.*, 2012) encontraram, de fato, maior teor de fenólicos e maior capacidade de seqüestrar radicais livres em soja preta crua do que em soja amarela, verde e marrom.

Figura 1. Soja preta e amarela.

A soja contém diversos compostos bioativos, como compostos fenólicos, fitoesteróis e peptídeos que possivelmente auxiliam na prevenção de doenças cardiovasculares, diabetes, perda óssea e câncer, além de contribuir para a redução de colesterol. Os compostos fenólicos têm recebido muita atenção por parte da comunidade científica, principalmente devido as suas propriedades antioxidantes e outras potenciais funções biológicas no organismo humano (NACZK & SHAHIDI, 2004).

Dentre os fitoquímicos presentes na soja, também há fatores antinutricionais, tais como inibidores de tripsina, lectinas e fitatos que devem ser inativados antes do consumo por humanos. Por isso, interessa avaliar qual é o conteúdo de compostos bioativos e atividade antioxidante que se mantém após o cozimento da soja. Na literatura, foram encontrados apenas dois artigos em que os fenólicos e sua capacidade antioxidante são avaliados antes e após o cozimento da soja preta (FURUTA *et al.*, 2003; XU & CHANG, 2008c).

De modo geral, são escassas as publicações científicas sobre soja preta, sendo que a maioria dos artigos é proveniente de países do Oriente e alguns trabalhos são desenvolvidos em colaboração com pesquisadores dos Estados Unidos. Não foram encontrados trabalhos específicos sobre soja preta desenvolvida no Brasil.

O objetivo deste trabalho foi avaliar as diferenças das características físicas, de composição química, incluindo os compostos fenólicos, e da atividade antioxidante da soja preta e amarela, crua e cozida, cultivadas em condições climáticas e ambientais similares.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Produção e consumo de soja

Atualmente, a soja amarela (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma das três principais *commodities* do mundo. Apesar de ser conhecida e explorada há mais de cinco mil anos no Oriente, seu cultivo no Ocidente se iniciou nos Estados Unidos (EUA) apenas no século XX. A partir da década de 1960 a produção de soja passou a crescer exponencialmente também no Brasil e Argentina (**Figura 2**) (EMBRAPA, 2012).

Fonte: adaptada de USDA, 2011.

Figura 2. Evolução do plantio de soja no mundo.

No Brasil, a soja foi cultivada pela primeira vez em 1882 na Escola Agrícola da Bahia com sementes provenientes dos EUA. Cinco anos depois foi fundado o Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) onde, em 1891, foram realizados testes de adaptação de cultivares. Nessa época, a soja era estudada como cultura

forrageira e não como planta produtora de grãos para farelo e óleo vegetal (EMBRAPA, 2012, SHURTLEFF & AOYAGI, 2009).

Em 1900, o IAC promoveu a primeira distribuição de sementes de soja para produtores paulistas, entregando 28 kg de sementes de soja amarela e 18 kg de sementes de soja preta. No entanto, os agricultores passaram a dar preferência ao cultivo da soja amarela, alegando que a soja preta possuía menor conteúdo de óleo e resultava em farelo de coloração indesejada. Por isso, a soja preta era utilizada primordialmente como ração animal, até que a sua produção foi descontinuada (SHURTLEFF & AOYAGI, 2009). Não há muitos outros registros sobre a disseminação, melhoramento e produção de soja preta no Brasil nem no mundo, tampouco do número de variedades dessa planta.

Contudo, o plantio de soja amarela foi se disseminando no país e fatores como clima, topografia, condições do solo, melhoramento genético e até incentivos fiscais foram decisivos para a ampliação das áreas de cultivo (EMBRAPA, 2012).

O Brasil apareceu pela primeira vez nas estatísticas internacionais como país produtor de soja em 1949, com a produção de 25.000 toneladas. Em meados dos anos 50, o governo brasileiro estabeleceu um programa de incentivo à triticultura. A soja foi considerada a melhor alternativa para suceder o trigo cultivado no inverno, pois a sua capacidade de fixar nitrogênio contribui para a manutenção do solo, além de favorecer o melhor aproveitamento de máquinas, infraestrutura e mão de obra (EMBRAPA, 2012).

Na década de 1960, com a política de subsídio de trigo, a produção de soja passou de 206 mil para um milhão de toneladas, estabelecendo-se como cultura economicamente importante para o Brasil. Esse crescimento continuou sendo expressivo até 1980 no sul do país, e, posteriormente, na região central durante os anos 80 e 90 (EMBRAPA, 2012).

Atualmente, o Brasil é o segundo maior produtor de soja, responsável por mais de 25% da produção mundial. Na safra de 2010/2011, os principais países produtores de soja, EUA, Brasil e Argentina, produziram 90, 70 e 50 milhões de

toneladas, respectivamente, representando conjuntamente mais de 80% da produção mundial (**Figura 3**) (AMERICAN SOYBEAN ASSOCIATION, 2012).

Fonte: adaptado de AMERICAN SOYBEAN ASSOCIATION, 2012.

Figura 3. Produção de soja no mundo em 2011.

Em nível mundial, o Brasil também está na vice-liderança de exportação de soja, superado pelos EUA na exportação de grãos e pela Argentina na exportação de derivados. Com a safra de 2010/2011 o Brasil atingiu a exportação de 32,5 milhões de toneladas de grãos e 13,9 milhões de toneladas de derivados. Os principais países compradores de soja em grãos são China, Países Baixos, Alemanha, Espanha, Tailândia, Itália, Portugal e Japão (AMERICAN SOYBEAN ASSOCIATION, 2012; CONAB, 2012).

A maior parte da produção de soja amarela é processada em óleo, proteína e farelo. Os avanços nos processos de refinação e pós-refinação aumentaram a demanda por óleo de soja. Tanto o óleo como a proteína são amplamente utilizados como ingredientes nos mais diversos produtos, incluindo margarinas, maioneses, molhos, substitutos cárneos, barras de cereais, entre outros. O uso de farelo de soja para rações de animais cresceu após o aparecimento da *Bovine Spongiform Encephalopathy* (BSE) e consequente redução do uso de proteína animal em rações de ruminantes (SINNECKER, 2002).

O consumo de grãos de soja e seus derivados são tradicionais para a população oriental, enquanto no Ocidente, devido ao sabor característico, esses

produtos ainda estão conquistando espaço no mercado (MESSINA, 2010). A partir de meados da década de 1990, observou-se no ocidente um aumento significativo no consumo de desses produtos. Apenas nos EUA, de 1996 a 2010, as vendas de produtos de soja aumentaram de um bilhão de dólares para 4,9 bilhões (SOYFOODS, 2012). Esse crescimento é devido aos novos produtos à base de soja, o reposicionamento desses produtos no mercado e a busca do consumidor por alimentos saudáveis. De forma geral, pode-se observar que a percepção do consumidor em relação à soja ser um alimento saudável segue uma tendência positiva nos últimos 14 anos (**Figura 4**).

Fonte: SOYFOODS, 2012

Figura 4. Evolução da percepção do consumidor quanto à identificação da soja como um alimento saudável, de 1998 a 2011.

Ao longo do século XX, já haviam sido feitas algumas tentativas bem sucedidas para introduzir produtos à base de soja no mercado evitando a palavra “soja” e dando origem a nomenclatura de “óleo vegetal” ao invés de “óleo de soja” e “hambúrguer vegetariano” ao invés de “hambúrguer de soja”, uma vez que o consumidor associava a soja com *flavor* desagradável (LIU, 2004b; SHURTLEFF & AOYAGI, 2009).

Atualmente, há uma oferta cada vez maior de produtos à base de soja, como queijos, bebidas, iogurtes, sorvetes, missô e tofu. Leite de soja é amplamente consumido por indivíduos com intolerância à lactose. As proteínas de soja também são utilizadas em alimentos numa variedade de formas, incluindo fórmulas infantis, farinhas, isolados e concentrados proteicos e proteínas texturizadas, na forma de substitutos de carne, embutidos, etc. Mais da metade da população dos EUA dizem se interessar em consumir produtos cárneos que tenham metade da proteína animal substituída por proteína de soja (SOYFOODS, 2012).

Além disso, é expressivo o aumento de vendas desses produtos (**Figura 5**) nos EUA, após a aprovação do *claim* de benefício à saúde da *Food and Drug Administration* (FDA) em 1999. Posteriormente, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Brasil, integrou o gérmen e a lecitina de soja à lista de alimentos novos (ANVISA, 2011).

Fonte: adaptado de SOYFOODS, 2012

Figura 5. Vendas de produtos à base de soja de 2000 a 2010 nos EUA.

A soja preta também é extensamente utilizada no Oriente há séculos, tanto como alimento saudável, como para tratamentos medicinais. Na medicina

chinesa, pensava-se que a soja preta era capaz de curar doenças, além de possuir propriedade antienvelhecimento. Seus efeitos benéficos aparecem registrados em Ben-Cao-Gang-Mu, uma antiga enciclopédia botânica escrita no início do século XVI, descrevendo a soja preta como capaz de “aumentar a circulação sanguínea e a passagem de água, agindo contra efeitos tóxicos, aliviando doenças do rim e até mesmo tendo efeitos contra o envelhecimento” (XU & CHANG, 2008b).

Atualmente, no Brasil, encontra-se apenas uma marca nacional de soja preta comercializada pela SóSoja®, empresa sediada em Caldas Novas (GO). Algumas lojas especializadas comercializam soja preta importada, principalmente da China e Coréia do Sul.

2.2. Classificação botânica e estrutura da soja

A soja pertence à família *Fabaceae* e ao gênero *Glycine*, que compreende cerca de quinze espécies, sendo a comercial a *Glycine max* (L.) Merrill. A maior parte dos grãos é amarela, mas podem ser encontrados nas cores verde, marrom ou preto e seu formato varia de esférico a oval (LIU, 2004a). Há outra espécie de soja, *Glycine soja*, que é pouco explorada comercialmente, pois é uma soja selvagem que possui tegumento preto ou marrom. Em geral, essa espécie contém níveis mais elevados de proantocianidinas, antocianinas e isoflavonas do que a *Glycine max* (YANG *et al.*, 2010).

Em Taiwan, cultiva-se duas variedades de soja preta (*Glycine max*), uma com cotilédone verde e outra com cotilédone amarela. Tradicionalmente, a soja preta com cotilédone verde também é cultivada na China, na península da Coréia e no Japão, sendo utilizado para fins medicinais, na fabricação de licor ou como alimento saudável. Já a soja preta de cotilédone amarela, é mais comum e é utilizada como matéria prima no processamento de alimentos, como na fabricação de tofu (SHIH *et al.*, 2002).

A soja possui, em base seca, aproximadamente 40% de proteínas, 20% de óleo, 35% de carboidratos e 5% de minerais. Portanto, essa leguminosa contém

o maior teor de proteína e segundo maior teor de óleo dentre todos os cereais e sementes de leguminosas. Considera-se que o plantio de soja produz mais proteína comestível por hectare, do que qualquer outra cultivar conhecida (LIU, 2004a).

A casca ou tegumento da soja (**Figura 6**) representa apenas 8% da massa total do grão e contém 86% dos carboidratos insolúveis, componentes estruturais das paredes celulares (LIU, 2004a). As proteínas e lipídeos estão contidos principalmente nos cotilédones e armazenados em grânulos de aleurona e organelas, respectivamente (CHAJUSS, 2004). O gérmen representa apenas 1% da massa total da semente (XU & CHANG, 2008a).

Fonte: adaptado de VANCLEAVE, 2012

Figura 6. Estrutura básica de grão de soja.

2.3. Macronutrientes da soja

A composição química depende basicamente das características genéticas e das condições climáticas e regionais (KARR-LILIENTHAL *et al.*, 2004; ÁVILA *et al.*, 2007; MERTZ *et al.*, 2009; BARION *et al.*, 2010; FERREIRA & RAO, 2010; STOLF-MOREIRA *et al.*, 2010)

O estresse hídrico por escassez, por exemplo, pode resultar em redução de 16% no teor de proteínas e de 25% de óleo da soja. Altas temperaturas no campo, acima de 26 °C, também podem reduzir o teor proteico e lipídico dos grãos em 9% e 15%, respectivamente (ROTUNDO & WESTGATE, 2009). É interessante notar que nesses dois casos ocorre um aumento da razão proteína:óleo, devido a uma menor síntese de óleo.

Por outro lado, a adubação nitrogenada é capaz de elevar a concentração proteica. Esse fenômeno foi observado em culturas *in vitro* e em plantações hidropônicas, que apresentaram um aumento de 60% e de 27%, respectivamente. Já em plantações no campo, essa resposta foi menos expressiva, correspondendo apenas a um aumento de 8% (ROTUNDO & WESTGATE, 2009).

A soja tem como principais proteínas de reserva, a glicinina e a β -conglucina, também conhecidas como proteínas 11S e 7S, respectivamente. Do total de proteínas presentes na soja aproximadamente 40% corresponde à glicinina e 27% à β -conglucina (VAN EE, 2009). A glicinina é isenta de carboidratos, enquanto a conglucina é uma glicoproteína contendo aproximadamente 4% de carboidratos, principalmente manose (ISANGA & ZHANG, 2008). A β -conglucina é constituída de subunidades α' , α e β , com pesos moleculares de 70, 68 e 52 kDa, respectivamente, e a glicinina possui duas subunidades de 35 kDa e 28 kDa (VAN EE, 2009). Devido às diferenças na composição e estrutura, as globulinas 7S e 11S exibem distintas características nutricionais e funcionais (CHAJUSS, 2004).

Por sua vez, as proteínas biologicamente ativas, como enzimas, lectinas e inibidores de tripsina, da β -amilase e de proteases podem ser glicosiladas e/ou fosforiladas (ISANGA & ZHANG, 2008). Essas proteínas causam efeitos adversos no caso da soja ser consumida crua. Portanto, o processamento térmico é fundamental, melhorando a digestibilidade da soja e destruindo grande parte dos fatores antinutricionais. Contudo, é possível que esse processamento provoque também a formação de aminoácidos não utilizáveis pelo organismo humano, como a frutossilisina, lisinoalanina e D-aminoácidos (FRIEDMAN & BRANDON, 2001).

A composição de aminoácidos da soja pode variar de acordo com as condições climáticas durante o plantio. Fatores como temperatura, radiação solar e

precipitação podem provocar uma variação de até 6% nos aminoácidos essenciais e 12% nos não essenciais. Além disso, as características ambientais afetam cada aminoácido de forma diferente e os teores de aminoácidos essenciais não apresentam necessariamente relação direta ao conteúdo proteico (CARRERA *et al.*, 2011a).

A proteína de soja tem uma composição de aminoácidos bem balanceada, apenas limitada por aminoácidos sulfurados, como a metionina que varia entre 0,3 e 0,8 % (CARRERA *et al.*, 2011a). Porém, da mesma maneira que o feijão, essa deficiência pode ser facilmente suprida com a ingestão concomitante de cereais, como arroz, por exemplo, que possuem quantidades adequadas de metionina (FRIEDMAN & BRANDON, 2001).

O conteúdo de lisina da soja é intermediário entre cereais e proteínas da carne, variando entre 2,1 e 3,2 %. Apesar do conteúdo de lisina ser suficiente para sustentar o crescimento e desenvolvimento normal de mamíferos, inclusive seres humanos, há pesquisas buscando desenvolver variedades de soja com maior teor de lisina, principalmente devido à perda desse aminoácido durante o processamento e estocagem (FRIEDMAN & BRANDON, 2001).

Em geral, as proteínas de origem vegetal possuem uma menor qualidade nutricional do que aquelas de origem animal, devido à deficiência em um ou mais aminoácidos essenciais (CHAJUSS, 2004). Contudo, em comparação com a proteína animal, o consumo de proteína de soja apresenta a vantagem de diminuir a excreção de cálcio, o que não compromete a função renal e pode auxiliar na redução do risco de osteoporose, considerando que poucas mulheres atingem o requerimento mínimo de cálcio na dieta diária (LIU, 2004a).

Em 1999, a *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA aprovou o *claim* de que “25 gramas de proteína de soja por dia, como parte de uma dieta com reduzida ingestão de gordura saturada e colesterol, pode reduzir o risco de doenças cardiovasculares” (FDA, 2011). Esta alegação é apoiada pelo *American Heart Association* (SAMUEL *et al.*, 2008) e, em 2002, foi aprovada pela ANVISA (ANVISA, 2011).

Nos anos seguintes, alguns pesquisadores sugeriram que poderia não ser apenas a proteína de soja que contribuía para a redução de colesterol, pois há diversos outros componentes fisiologicamente ativos, como isoflavonas, saponinas, ácido fítico e fibras que podem atuar propiciando esse benefício (SACKS *et al.*, 2006; LIU, 2004a). Devido à falta de comprovação dos efeitos da proteína de soja na prevenção de doenças cardiovasculares, a FDA divulgou, em 2007, que revisaria as evidências que apóiam esse *claim* (FDA, 2007). No entanto, ainda não se chegou a uma conclusão.

Os lipídeos contidos na soja estão principalmente na forma de triglicerídeos. Esses lipídeos podem ser extraídos com solventes orgânicos, como hexano, resultando no óleo bruto, que além dos triglicerídeos, contém compostos minoritários como fosfolipídeos, tocoferóis, fitoesteróis, hidrocarbonetos, ácidos graxos livres e, eventualmente, clorofila. O teor destes compostos minoritários é reduzido após o refino, resultando em óleo com mais de 99% de triglicerídeos (LIU, 2004a).

O óleo de soja é considerado um óleo saudável, pois é pobre em ácidos graxos saturados (~15% total) e rico em insaturados (~85% total). A composição e a proporção de ácidos graxos variam principalmente devido ao melhoramento genético, mas uma composição básica consiste em 11% de ácido palmítico (C16:0), 4% de ácido esteárico (C18:0), 24% de ácido oleico (C18:1), 53% de ácido linoleico (C18:2) e 7% de ácido linolênico (C18:3), sendo estes dois últimos ácidos graxos essenciais (LIU, 2004a). Os teores de ácidos graxos em soja com casca amarela, verde, marrom e preta variam, principalmente quanto aos ácidos palmítico, oléico e α -linolênico (SLAVIN *et al.*, 2009b).

Os ácidos linoleico e α -linolênico são considerados ácidos graxos essenciais, os quais não são gerados pelo organismo, mas são necessários para o seu funcionamento. Esses ácidos podem ser precursores de outros ácidos graxos essenciais como o ácido araquidônico e o ácido docosahexaenóico. Alguns ácidos graxos essenciais, como os ácidos araquidônico e linolênico, também são precursores de eicosanóides, como prostaglandinas, leucotrienos, prostaciclina e

tromboxanos, que estão envolvidos em processos inflamatórios (ANDRADE & CARMO, 2006).

Dentre os óleos vegetais comestíveis, o óleo de soja, de canola e de linhaça são os únicos que contêm quantidade significativa de ácido α -linolênico. Há estudos que correlacionam o alto teor desse ácido graxo com um efeito neuroprotetor (NGUEMENI *et al.*, 2010) e a menor prevalência de resistência a insulina (MURAMATSU *et al.*, 2010).

Além disso, numa recente revisão foi verificado que em 16 pesquisas científicas apenas 50% concluem a existência de efeitos benéficos do ácido linolênico sobre fatores de risco de doenças cardiovasculares (GELEIJNSE *et al.*, 2010). A partir de uma meta-análise, foi concluído que pode haver uma pequena associação protetora entre uma elevada ingestão de ácido linolênico e o risco de câncer de próstata, porém os autores indicam que ainda são necessários mais estudos a longo prazo para definir mais precisamente a quantidade de ingestão necessária para que haja esse efeito (CARAYOL *et al.*, 2010).

A soja contém até 35% de carboidratos, em base seca, sendo a maior parte composta por fibra alimentar e com baixo teor de amido (LIU, 2004a; CHOI & RHEE, 2006). Sendo assim, a soja se torna uma excelente opção para pessoas com dieta com baixo teor de carboidratos.

Os carboidratos insolúveis incluem a hemicelulose e a celulose, as quais atuam basicamente como componentes estruturais das paredes celulares. Seibel e Beléia (2008) encontraram dentre as fibras alimentares da soja 59% de hemicelulose e apenas 8,5% de celulose.

A hemicelulose corresponde a um grupo heterogêneo de polissacarídeos ramificados que formam uma rede complexa através de ligações de hidrogênio entre si e com celulose. A celulose é constituída exclusivamente de glicose que forma cadeias por ligações β 1-4 e por ligações de hidrogênio entre as cadeias (SEIBEL & BELÉIA, 2008). O alto grau de polimerização produz áreas de cristalinidade. Essas estruturas são resistentes à digestão no trato gastrointestinal humano e importantes

para respostas fisiológicas como regulação do trânsito intestinal e prevenção de algumas doenças, incluindo câncer (LIU, 2004a; CHOI & RHEE, 2006).

A pectina, carboidrato solúvel, é um polissacarídeo ramificado constituído principalmente de polímeros de ácido galacturônico, ramnose, arabinose e galactose, que se ligam covalentemente a compostos fenólicos, proteínas e celulose nas paredes celulares. Seibel e Beléia (2008) encontraram 14% de pectina dentre as fibras alimentares da soja, com 17 mg/g de ácido galacturônico complexados com os cátions Ca^{+2} e Mg^{+2} . Quanto à composição de monossacarídeos ligados a pectina, foram identificadas galactose, glicose, arabinose e ramnose.

Rafinose e estaquiose são oligossacarídeos solúveis e não redutores presentes na soja. Dentre os carboidratos da soja há entre 0,1 e 0,9% de rafinose e de 1,4 a 4,1% de estaquiose, em base seca. Esses oligossacarídeos contêm três ou quatro unidades de frutose, glucose e galactose com ligações β -frutósídica e α -galactosídica (LIU, 2004a).

Como o ser humano não possui a enzima α -galactosidase, esses oligossacarídeos não são digeridos no intestino delgado. Esses açúcares são metabolizados, apenas no intestino grosso, por microrganismos que possuem a enzima necessária para hidrolisar a ligação α -galactosídica, produzindo dióxido de carbono, hidrogênio, nitrogênio e metano, dependendo da dieta e microflora do indivíduo. Por isso, o consumo de soja algumas vezes pode ser relacionado com um desconforto abdominal e flatulência (LIU, 2004a).

Ainda que a presença dos oligossacarídeos seja considerada indesejável devido ao desconforto intestinal, estudos recentes indicam que seu consumo pode trazer benefícios, como o aumento da população de bifidobactérias no cólon em detrimento da atividade de bactérias de decomposição. Consequentemente ocorreria à redução de metabólitos tóxicos, protegendo, assim, a função hepática. Além disso, podem auxiliar na prevenção de constipação, devido à produção de altos níveis de ácidos graxos de cadeia curta pelas bactérias probióticas, reduzindo o risco de câncer de cólon (LIU, 2004a; JACOBS *et al.*, 2006).

Entretanto, o alto teor de oligossacarídeos presente na soja pode ser reduzido através da imersão dos grãos em água. Produtos de soja fermentados, como missô, produzem menos desconforto gastrointestinal, devido à metabolização dos açúcares pelas leveduras. Outros processamentos que envolvem a precipitação de proteínas, como é o caso da produção de tofu e de proteína isolada de soja, também reduzem os oligossacarídeos (CHOI & RHEE, 2006).

Não foram encontradas na literatura informações sobre macronutrientes específicas para soja preta. Como a soja preta e amarela pertencem à espécie *Glycine max* é possível que em termos qualitativos não haja diferenças expressivas entre elas.

2.4. Micronutrientes da soja

A soja contém vitaminas hidrossolúveis, como tiamina, riboflavina, niacina, ácido pantotênico e ácido fólico, assim como as vitaminas A e E, que são lipossolúveis. As vitaminas hidrossolúveis não são perdidas durante a extração de óleo nem na produção de farinha de soja, porém a perda é significativa quando a soja é submetida à hidratação (LIU, 2004a) ou à irradiação gama (DIXIT *et al.*, 2011). O teor de vitamina C em soja preta é significativamente maior ao teor encontrado em soja amarela (KUMAR *et al.*, 2010), inclusive após o cozimento (MORIYAMA & OBA, 2008).

O óleo de soja é considerado uma boa fonte de vitamina E, assim como os óleos de milho, amendoim e oliva, com um teor de aproximadamente 0,1 mg/g. A vitamina E é constituída por tocoferóis, incluindo seus isômeros α -, β -, γ - e δ - tocoferol (**Figura 7**), e tocotrienóis, estes últimos, presentes em quantidades desprezíveis (KUMAR *et al.*, 2009).

Isômero	R ₁	R ₂	R ₃
Alfa	-CH ₃	-CH ₃	-CH ₃
Beta	-CH ₃	-H	-CH ₃
Gama	-H	-CH ₃	-CH ₃
Delta	-H	-H	-CH ₃

Fonte: adaptado de BOSCHIN & ARNOLDI, 2011

Figura 7. Isômeros de tocoferol.

No grão de soja maduro predomina o γ -tocoferol com teores variando entre 50 e 160 $\mu\text{g/g}$ para soja amarela (SEGUIN *et al.*, 2010; BOSCHIN & ARNOLDI, 2011) e de 249 a 405 $\mu\text{g/g}$ para soja preta (CORREA *et al.*, 2010). Já as quantidades de β -tocoferol são praticamente insignificantes, representado no máximo até 0,1 $\mu\text{g/g}$ do total de tocoferóis (LIU, 2004a). O α -tocoferol presente na soja amarela varia de 7 a 28 $\mu\text{g/g}$, enquanto o teor de δ -tocoferol entre 42 e 140 $\mu\text{g/g}$ (SEGUIN *et al.*, 2010; BOSCHIN & ARNOLDI, 2011).

Já no grão imaturo o δ -tocoferol é a forma predominante de tocoferóis, correspondendo a 70% dos tocoferóis no início da fase reprodutiva que é reduzida para 53% ao final da maturação do grão (KUMAR *et al.*, 2009). As variedades de soja com diferentes perfis lipídicos, como baixo teor de α -linolênico, não apresentam diferenças significativas nos teores de tocoferóis totais em comparação com o genótipo convencional (SLAVIN *et al.*, 2009a; WHENT *et al.*, 2010).

As condições de cultivo da soja também influenciam os teores dos tocoferóis, especialmente do α -tocoferol (SEGUIN *et al.*, 2010; CARRERA *et al.*,

2011b). Um estudo indicou que o cultivo em temperaturas mais elevadas (33°C/25°C; temperatura de dia/noite) tende a aumentar a quantidade de α -tocoferol e reduzir δ -tocoferol e γ -tocoferol em soja (CHENNUPATI *et al.*, 2011). Em outro estudo que avaliava a estabilidade do γ -tocoferol de soja preta em diferentes condições de armazenamento foi verificado que esse composto se degradava significativamente dentro de um mês a temperatura ambiente, mas se mantinha estável por 6 meses a 4 °C e por 14 meses a -80 °C (CORREA *et al.*, 2010).

A vitamina E, por ser lipossolúvel, é extraída juntamente com o óleo durante a extração com solvente. Na produção do óleo refinado, os tocoferóis são retirados durante a etapa de desodorização e posteriormente adicionados, pois exercem um papel importante como antioxidante (LIU, 2004a).

Durante o processamento da soja também são extraídos os minerais, que permanecem no extrato proteico e não no óleo. Aproximadamente 5% do grão são resíduo mineral, sendo que o potássio é o componente predominante, seguido de fósforo, magnésio, enxofre, cálcio, cloreto e sódio. Há outros minerais minoritários, como silício, ferro, zinco, manganês e cobre que estão na faixa de 0,01 a 140 ppm (KARR-LILIENTHAL *et al.*, 2004; LIU, 2004a).

Assim como para os macronutrientes, as condições ambientais interferem significativamente nas concentrações dos minerais presentes na soja, principalmente devido à variação do conteúdo mineral disponível no solo de cada região (KARR-LILIENTHAL *et al.*, 2004).

Por outro lado, cultivares de soja com alto conteúdo proteico apresentaram uma quantidade de minerais significativamente maior que soja com menos proteína (PAUCAR-MENACHO *et al.*, 2010). Já a transgenicidade não interferiu na composição nem nos teores de minerais da soja (KAMIZAKE *et al.*, 2006).

Quanto à biodisponibilidade dos minerais da soja, a absorção de ferro é comprometida pelo ácido fítico, que quelar minerais, especialmente cátions divalentes, reduzindo a sua absorção. Porém, o ácido fítico pode ser ao menos parcialmente eliminado por meio de fermentação ou imersão da soja em água. A

presença de vitamina C ou outros ácidos orgânicos podem prevenir a formação de complexos de ferro-fitato, mantendo o ferro em sua forma reduzida, que aumenta sua solubilidade e absorção (CHOI & RHEE, 2006).

Alguns produtos à base de soja, como o extrato proteico normalmente denominado leite de soja, são frequentemente fortificados com cálcio. Tofu, por exemplo, se torna uma boa fonte de cálcio se for produzido utilizando sal de cálcio como agente precipitante. Ainda que haja a presença de oxalato e ácido fítico, fortes inibidores de absorção de cálcio, a biodisponibilidade desse mineral em alimentos de soja é boa e até melhor que outras leguminosas (CHOI & RHEE, 2006).

2.5. Fatores antinutricionais

A soja contém alguns fatores antinutricionais que podem provocar efeitos fisiológicos adversos ou diminuir a biodisponibilidade de nutrientes. Dentre os fatores antinutricionais estão os termolábeis, como inibidores de proteases, lectinas e fitatos, e os termoestáveis, como saponinas (LIENER, 1994).

Os principais inibidores de proteases da soja são os de Bowman-Birk e Kunitz. O inibidor de Bowman-Birk é mais estável a processamento térmico do que o Kunitz e tem especificidade de inibir não apenas a tripsina, como também a quimotripsina (SILVA & SILVA, 2000). Os inibidores de tripsina interferem com o processo de digestão e são responsáveis pela resposta hipertrófica do pâncreas e por 30-50% do efeito de inibição de crescimento em animais alimentados com soja crua (ISANG & ZHANG, 2008). Embora esses inibidores sejam classificados como termolábeis, um cozimento rápido pode não ser suficiente para a sua desativação completa, ocasionando a digestão e absorção incompleta de aminoácidos (SILVA & SILVA, 2000).

As lectinas ou aglutininas são proteínas capazes de se ligarem a moléculas de carboidratos, como glicoproteínas, produzindo a redução da digestibilidade de proteínas e açúcares (ISANGA & ZHANG, 2008). Esses compostos interferem na absorção de nutrientes no intestino delgado (LIENER,

1994), afetam a função pancreática (GRANT *et al.*, 1987) e reduzem em até 25% o crescimento de animais monogástricos (VAN DAMME ELS *et al.*, 1997). Esses fatores antinutricionais, em geral, são inativados pela desnaturação das estruturas protéicas quaternárias e terciárias, deixando de afetar o valor nutricional do alimento. No entanto, a lectina é resistente ao calor seco e, portanto, o aquecimento por microondas ou processo de torrefação podem não ser eficientes na redução do teor dessas proteínas, dependendo da temperatura e do grau de umidade empregado (MAENZ *et al.*, 1999).

A soja apresenta teores de 1 a 2,3 % de ácido fítico, o qual tem uma importante função de transferência de energia na metabolização e é o principal armazenador de fosfato no grão (ISANGA & ZHANG, 2008). Porém, o ácido fítico, forma complexos insolúveis com alguns metais, reduzindo assim a absorção intestinal e afetando a sua biodisponibilidade (LIENER, 1994; ANDERSON & WOLF, 1995). Esse ácido pode inibir também a ação de algumas proteínas importantes para a digestão, como pepsina, tripsina e α -amilase (MILES, 1989).

A diminuição dos teores de fatores antinutricionais pode ser alcançada não apenas por tratamento térmico, mas também por processos de fermentação, precipitação, lavagem ou filtração empregados durante o processamento de produtos para consumo humano (ISANGA & ZHANG, 2008).

As saponinas são compostos anfifílicos formados por uma aglicona esteróide ou triterpenóide que tem caráter lipossolúvel e é ligado a uma ou mais moléculas de oligossacarídeos, que as torna hidrossolúveis, podendo interagir com membranas celulares (ISANGA & ZHANG, 2008). A soja contém de 0,2 a 6% de saponinas e já foram identificadas mais de 20 saponinas em extratos de soja (ISANGA & ZHANG, 2008; KANG *et al.*, 2010).

Ainda que, por muito tempo, as saponinas tenham sido consideradas exclusivamente como fatores antinutricionais devido à ação hemolítica, hoje há pesquisas que indicam que essas substâncias podem atuar de forma benéfica à saúde. Há estudos, por exemplo, que indicam que as saponinas podem ter atividade anticâncer devido a sua ação anti-inflamatória, que previne que células inflamem e liberem mediadores pró-inflamatórios, como espécies reativas nitrogenadas e

oxigenadas que podem danificar o DNA celular e iniciar um tumor (COUSSENS & WERB, 2002; KIM *et al.*, 2004). Além disso, é possível que as saponinas atinjam o cólon, onde elas podem interagir com células da mucosa intestinal (BAE *et al.*, 2000). Também foram descritas atividade antiviral (contra HIV) (OKUBO *et al.*, 1994), antioxidativa (YOSHIKI *et al.*, 1996) e atuação na redução de colesterol sérico, pela diminuição da absorção e aumento de sua excreção (SUGANO *et al.*, 1990).

2.6. Compostos bioativos

Alimentos com propriedades bioativas estão sendo largamente estudadas devido às suas funcionalidades em benefício à saúde. A soja e seus derivados contêm diversos fitoquímicos, tais como fitoesteróis, peptídeos e diversos compostos fenólicos, como isoflavonas, que potencialmente auxiliam na redução do risco de doenças cardiovasculares, diabetes, perda óssea e câncer, além de contribuir para a redução de colesterol (KANG *et al.*, 2010).

Os fitoesteróis são precursores de hormônios nas plantas e atuam na estabilização das membranas nas células vegetais. O grão de soja pode conter entre 202 e 843 µg/g de fitoesteróis, sendo que a maior concentração está no gérmen (KANG *et al.*, 2010; YAMAYA *et al.*, 2007). Dentre esses, o β -sitosterol é o mais abundante, seguido por campesterol e stigmasterol (YAMAYA *et al.*, 2007). Estes compostos apresentam atividades anticâncer (AWARD & FINK, 2000) e inibem a absorção de colesterol, auxiliando na redução de colesterol sérico (IKEDA & SUGANO, 1983). Uma análise crítica de 16 estudos clínicos sugere que o consumo de 4 g de fitoesteróis por dia pode resultar na redução de 10% de colesterol total e de 13% de colesterol LDL, devido à similaridade de sua estrutura com o colesterol (MOGHADASIAN & FROLICH, 1999).

A ANVISA aprovou a alegação “Os fitoesteróis auxiliam na redução da absorção de colesterol. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis”. Para um produto poder conter essa alegação no rótulo, sua porção deverá conter no mínimo 0,8 g de fitoesteróis e estar associado a um consumo diário de uma a três porções, para garantir uma ingestão

entre 1 a 3 g de fitoesteróis por dia (ANVISA, 2011). Essas alegações podem ser encontradas em produtos à base de soja, porém não seria viável consumir soja em grão para obter essa quantidade de fitoesteróis. Considerando que o teor médio de fitoesteróis na soja é de aproximadamente 0,4 mg/g (YAMAYA *et al.*, 2007), seria necessário consumir 2,5 kg de soja para ingerir 1 g de fitoesteróis.

As propriedades bioativas e antioxidantes dos peptídeos são afetadas pelo grau de hidrólise, tipo de protease e condições de processamento empregadas nos isolados proteicos. A glicinina foi encontrada como principal precursora dos peptídeos isolados, enquanto a β -conglucina era parcialmente resistente à hidrólise mesmo após a remoção de seus açúcares. Evidências quanto à funcionalidade anticâncer dos peptídeos da soja ainda são preliminares, porém o peptídeo lunasina gerou resultados promissores, descritos por Mejia e Lumen (2006).

Produtos fermentados de soja possuem diversos peptídeos bioativos com atividade antitrombótica, antioxidante e capacidade de inibir a enzima conversora de angiotensina (ECA) (GIBBS *et al.*, 2004). Peptídeos extraídos do isolado proteico de soja preta também possuem atividade antioxidante (HAIWEI, 2010) e mostram um possível efeito antidiabético, através da supressão do estresse hepático e melhoramento da resistência de insulina (JANG *et al.*, 2010a).

2.6.1. Compostos fenólicos e atividade antioxidante

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários sintetizados por plantas durante o seu desenvolvimento ou sob condições de estresse, como irradiação UV ou agressões por patógenos (NACZK & SHAHIDI, 2004). A síntese ocorre a partir da fenilalanina e podem ser classificados em dois grandes subgrupos: flavonóides e não-flavonóides (KIM & LEE, 2002).

Os compostos fenólicos em alimentos podem ser estruturas simples ou até compostos altamente polimerizados. Frequentemente, os polifenóis estão complexados com carboidratos, proteínas ou outros componentes. Do ponto de vista analítico, esses compostos podem ser solúveis, encontrados na forma livre ou

conjugada e compartimentalizados em vacúolos celulares, ou insolúveis, ligados em sua maioria a polissacarídeos da parede celular e de alto peso molecular (NACZK & SHAHIDI, 2004).

Sendo assim, não há um único procedimento que seja adequado para a extração de todos os compostos fenólicos em alimentos. Em geral, são quantificados apenas os fenólicos solúveis e estes são classificados como fenólicos totais. Os fenólicos insolúveis são de difícil extração, tendo que ser submetidos à hidrólise ácida, alcalina ou enzimática, e, por isso, dificilmente avaliados nas pesquisas, sendo normalmente subestimados (MIRA *et al.*, 2009).

Metanol, etanol, acetona, água, acetato de etila e, com menor frequência, propanol e dimetilformamida são os solventes utilizados para a extração. Por isso, os extratos fenólicos são uma mistura de diferentes classes de fenólicos solúveis no sistema utilizado, dependendo da polaridade do solvente e do grau de polimerização dos fenólicos (NACZK & SHAHIDI, 2004).

Os períodos de extração variam de 1 minuto a 24 horas. As extrações realizadas em períodos maiores aumentam a probabilidade de oxidação dos fenólicos, se não forem adicionados agentes redutores ao sistema. Os teores também dependem do tamanho da partícula da amostra e da razão amostra:solvente, que não deve ser inferior a 1:10 (NACZK & SHAHIDI, 2004).

A forma mais comum de quantificar fenólicos totais baseia-se na capacidade redutora dos compostos fenólicos que atuam na redução do complexo fosfomolibdato-fosfotungstato a molibdênio e tungstênio (Folin-Ciocalteu) gerando, em meio básico, ânions fenolato que produzem uma coloração azul (SINGLETON *et al.*, 1999; NACZK & SHAHIDI, 2004).

Em alimentos, alguns compostos fenólicos contribuem para coloração, acidez, adstringência, sabor, odor e estabilidade oxidativa, atuando como agentes de proteção contra luz UV (NACZK & SHAHIDI, 2004). Por meio de deslocamento de elétrons e equilíbrio por ressonância, os fenólicos atuam como agentes redutores, sequestrantes de oxigênio singlete e doadores de hidrogênio aos radicais livres (MIRA *et al.*, 2009). Essa função de proteção contra danos oxidativos no vegetal e

nos alimentos que os contêm, também é observada em seres humanos. Estudos epidemiológicos apoiam efeitos protetores dos polifenóis contra cânceres e doenças cardiovasculares (ARTS *et al.*, 2001).

Por esses motivos, além de quantificar o teor de compostos fenólicos totais, é comum avaliar a atividade antioxidante desses extratos pelos mais diversos métodos. Algumas dessas análises envolvem transferência de hidrogênio e outras, transferência de elétrons (HUANG *et al.*, 2005).

A maioria dos procedimentos com transferência de moléculas de hidrogênio está baseada na competição do antioxidante e do substrato pelos radicais peróxidos gerados. Alguns desses ensaios mais conhecidos são ORAC (*oxygen radical absorbance capacity*), TRAP (*total radical trapping antioxidant parameter*), HOSC (*hydroxyl radical scavenging capacity*) e inibição de oxidação de LDL (HUANG *et al.*, 2005).

Já os procedimentos com transferência de elétrons medem a capacidade de um antioxidante reduzir um oxidante, que muda de cor ao ser reduzido. Esses ensaios incluem DPPH[•] (método de sequestro do radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazil), FRAP (*ferric ion reducing antioxidant power*), ABTS^{•+} (método de sequestro do radical (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico)) e TEAC (*Trolox equivalence antioxidant capacity*) (HUANG *et al.*, 2005). Como as análises de transferência de hidrogênio e as de transferência de elétrons envolvem mecanismos de ação distintos, é comum que a atividade antioxidante dos extratos de compostos fenólicos seja avaliada por um método de cada princípio.

Além disso, é importante notar que ainda que dois métodos determinem a capacidade antioxidante e expressem os resultados na mesma unidade, se os mecanismos de ação e meios de reação forem distintos não é possível comparar diretamente os seus resultados. Esse é o caso dos métodos de DPPH[•] e ORAC que podem ter seus resultados expressos na mesma unidade, por exemplo, µmoles equivalentes de Trolox/g de amostra, porém seus princípios de reação são diferentes.

O método de DPPH[·] se baseia na reação dos compostos antioxidantes da amostra que doam elétrons para o radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH[·]), reduzindo a absorbância a 517 nm devido à descoloração do DPPH[·] (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995; BONDET *et al.*, 1997; MOLYNEUX, 2004). O método de ORAC mede a capacidade antioxidante da amostra de proteger a fluoresceína de oxidação, pelo gerador de radical livre AAPH [2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihidroclorato]. As substâncias antioxidantes presentes na amostra doam átomos de hidrogênio para o radical livre, até que devido à redução de sua atividade antioxidante, o radical AAPH passe a reagir com a fluoresceína degradando sua estrutura química e, conseqüentemente, reduzindo a sua fluorescência (OU *et al.*, 2001).

Para que a atividade antioxidante corresponda ao teor de fenólicos presente no alimento, é necessário determinar o solvente mais eficiente para a extração desses compostos. Devido à diferença de composição entre os alimentos, o solvente mais adequado pode variar. Xu e Chang (2007a) avaliaram diversos solventes e encontraram que acetona 50% extraía mais fenólicos em ervilhas, grão de bico e soja amarela, enquanto acetona acidificada 70% era o solvente mais adequado para soja preta, lentilha e feijão preto. Também mediram a atividade antioxidante desses extratos pelos métodos DPPH[·], FRAP e ORAC. No entanto, nesse caso não foi possível determinar um solvente que resultasse maior valor para cada um dos métodos testados. Após fazerem um estudo de correlação entre os teores de fenólicos totais e os diferentes métodos de determinação de capacidade antioxidante, os autores concluíram que a extração com acetona acidificada 70% gerou maior correlação que os outros solventes.

Em estudo subsequente, esses mesmos pesquisadores relataram que a soja preta crua possuía um teor significativamente superior de compostos fenólicos totais, flavonóides e atividade antioxidante (DPPH, FRAP e ORAC) que a soja amarela (XU & CHANG, 2008b). Slavin *et al.* (2009b) também compararam os compostos fenólicos e a atividade antioxidante (ABTS^{·+}, ORAC, HOSC) de soja de colorações distintas (preta, marrom, verde e amarelo) e verificaram quantidades significativamente superiores na soja preta e correlação com a capacidade antioxidante.

Jin-rui *et al.* (2007) avaliaram por FRAP a capacidade antioxidante dos extratos de fenólicos totais e das antocianinas de 101 variedades de soja preta e 15 variedades de soja amarela, encontrando maiores teores nos grãos escuros. Observaram ainda diferenças significativas entre soja preta cultivada em regiões distintas, demonstrando que variações podem ocorrer em função do local de cultivo. Outros autores também observaram atividade antioxidante 20% maior na soja preta do que na amarela, pelo método de ORAC (YEN & LAI, 2003).

A maior parte dos compostos fenólicos e maior capacidade antioxidante são encontradas na casca da soja preta. De acordo com Xu e Chang (2008a), a casca do grão possui 73% dos fenólicos totais, 86% dos flavonóides, 80% das proantocianidinas e 100% das antocianinas monoméricas presentes no grão inteiro. Por outro lado, observou-se que a casca continha apenas 8% dos ácidos fenólicos e 5% das isoflavonas, que estavam em sua maioria presentes no cotilédone. Assim, a casca foi o maior contribuinte para a atividade antioxidante do grão, sendo que o cotilédone da soja preta apresentou atividade semelhante ao grão inteiro de soja amarela.

Xu e Chang (2008c) avaliaram ainda o efeito do cozimento sobre o teor de fenólicos e atividade sequestradora de radicais livres em soja amarela e preta. Observaram que o tratamento térmico causou significativo decréscimo dos ácidos fenólicos totais da soja, porém a correlação entre os teores dos compostos fenólicos e de suas atividades antioxidantes manteve-se constante.

Lin e Lai (2006) verificaram a existência de correlação direta entre o teor decrescente de fenólicos e a atividade antioxidante durante a germinação de soja preta. Nesse processo ocorre uma perda de pigmentos do tegumento nas primeiras 24 horas, o que compromete a sua atividade antioxidante. Porém, a partir do segundo dia de germinação, observou-se um aumento dos compostos fenólicos devido à clivagem dos açúcares e formação de agliconas. Kim *et al.* (2011a) também observaram o aumento de atividade antioxidante da soja preta quando submetida ao processo de torrefação, possivelmente devido à alteração dos compostos fenólicos e formação de produtos da reação de Maillard, com reconhecida atividade antioxidante.

Tem crescido o número de artigos publicados sobre compostos fenólicos e atividade antioxidante de produtos à base de soja preta, como molho de soja (CHIOU *et al.*, 2001), tofu (SHIH *et al.*, 2002), extratos (FURUTA *et al.*, 2003), *chungkukjang* (alimento tradicional coreano à base de soja fermentada) (SHON *et al.*, 2007), iogurte (FENG *et al.*, 2008), leite de soja (XU & CHANG, 2009a), *koji* (arroz fermentado) (HUANG & CHOU, 2010; WANG *et al.*, 2010), entre outros.

2.6.1.1. Flavonóides

Os flavonóides constituem o maior e mais importante grupo dentre os compostos fenólicos e todos contêm uma estrutura comum de difenilpropano ($C_6-C_3-C_6$). Estes compostos podem ser classificados em seis subgrupos (**Figura 8**): antocianidinas, catequinas (flavan-3-ols), flavonóis, flavonas, flavanonas e isoflavonas (KIM & LEE, 2002).

Fonte: adaptado de IGNAT *et al.*, 2011

Figura 8. Estruturas químicas de flavonóides.

Ainda que os flavonóides encontrados na natureza sejam milhares devido às suas diferentes formas glicosiladas, o potencial bioativo desses compostos é atribuído às agliconas e não à forma glicosilada, pois os açúcares prejudicam a interação desses compostos com as proteínas (SAKAKIBARA *et al.*, 2003).

Os flavanóis, tais como catequina, epicatequina e epigallocatequina, são encontrados predominantemente em chá verde e chá preto. Em geral, essas substâncias estão na forma aglicona, diferentemente dos outros flavonóides na natureza que são encontrados em sua forma glicosilada, com um grupo hidroxila ligado a açúcares, como glucose, ramnose, galactose e arabinose. Os flavonóis possuem espectros de absorção com máximos em 210 e 280 nm e eluem em sistema de HPLC em fase reversa na ordem epigallocatequina, catequina e epicatequina (KIM & LEE, 2002).

As flavanonas, contendo o anel heterocíclico saturado, são principalmente encontradas na forma glicosilada em frutas cítricas e geralmente podem ser detectados no espectro de absorção, em 280 nm. As flavonas são mais raras em plantas, mas podem ser encontradas em plantas cítricas na forma polimetoxilada, incluindo nobiletina, sinensetina e tangeretina, detectados em 360 ou 370 nm (KIM & LEE, 2002).

Os flavonóis constituem o grupo prevalecente de flavonóides e são geralmente encontrados glicosilados no anel C₃. As agliconas mais comuns de flavonóis são kaempferol, quercetina e miricetina, que são detectados a 270, 365 e 370 nm, respectivamente (KIM & LEE, 2002).

Os flavonóides são extraídos com metanol, etanol, água ou suas combinações e estes solventes podem ser acidificados, dependendo do grupo a ser extraído (HOLLMAN *et al.*, 1996; MERCKEN & BEECHER, 2000; NACZK & SHAHIDI, 2004).

A quantificação de flavonóides pode ser feita após complexação dos flavonóides com metais, principalmente o íon Al³⁺, e análise por método espectrofotométrico. Essa complexação pode ocorrer em três sítios quelantes (**Figura 9**): grupos 3-OH, 5-OH e 3', 4'-o-diOH (MALESEV & KUNTIC, 2007)

Fonte: adaptado de MALESEV & KUNTIC, 2007

Figura 9. Sítios possíveis para a complexação de flavonóides com o íon Al^{3+} .

A reação do metal com as hidroxilas nas posições 3- ou 5- torna essa metodologia específica, evitando-se a interferência de outras substâncias fenólicas, como os ácidos fenólicos que invariavelmente acompanham os flavonóides na extração (DENG & VAN BERKEL, 1998). O complexo metálico formado possui coloração amarela e sua intensidade pode ser medida espectrofotometricamente com o máximo de absorção em 510 nm (ZHISHEN *et al.*, 1999).

2.6.1.1.1. Antocianinas

As antocianinas são responsáveis pela coloração vermelha, roxa, azul e preta encontrada em diversos vegetais, frutas e grãos (LEE *et al.*, 2005). Esses compostos são formados por uma estrutura básica denominada antocianidinas que se ligam a uma ou mais moléculas de açúcar. As antocianidinas consistem em um anel aromático ligado a um anel heterocíclico que contém oxigênio, que está, por sua vez, ligado a um segundo anel aromático por uma ligação carbono-carbono (CASTAÑEDA-OVANDO *et al.*, 2009).

As principais diferenças entre as antocianinas são o número de grupos hidroxila, o tipo e número de açúcares ligados à sua estrutura, os ácidos carboxílicos alifáticos ou aromáticos ligados aos açúcares na molécula e as posições dessas

ligações. Até hoje já foram identificadas mais de 500 antocianinas distintas e 23 antocianidinas, das quais apenas seis são as mais comuns em plantas vasculares: pelargonidina, peonidina, cianidina, malvidina, petunidina e delphinidina (**Figura 10**) (CASTAÑEDA-OVANDO *et al.*, 2009).

Figura 10. Estrutura básica das antocianidinas mais comuns.

As antocianinas alteram a sua forma química de acordo com o pH da solução em que se encontram (**Figura 11**). Em pH ácido, em torno de pH 1,0, sua estrutura está na forma de cátion flavílium, apresentando cor vermelha, enquanto em pH entre 2 e 4, a forma de base quinoidal é predominante azul. Já em pH 4,5 até 6, as antocianinas se desprotonizam constituindo as formas carbinol e chalcona que são incolores. As chalconas também podem apresentar coloração levemente amarela. Em pH acima de 7 pode ocorrer a degradação das antocianinas (CASTAÑEDA-OVANDO *et al.*, 2009).

Fonte: BORDIGNON *et al.*, 2009

Figura 11. Estruturas moleculares encontradas em solução aquosa com diferentes valores de pH.

Essas mudanças de coloração limitam o emprego de antocianinas como corantes naturais e proporcionam uma maneira prática e fácil de medir a concentração total do pigmento (WROLSTAD *et al.*, 2005). Por isso, em meio ácido, esses compostos se mantêm na forma de cátion flavílium e podem ser detectados na região visível no espectro entre 500 e 550 nm (KIM & LEE, 2002). Esse método de quantificação das antocianinas totais é utilizado por diversos autores (ABDEL-AAL & HUCL, 1999; FURUTA *et al.*, 2003; JIN-RUI *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2008b). Também é largamente empregada a metodologia de pH diferencial, que se baseia na diferença de absorção dos pigmentos em pH 1,0 e pH 4,5, que são medidos espectrofotometricamente a 510 e 700 nm (LEE *et al.*, 2005).

O método de pH diferencial foi desenvolvido para bebidas, porém muitas vezes é possível adaptá-lo para outras matrizes alimentícias, como no caso de alimentos sólidos em que se faz necessário a extração das antocianinas. A soja, no entanto, apresenta um agravante: o ponto isoelétrico das proteínas também é pH 4,5.

Portanto, nesse pH ocorre a precipitação das proteínas e a solução se turva, impossibilitando a leitura espectrofotométrica. Por isso, pode ser preferível optar por outras metodologias para a quantificação de antocianinas em soja.

As antocianinas podem estar na forma monomérica, polimérica ou ainda estabilizada por meio de copigmentação ou auto associação, com o envolvimento de moléculas de antocianidinas, de flavonóides ou ácidos aromáticos e de açúcares (BOULTON, 2001). Por isso, é importante ressaltar que as metodologias citadas acima medem primordialmente as antocianinas monoméricas que são as mais susceptíveis a alteração de pH (KRENN *et al.*, 2007) .

A separação de diferentes antocianinas pode ser feita por HPLC, sendo que diversos autores também utilizam esta técnica na identificação e quantificação das mesmas (CHOUNG *et al.*, 2001; POZO-INSFRAN *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 2006a; ROSSO & MERCADANTE, 2007, 2008; XU & CHANG, 2008a, b, c; LEE *et al.*, 2009; HA *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2010). Lee *et al.* (2008b) comprovaram a alta correlação entre o método de pH diferencial e de HPLC na determinação da quantidade de antocianinas em sucos.

Em 2009, Lee *et al.* isolaram e identificaram pela primeira vez nove antocianinas em soja preta produzida na Coréia do Sul utilizando cromatografia de coluna aberta C-18 de fase reversa e HPLC com detecção por arranjo de diodos e análise de espectrometria de massas (DAD-ESI/MS) com ionização por eletro spray. Até então tinham sido identificadas apenas três antocianinas principais, delfinidina-3-O-glicosídeo, cianidina-3-O-glicosídeo e petunidina-3-O-glicosídeo (CHOUNG, 2001). Contudo, foi possível identificar ainda pelargonidina-3-O-glicosídeo e cianidina, além de quatro antocianinas minoritárias, catequina-cianidina-3-O-glicosídeo, delfinidina-3-O-galactosídeo, cianidina-3-O-galactosídeo e peonidina-3-O-glicosídeo.

Recentemente, outros pesquisadores também procuraram identificar as antocianinas presentes em soja preta e encontraram além das três principais, mencionadas anteriormente, pelargonidina-3-O-glicosídeo, pelargonidina-3-O-(6''-malonilglicosídeo), cianidina-3-O-galactosídeo e cianidina (KOH *et al.*, 2011).

As antocianinas são especialmente abundantes na casca da soja preta. Num estudo, no qual foram avaliadas cinco variedades de soja preta, foi encontrado um valor médio de 3360 µg de antocianinas por grama de casca. Em relação à massa do grão inteiro, essa média foi de 200 µg/g, enquanto o cotilédone possui menos de 1 µg/g (KIM *et al.*, 2006a).

As antocianinas presentes na planta agem como antioxidantes auxiliando na proteção contra danos causados pelos raios UV. Ainda que não tenham sido elucidados os mecanismos de ação das antocianinas, estudos *in vitro* e *in vivo* apontam que esses pigmentos extraídos da soja preta podem ser úteis na moderação do envelhecimento da pele induzido por UVB (TOSYI *et al.*, 2008a; TOSYI *et al.*, 2008b).

Outros estudos, que avaliaram os efeitos de extratos de soja preta, indicam que as antocianinas possivelmente possam atuar na redução de colesterol e triglicérides (KWON *et al.*, 2007), na inibição de oxidação de LDL (TAKAHASHI *et al.*, 2005; ASTADI *et al.*, 2009; CHEN *et al.*, 2011), na supressão de proliferação de células cancerígenas na próstata (JANG *et al.*, 2010b) e no cólon (FORESTER & WATERHOUSE, 2010) e na prevenção de inflamações (KIM *et al.*, 2008; NIZAMUTDINOVA *et al.*, 2009b) e de trombose (KIM *et al.*, 2011b).

Contudo, estudos referentes à biodisponibilidade das antocianinas ainda não são conclusivos. Os experimentos *in vitro*, simulando condições fisiológicas, demonstram que as antocianinas são rapidamente degradadas em seus ácidos fenólicos e aldeídos constituintes, sendo que a hidroxilação do anel B contribui para a instabilidade da molécula (WOODWARD *et al.*, 2009). Alguns estudos *in vivo*, que avaliaram a concentração de metabólitos das antocianinas no plasma e na excreção urinária, sugerem que a absorção é baixa (SELMA *et al.*, 2009; PASCUAL-TERESA *et al.*, 2010), porém há dúvidas quanto aos resultados relatados uma vez que nem todos os seus metabólitos são conhecidos e o mecanismo de interação com a microbiota intestinal também é desconhecida.

2.6.1.1.2. Isoflavonas

As isoflavonas, um subgrupo dos flavonóides, são conhecidas há mais de 100 anos e estão escassamente distribuídas na natureza. Ainda que haja uma variedade de plantas, como o trevo vermelho, que contenha esse composto, dentre os alimentos consumidos por humanos, apenas a soja contém quantidades significativas (MESSINA, 2010).

Doze formas de isoflavonas foram identificadas em soja, incluindo três agliconas (genisteína, daidzeína e gliciteína) e três formas conjugadas de cada aglicona (glicosídeos). Essas formas conjugadas possuem uma molécula de glicose, que sem adição de outros grupos são β -glicosídeos (genistina, daidzina e glicitina), ou podem ser ligados a um grupo acetil (6''-O-acetilglicosídeos) ou a um grupo malonil (6''-O-malonilglicosídeos) (CHOI & RHEE, 2006; JUN-MING *et al.*, 2011).

No entanto, apenas as agliconas são absorvidas pelo sistema digestivo humano (SETCHELL *et al.*, 2002). Sendo assim, alguns pesquisadores verificaram que é possível aumentar o teor de agliconas em produtos de soja, como farinha de soja, ao submetê-los a hidrólise ácida, que favorece a deglicosilação das isoflavonas presentes nesse alimento (TYUG *et al.*, 2010). As agliconas também apresentam capacidade antioxidante 50 até 100 vezes maior que as isoflavonas glicosiladas, medida pelo método de DPPH (SAKTHIVELU *et al.*, 2008).

A luz pode auxiliar na formação de isoflavonas em brotos de soja, enquanto o tempo de armazenamento, em geral, diminui o seu teor (KIM *et al.*, 2006b). Outros estudos demonstram existir influência de fatores genéticos e ambientais, como condições do solo e temperatura de cultivo, nos teores de isoflavonas (KIM *et al.*, 2006b; RIEDL *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2008a; BRITZ *et al.*, 2011). No entanto, ainda não foi elucidado como essas condições ambientais afetam o perfil de isoflavonas (BRITZ *et al.*, 2011).

Um estudo realizado com variedades de soja de altos e baixos teores proteicos mostrou que a amostra contendo menor quantidade de proteína apresentava 75% mais isoflavonas, sendo 5,1% na forma de agliconas (PAUCAR-MENACHO *et al.*, 2010). Outra pesquisa indicou que é possível realizar

melhoramentos genéticos no perfil de ácidos graxos, por exemplo, aumentando o teor de ácido α -linolênico, sem reduzir o conteúdo de isoflavonas (SLAVIN *et al.*, 2009a), indicando vias de biossíntese independentes.

Um trabalho indicou que a soja preta apresenta teores de isoflavonas totais próximos aos determinados em soja amarela, 2,66 mg/g e 2,95 mg/g, respectivamente (YEN & LAI, 2003). Também foram avaliadas as isoflavonas individualmente na soja preta e foi encontrado 0,98 mg/g de daidzina e 0,73 mg/g de genistina, enquanto suas agliconas estavam presentes nas quantidades de 0,50 mg/g e 0,24 mg/g, respectivamente. Os 0,21 mg/g restantes foram identificadas como gliciteína. Outras cinco variedades de soja preta apresentaram menor ou igual teor de isoflavonas. O conteúdo de genisteína, por exemplo, variou entre 0,15 e 0,24 mg/g e foi encontrado de 0,19 a 0,22 mg/g de daidzeína (CORREA *et al.*, 2010).

Contudo, os autores de uma pesquisa com 268 variedades de soja, incluindo amostras com casca preta, marrom, verde e amarela, cultivadas em diferentes regiões da Coréia do Sul, concluiu que as diferenças de concentrações de isoflavonas observadas em soja de colorações distintas são principalmente afetadas pelas condições ambientais do plantio (LEE *et al.*, 2010).

O efeito do processamento térmico da soja preta afeta os teores de isoflavonas. As agliconas são as mais afetadas por aquecimento a 100 °C por 30 minutos restando apenas 68% da quantidade inicial encontrada nos grãos. Quanto às isoflavonas glicosiladas o tratamento térmico resultou em perda de apenas 10% e 16% de malonilglucosídeo e acetilglucosídeo, respectivamente. (HUANG & CHOU, 2008). Foi observado ainda que a soja preta cozida e liofilizada sofre redução dos teores de isoflavonas durante o armazenamento. Verificou-se que a perda desses compostos depende de fatores como a temperatura de armazenagem, forma de acondicionamento do produto e perfil de isoflavonas contidas nas amostras (HUANG & CHOU, 2009).

As isoflavonas são ainda classificadas como fitoestrógenos, pois possuem estrutura semelhante ao estrógeno (estradiol) humano e possivelmente funcionalidade similar (**Figura 12**).

Fonte: DEMMIG-ADAMS & MCCAULEY, 2005

Figura 12. Estrutura de um estrógeno (estradiol) e uma isoflavona (genisteína).

Algumas pesquisas sugerem que as isoflavonas têm efeito preventivo de sintomas ou doenças relacionadas ao equilíbrio hormonal, como climatério ou osteoporose (MCCUE & SHETTY, 2004). Porém, considerando a variabilidade da flora intestinal, sabe-se que apenas um terço ou até metade da população é capaz de metabolizar a daidzeína em equol, o composto bioativo, e se beneficiar de suas atividades de regulação hormonal, redução de colesterol e prevenção de câncer (YUAN *et al.*, 2007; ORGAARD & JENSEN, 2008; NAGATA, 2010).

Muitos estudos clínicos e epidemiológicos que apontam a relação entre o consumo de soja e a baixa incidência de doenças cardiovasculares e câncer, colocam as isoflavonas e proteínas de soja como principais responsáveis pelo efeito protetor. Entretanto, há controvérsias entre as pesquisas, pois alguns indicam não haver ou haver pouco efeito das isoflavonas sobre essas doenças, pois há centenas de outros componentes que também podem contribuir para esse resultado (OMONI & ALUKO, 2005; CEDERROTH & NEF, 2009).

2.6.1.2. Não-flavonóides

Dentre os compostos não-flavonóides estão os ácidos fenólicos, taninos, estilbenos, lignanas, entre outros. Os estilbenos estão pouco presente na alimentação humana, mas o mais conhecido dentre esses compostos é o resveratrol, presente em vinho, uvas, “berries” e amendoins. Esses compostos em geral estão

na forma glicosilada, enquanto nas lignanas predomina a forma livre (**Figura 13**). Linhaça e gergelim são alimentos com teores altos de lignanas (NACZK & SHAHIDI, 2004).

Fonte: adaptado de IGNAT *et al.*, 2011

Figura 13. Exemplo de estilbeno e lignana.

Os taninos são polímeros de polifenóis de alto peso molecular que ocorrem naturalmente, interagem com proteínas e são responsáveis pela sensação de adstringência. Esses compostos podem ser classificados em três grupos: taninos condensados, taninos hidrolisáveis e florotaninos. Os taninos condensados são oligômeros ou polímeros de flavonóides, como catequinas ou epicatequinas. As proantocianidinas ou procianidinas, também são taninos condensados, e sob condições oxidativas e ácidas são clivadas em antocianidinas (**Figura 14**). Os taninos hidrolisáveis, galotaninos ou elagitaninos, são polímeros de ácido gálico ou elágico, respectivamente. Os florotaninos são constituídos por unidades de floroglucinol (KIM & LEE, 2002).

Fonte: adaptado de IGNAT *et al.*, 2011

Figura 14. Exemplo de tanino e proantocianidina.

Os ácidos fenólicos presentes em alimentos de origem vegetal são derivados de dois compostos fenólicos, ácido benzóico e cinâmico, que dão origem aos ácidos hidroxibenzoico, hidroxifenilacético e hidroxicinâmico. Este último é o mais encontrado em alimentos como frutas, vegetais, sementes de leguminosas, grãos de cereais e vinhos (LAFAY & GIL-IZQUIERDO, 2008; AMAROWICZ *et al.*, 2009). Dentre os ácidos hidroxicinâmicos encontrados com maior frequência estão os ácidos *p*-cumárico, caféico, ferrúlico e sinápico (**Figura 15**), geralmente na forma de ésteres ligados a açúcares ou, ainda mais frequentemente, na forma de ésteres de ácido quínico. Raramente são encontrados em sua forma livre na natureza. (KIM & LEE, 2002).

Fonte: adaptado de ROBBINS & BEAN, 2004

Figura 15. Ácidos hidroxicinâmicos encontrados com maior frequência.

O armazenamento altera o conteúdo de ácidos fenólicos e, dependendo da amostra e das condições de armazenagem, é possível observar perda ou aumento no teor. A alta temperatura é o principal responsável pela redução dos ácidos fenólicos, devido à volatilidade de alguns compostos e por propiciar a oxidação de outros. Em alguns casos, como nos de germinação, congelamento, maturação ou secagem ao sol de determinados alimentos, pode ser observado um aumento de determinados ácidos fenólicos provavelmente devido à hidrólise.

Observou-se ainda que o processo de liofilização não afeta o teor de ácidos fenólicos (AMAROWICZ *et al.*, 2009). Os teores de ácidos fenólicos em soja e outras leguminosas também são influenciados pelo genótipo, local de cultivo e condições climáticas (KIM *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 2006b; LUTHRIA & PASTOR-CORRALES, 2006; JIN-RUI *et al.*, 2007).

2.7. Soja preta e sua relação com a saúde

Há diversos estudos que avaliam a relação de soja amarela e seus efeitos sobre a saúde, no entanto, as pesquisas com soja preta são mais escassas. Há algumas pesquisas que indicam que a ingestão de soja preta pode beneficiar pessoas com elevadas taxas séricas de colesterol e prevenir o diabetes tipo 2. Takahashi *et al.* (2005) e Astadi *et al.* (2009) realizaram pesquisas evidenciando que o efeito da soja preta em inibir a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) era maior que o observado com a soja amarela. Assim, a soja preta parece melhorar o perfil lipídico e os níveis de colesterol sanguíneo (PARK *et al.*, 2007). Efeitos hipolipidêmicos e antiobesidade das antocianinas da soja também foram observados por Kwon *et al.* (2007), contribuindo para a redução de triglicerídeos e colesterol sérico, assim como, para o aumento da concentração de HDL-colesterol.

Estudos *in vitro* indicaram atividade antiproliferativa contra células tumorais (FANG *et al.*, 2010) e atividade de indução de apoptose (INGAKI *et al.*, 2007). Outros experimentos *in vitro* e *in vivo* indicam a ação da soja preta como agente anti-inflamatório e antiproliferativo (KIM *et al.*, 2008). Outra pesquisa verificou ainda efeito antiviral da água de cozimento da soja preta contra adenovírus, coxsackievírus e vírus de influenza (YAMAI *et al.*, 2003).

Experimentos com animais sugerem que a ingestão de extrato da casca de soja preta eficientemente melhora a memória e a habilidade de aprendizado de ratos (SHINOMIYA *et al.*, 2005). Outro estudo avaliou os efeitos de extrato de soja preta, tanto aplicado *in vitro* e *ex vivo*, como *in vivo* através de administração oral e encontrou resultados que indicam atenuação de trombose, podendo auxiliar na

prevenção do risco cardiovascular e na melhora da circulação sanguínea (KIM *et al.*, 2011b).

Além disso, há artigos publicados sobre os efeitos de produtos à base de soja preta no organismo (OKAZAKI *et al.*, 2010; CHANG *et al.*, 2011). Mesmo com essas pesquisas, a avaliação biológica da soja preta e de seus compostos está no início e certamente há mais questionamentos do que respostas quanto a mecanismos de ação, componentes bioativos e atividades funcionais.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Avaliar características físicas, diferenças de composição química incluindo os compostos fenólicos e a atividade antioxidante entre soja preta e amarela, crua e cozida, produzida em condições climáticas e ambientais similares.

3.2. Específicos

- Estudar comparativamente algumas características físicas da soja preta e amarela.
- Determinar a composição centesimal da soja preta e amarela e seus perfis de ácidos graxos.
- Avaliar quantitativamente os teores de compostos fenólicos totais, flavonóides e antocianinas monoméricas totais presentes na soja preta e amarela, crua e cozida.
- Determinar a composição qualitativa das antocianinas na soja preta, crua e cozida, por HPLC–DAD–MS/MS.
- Avaliar a capacidade antioxidante de extratos de soja preta e amarela, crua e cozida, contendo compostos fenólicos, pelos métodos de sequestro do radical DPPH[•] (1,1-difenil-2-picril-hidrazil) e de ORAC (*oxygen radical absorbance capacity*).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Reagentes

Os solventes e ácidos grau p.a. foram adquiridos da Labsynth (Brasil). Os solventes e reagentes grau cromatográfico (HPLC) foram obtidos da Merck (Alemanha) e da Mallinckrodt Baker (EUA). A água destilada foi deionizada em sistema Milli-Q (Millipore, EUA). Para as análises cromatográficas, as amostras e os solventes foram filtrados utilizando, respectivamente, membranas de 0,22 e 0,45 µm da Millipore.

4.2. Amostras de soja

Amostras de nove genótipos de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) foram doados pela empresa Naturalle® (Uberlândia-MG). Todos os genótipos foram cultivados na estação experimental da empresa em Uberlândia-MG, nas mesmas condições de solo, temperatura, precipitação e uso de defensivos agrícolas. O plantio foi realizado em novembro de 2009 e a colheita em março de 2010. Em seguida, 3 kg de cada amostra foram enviados para o laboratório em *bags* herméticos que foram armazenados em câmara fria a 4 °C até o momento das análises.

Nenhum dos genótipos é geneticamente modificado e todas contêm lipoxigenases, exceto o genótipo NT 3001 que não possui nenhum dos três tipos desta enzima. Todos os genótipos têm cotilédone amarelo, dois dos genótipos possuem tegumento de coloração preta e sete são de tegumento amarelo. Os genótipos pretos correspondem às siglas NT 7001 e NT 7002. Características como altura da planta, ciclo, produtividade e região indicada para plantio de cada genótipo podem ser observadas na **Tabela 1**. Nota-se que a produtividade da soja preta foi similar à amarela.

Tabela 1. Características dos genótipos de soja.

	Genótipo	Altura da planta (cm)	Ciclo (dias)	Produtividade (kg/ha)	Região indicada para plantio
Soja amarela	NT 2	90	135	3 200	PR, SP
	NT 4	65	125	3 300	MG, GO
	NT 10	100	120	3 000	MG, GO
	NT 12	60	120	3 000	PR, SP, MG, GO
	NT 14	130	130	2 800	GO
	NT 3001	120	135	2 400	MG
	TF 99 1405	110	115	2 800	MG
Soja preta	NT 7001	110	115	3 000	MG
	NT 7002	90	130	3 200	MG

Informações fornecidas pela empresa Naturalle®

4.3. Características físicas

4.3.1. Massa de 100 grãos

A massa de 100 grãos inteiros de cada genótipo foi medida, em triplicata, em balança analítica, dispensando-se grãos partidos e quebrados.

4.3.2. Dimensões do grão

O comprimento, a largura e a espessura dos grãos foram medidos em 10 grãos de cada genótipo utilizando um micrômetro.

4.3.3. Capacidade de hidratação

A capacidade de hidratação foi avaliada de acordo com a metodologia descrita por Saha *et al.* (2008). Inicialmente, foram pesados aproximadamente 25 g de grãos de soja de cada genótipo. Esses grãos foram contados e transferidos para béqueres contendo 100 mL de água destilada. Os béqueres foram cobertos com papel alumínio e permaneceram 16h à temperatura ambiente (25 °C). No dia

seguinte, os grãos foram drenados, a água em excesso removida com filtro de papel, e os grãos intumescidos foram novamente pesados. A análise foi feita em triplicata e a capacidade de hidratação foi determinada utilizando a fórmula:

$$CH_g = (m_f - m_i) / n$$

Sendo:

CH_g = capacidade de hidratação por grão (g/grão)

m_f = massa dos grãos intumescidos (g)

m_i = massa inicial dos grãos (g)

n = número de grãos

4.3.4. Tempo de cozimento

Para a avaliação do tempo de cozimento dos grãos de soja, utilizou-se o aparelho cozedor de Mattson, com 25 hastes de peso igual (PROCTOR & WATTS, 1987). Foram pesados 25 g de grãos de cada genótipo, os quais permaneceram imersos em 100 mL de água destilada por 16h à temperatura ambiente (25 °C). A água foi posteriormente drenada e 25 grãos colocados sobre a placa suporte do aparelho com uma haste apoiando cada grão. O aparelho foi colocado em uma panela com água destilada fervente. À medida que ocorria o cozimento, as hastes penetraram os grãos e o tempo decorrido do instante em que o cozedor foi colocado na água fervente até a queda de 13 hastes (50% + 1) foi considerado como tempo médio de cozimento.

4.4. Análise de composição centesimal

4.4.1. Preparo das amostras de soja

Os grãos de soja para análise centesimal foram selecionados, excluindo-se impurezas, grãos partidos ou avariados. As amostras foram trituradas em moinho analítico (Analytical Mill A10, Kinematica GAC, Luzern, Switzerland) e peneiradas a

80 mesh (<0,177 mm). Todas as análises foram realizadas em triplicata e em até 24 horas após a moagem dos grãos.

4.4.2. Determinação de umidade

A umidade das amostras foi determinada por secagem em estufa a 105 °C até peso constante (AOAC, 1995). A análise foi feita em triplicata com 3 g de cada amostra. Foram necessárias aproximadamente 5 horas para que as amostras atingissem peso constante e a umidade foi calculada após terem sido resfriadas em dessecador.

4.4.3. Determinação de resíduo mineral

O resíduo mineral foi determinado por combustão da matéria orgânica em mufla a 550 °C (AOAC, 1995). Cada amostra de 3 g foi pesada em cadinho de porcelana, previamente tarado. Após a incineração em chapa elétrica, o cadinho foi colocado em mufla por 9 horas até atingir combustão completa da matéria orgânica. O cadinho foi resfriado em dessecador e novamente pesado.

4.4.4. Determinação de proteínas

O teor proteico foi determinado pelo método de micro-Kjeldahl ($N \times 6,25$) (AOAC, 1995). O método consiste na digestão da amostra (30 mg de soja triturada e peneirada) com ácido sulfúrico na presença de sulfato de cobre e sulfato de potássio. O nitrogênio presente na proteína é reduzido e forma sulfato de amônio, que após a adição de hidróxido de sódio 40% é liberado na forma de amônia e recolhida em ácido bórico. Em seguida, o borato de amônio é titulado com ácido clorídrico 0,01M padronizado com carbonato de sódio. A quantidade de nitrogênio total foi calculada pela fórmula abaixo:

$$\% \text{ Nitrogênio} = \frac{(V_{\text{HCl}} - V_{\text{branco}}) \times M \times fc \times 14,007 \times 100}{m_{\text{soja}}}$$

Sendo:

V_{HCl} = volume (mL) de HCl gasto na titulação da amostra

V_{branco} = volume (mL) de HCl gasto na titulação do branco

M = molaridade do HCl

fc = fator de correção do HCl

14,007 = massa molecular do nitrogênio

100 = fator de conversão para porcentagem

m_{soja} = massa inicial (g) da amostra

Esse resultado foi então multiplicado por 6,25 para converter o teor de nitrogênio em proteína.

4.4.5. Determinação de lipídeos

Os lipídeos totais foram quantificados por extração contínua em aparelho tipo Soxhlet, empregando-se éter de petróleo como solvente (AOAC, 1995). Os cartuchos para extração foram preparados com papel de filtro e algodão nas extremidades, sendo depositados no seu interior 5 g de soja moída. Os cartuchos foram colocados em extratores de Soxhlet e acoplados a balões de fundo chato, previamente tarados. Foram adicionados aproximadamente 300 mL de éter de petróleo a cada extrator e o sistema aquecido durante 8 horas, provocando o refluxo do éter, que arrastava consigo os lipídeos da amostra. O solvente foi eliminado em rotaevaporador e a seguir, o balão contendo o óleo foi posto em estufa a 105 °C durante uma hora, colocado em dessecador por 30 minutos e finalmente pesado. O teor de lipídeos foi calculado a partir da diferença entre a massa inicial do balão e sua massa final contendo o óleo.

4.4.6. Determinação de fibra total (solúvel e insolúvel)

A fibra da dieta total foi determinada pela soma da fibra solúvel e insolúvel, determinadas de acordo com o método no. 991.43 da AOAC (1995) sob princípio enzimático e gravimétrico. A amostra foi submetida à digestão com α -amilase termoestável, protease e amiloglicosidase, utilizando o kit Total Dietary Fibre Assay Kit K-TDFR (Megazyme). Utilizou-se etanol para precipitar a fração solúvel, que foi filtrada. O precipitado e o resíduo foram lavados com etanol e acetona, em concentrações crescentes, secos e depois pesados. As amostras de soja foram desengorduradas antes da análise e os resultados calculados, descontando o teor de cinzas e proteínas, para 100 g de amostra seca.

4.4.7. Teor de carboidratos por diferença

Os carboidratos totais foram calculados descontando-se de 100 os teores percentuais de umidade, proteínas, lipídeos, resíduo mineral e fibra alimentar conforme AOAC (1995).

4.5. Determinação de ácidos graxos

A composição de ácidos graxos foi determinada por cromatografia em fase gasosa (CG) após a extração dos lipídeos por hidrólise ácida e derivatização com BF_3 7% em metanol empregando o método no. 996.06 da AOAC (2002). Foram utilizados os fatores de resposta teóricos do FID (flame ionization detector) do método Ce 1h-05 da AOCS (2004). Utilizou-se um cromatógrafo a gás GC 17A Shimadzu/Class GC 10, coluna cromatográfica de sílica fundida Supelcowax 10 de 30 m, 0,25 mm de d.i. e 0,25 μm de espessura da fase estacionária. A programação da temperatura da coluna foi de aquecimento a $1^\circ\text{C}/\text{min}$ de 170°C até 225°C , permanecendo nesta temperatura por 10 minutos e as temperaturas do vaporizador e do detector, foram de 250°C e 270°C , respectivamente. O gás de arraste utilizado foi hélio a uma vazão de 1 mL/min e a razão de divisão da amostra no injetor de 1/50. A composição qualitativa foi determinada por comparação de tempo de

retenção dos picos com os respectivos padrões de ácidos graxos (O7756 FAME mix rapeseed oil, Supelco, EUA). Os teores de ácidos graxos foram obtidos com a área do pico e apresentados em g/100 g de amostra.

4.6. Análise de compostos fenólicos

Após avaliação das características físicas e da composição química, foram selecionados dois dos sete genótipos de soja amarela, que apresentam maior volume de comercialização, para serem analisados quanto aos seus compostos fenólicos e atividade antioxidante, juntamente com os dois genótipos de soja preta.

A análise de compostos fenólicos foi realizada com os genótipos NT 4, NT 12, NT 7001 e NT 7002. Os grãos de soja para análise foram selecionados, excluindo-se impurezas, grãos partidos ou avariados, e avaliadas tanto cruas como cozidas.

4.6.1. Cozimento das amostras

A cocção dos grãos de soja foi realizada de acordo com o método descrito em Xu e Chang (2008c), com pequenas modificações. Para cada genótipo foram pesados 100 g de grãos de soja e colocados de molho em 500 mL de água destilada à temperatura ambiente (25 °C) por 16 horas. Decorrido esse tempo, a cocção da amostra foi feita, a pressão ambiente, por 120 minutos. À medida que a água de cocção evaporava devido ao processo de fervura, acrescentava-se água destilada previamente aquecida para manter o volume constante. Decorrido o tempo de cozimento, a soja com a água remanescente de cocção, foi congelada e liofilizada, e posteriormente, moída.

4.6.2. Preparo das amostras

As amostras cruas e cozidas foram trituradas em moinho analítico (Analytical Mill A10, Kinematica GAC, Luzern, Switzerland) e peneiradas a 80 mesh (<0,177mm). Todas as extrações foram realizadas em triplicata.

4.6.3. Extração de compostos fenólicos totais e antocianinas monoméricas totais

A metodologia de extração dos compostos fenólicos totais foi baseada em Kim e Lee (2002) e Xu e Chang (2007a), com pequenas modificações. Foram pesados em frascos Erlenmeyer âmbar 0,5 g de soja moída para as amostras cruas e 1,0 g de soja moída para as amostras cozidas e liofilizadas. Foram adicionados 10 mL de acetona/água/ácido acético (70:29,5:0,5, v/v/v) a cada amostra e a mistura foi colocada em banho ultrassônico por 30 minutos a temperatura ambiente (25 °C), com leve agitação manual a cada cinco minutos.

Decorrido esse tempo, a suspensão foi centrifugada a 5000 g por 6 minutos, o sobrenadante filtrado em lã de vidro e recolhido em balão volumétrico âmbar de 50 mL. O processo de extração foi repetido mais três vezes empregando 10 mL da solução extratora e os sobrenadantes, combinados. A seguir, a lã de vidro foi lavada com a solução extratora e o volume do balão foi completado. Os extratos foram armazenados a -18 °C no escuro e analisados em até dois dias após a extração. Todas as extrações foram realizadas em triplicata.

Para a extração das antocianinas monoméricas totais foi empregado o mesmo procedimento, porém utilizado etanol 95%:HCl 1,5N (85:15 v/v) como solvente.

4.6.4. Quantificação de compostos fenólicos totais (CFT)

O teor de CFT foi determinado pela reação com o reagente Folin-Ciocalteu de acordo com o método de Singleton *et al.* (1999), com pequenas modificações. A

uma alíquota de 500 µL do extrato cetônico de fenólicos totais acrescentou-se 4500 µL de água destilada e em seguida 500 µL do reagente Folin-Ciocalteu. Após um minuto, tempo necessário para ocorrer a reação, foram adicionados 4000 µL de NaOH. A solução foi, então, homogeneizada com vórtex e deixada em repouso por 2 horas, no escuro. Decorrido o tempo, a absorbância foi medida em espectrofotômetro de UV-visível (UV 160, Shimadzu, Japan) no comprimento de onda de 760 nm contra um branco de reagentes. Foi utilizado ácido gálico como padrão, numa faixa de concentração de 12,5 a 75,0 µg/mL, e os teores de CFT foram expressos em miligramas equivalentes de ácido gálico por grama de amostra em base seca (mg EAG/g).

4.6.5. Quantificação de flavonóides

O teor de flavonóides foi determinado utilizando o método colorimétrico descrito por Jia *et al.* (1999). Em um tubo de ensaio, foram adicionados 250 µL do extrato cetônico de fenólicos, 2710 µL de água destilada e 120 µL da solução de NaNO₂ 0,5 mol/L. Após 5 minutos de reação, acrescentou-se 120 µL da solução AlCl₃·6H₂O 0,3 mol/L e a solução foi homogeneizada com vórtex. Após mais 5 minutos, foram adicionados 800 µL da solução NaOH 1 mol/L. A absorbância foi medida em 510 nm em espectrofotômetro de UV-visível (UV 160, Shimadzu, Japan), contra um branco de reagentes. Os resultados foram expressos em miligramas equivalentes de (+)-catequina por grama de amostra em base seca (mg EC/g) utilizando a curva de calibração de (+)-catequina, numa faixa de concentração de 0 a 96 mg/L.

4.6.6. Quantificação de antocianinas monoméricas totais (AMT)

O teor de AMT foi determinado colorimetricamente, de acordo com o método proposto por Abdel-Aal e Hucl (1999), com pequenas modificações. Após a extração, a absorbância foi medida utilizando o espectrofotômetro de UV-visível (UV 160, Shimadzu, Japan) no comprimento de onda de 535 nm. A fórmula para o cálculo do teor de antocianinas (AMT), expresso em miligramas equivalentes de

cianidina-3-glicosídeo (antocianina mais abundante em soja preta (CHOUNG *et al.*, 2001)) por grama de amostra em base seca (mg CyE/g), é:

$$AMT = \frac{A_{535 \text{ nm}} \times MM \times V}{\epsilon \times l \times m}$$

Sendo:

$A_{535 \text{ nm}}$ = absorbância a 535 nm;

MM = massa molar de cianidina-3-glucosídeo (449 g/mol);

V = volume total (50 mL);

ϵ = coeficiente de extinção molar de cianidina-3-glicosídeo a 535 nm (25965 L.mol⁻¹.cm⁻¹);

l = distância percorrida pela luz (1 cm);

m = massa inicial da amostra, em base seca (g).

4.7. Análise qualitativa das antocianinas por HPLC–DAD–MS/MS

4.7.1. Preparo do extrato

As antocianinas foram extraídas a partir de 5,0 g de soja seca moída homogeneizada, utilizando 100 mL de solução metanólica com 1% de HCl e permanecendo em repouso sob refrigeração por 16 h (DEGENHARDT *et al.*, 2000). O extrato foi filtrado à vácuo e uma nova extração com 50 mL de solução metanólica com 1% de HCl foi realizada durante 4 h sob refrigeração. Os extratos filtrados foram combinados e concentrados em evaporador rotativo (Büchi, Alemanha) a 30 °C.

O extrato concentrado foi centrifugado a 429 x g (Beckman Coulter, EUA) a 5 °C por 10 min. O precipitado foi descartado e uma alíquota de 15 g do sobrenadante foi diluída com 55 mL de solução aquosa 10% de ácido fórmico. O extrato diluído foi então particionado três vezes com 150 mL de acetato de etila em um funil de separação e a fase aquosa foi recolhida. Para retirada principalmente de açúcares, o extrato diluído foi aplicado em coluna aberta de 25 x 3 cm empacotada

com resina Amberlite-XAD 7 (Sigma-Aldrich, Alemanha), seguido de lavagem com 1 L de água deionizada. A eluição das antocianinas foi realizada com 500 mL de solução de metanol/ácido acético (19:1, v/v) (DEGENHARDT *et al.*, 2000). O eluato foi concentrado em evaporador rotativo e armazenado sob atmosfera de nitrogênio a -35 °C até a análise por HPLC-DAD-MS/MS.

4.7.2. Separação e identificação por HPLC-DAD-MS/MS

A análise por HPLC-DAD-MS/MS foi realizada em um cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a um detector de arranjo de diodos (modelo LC-20AD, Shimadzu, Japão) e ao espectrômetro de massas equipado com analisador de massa/carga *ion trap* (Bruker Daltonics, modelo Esquire 4000, Alemanha). A separação foi realizada em uma coluna C₁₈ Shim-pack CLC-ODS (5 µm, 250 mm x 4,6 mm) (Shimadzu) utilizando como fase móvel um gradiente linear de água/metanol, ambos acrescidos de 5% de ácido fórmico, de 90:10 para 60:40 em 20 min, seguindo para 20:80 em 15 min e mantendo esta proporção por mais 5 min. O fluxo foi de 0,9 mL/min e a temperatura da coluna foi ajustada para 29 °C (FARIA *et al.*, 2011). Após a passagem pelo detector DAD, o fluxo foi dividido de forma que apenas 0,15 mL/min entrassem na fonte de ionização. A ionização foi realizada por *electrospray* (ESI) no modo positivo e os parâmetros foram ajustados em: voltagem no capilar de 2,5 kV; voltagem de saída no capilar de 95,2 kV; energia de fragmentação de 1,2 V; temperatura do gás secante (N₂) foi de 350 °C, com fluxo de 8 L/min; nebulizador a 30 psi; *end plate offset* -500 V. Os espectros de massas foram adquiridos na faixa de valores de *m/z* entre 100 e 1000 e o MS/MS foi adquirido no modo automático com energia de fragmentação MS/MS de 1,2 V.

A identificação das antocianinas foi realizada com base na combinação dos seguintes parâmetros: ordem de eluição em coluna de fase reversa e características dos espectros de UV-vis e de massas em comparação com dados disponíveis na literatura (WU *et al.* 2003; CHEN *et al.*, 2005; LUTHRIA *et al.*, 2007; COLLISON, 2008; LEE *et al.*, 2009; VALLS *et al.*, 2009; CALIGIANI *et al.*, 2010; YERRAMSETTY *et al.*, 2011).

4.8. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos extratos de compostos fenólicos totais (4.6.3) foi medida pelos métodos de DPPH[·] e ORAC devido à diferença entre seus mecanismos de reação.

4.8.1. Método de sequestro do radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH[·])

A análise pelo método de DPPH[·] foi feita em microplaca de poliestireno transparente e fundo chato contendo 96 poços, cada um com a capacidade de 300 µL. Foram pipetadas alíquotas de 50 µL de extrato de fenólicos totais de soja em cada cavidade e foram adicionados, imediatamente antes da primeira leitura de absorbância no fluorímetro, 150 µL de solução metanólica de DPPH[·] (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) 7x10⁻⁵M. O branco da reação era constituído de 50 µL de acetona/água/ácido acético (70:29,5:0,5, v/v/v).

A cinética da redução do radical DPPH[·] foi monitorada pela absorbância a 517 nm em leitor de placas (Synergy HT, Bio Tek Instruments, Inc., USA) a cada minuto, até a absorbância permanecer constante, após 60 min. A partir dos valores de absorbância nos tempos de 0 e 60 min, foram determinados os percentuais de DPPH remanescentes (% DPPH_{REM}), segundo a equação:

$$\% \text{ DPPH}_{\text{REM}} = (\text{Abs}_{\text{T=t}} / \text{Abs}_{\text{controle}}) \times 100$$

Sendo:

$\text{Abs}_{\text{T=t}}$ = média das absorbâncias das amostras após 60 minutos de reação

$\text{Abs}_{\text{controle}}$ = média das absorbâncias do controle

A atividade antioxidante foi calculada a partir da curva de calibração determinada por regressão linear com concentrações de Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico, Sigma Aldrich, St. Louis, MO) variando de 0 a 100 µM. Os resultados foram expressos em µmoles equivalentes de Trolox por grama (µmoles eq. Trolox/g) de amostra em base seca.

4.8.2. Método ORAC (*oxygen radical absorbance capacity*)

A análise pelo método ORAC foi feita em microplaca de poliestireno preta de fundo chato e transparente contendo 96 poços, cada um com a capacidade de 300 µL. Em cada cavidade foram pipetadas alíquotas de extratos de fenólicos totais de soja diluídas em tampão fosfato pH 7,4 (1:30 para amostras de soja amarela e 1:50 para amostras de soja preta). Esses extratos foram homogeneizadas com 150 µL de fluoresceína (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) 40×10^{-9} M e adicionadas de 25 µL de AAPH (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) 0,15 M após 30 minutos de reação. A temperatura do meio foi mantida em 37 °C e o emprego de tampão fosfato manteve o pH em 7,4, simulando condições fisiológicas (OU *et al.*, 2001; HUANG *et al.* 2005; PRIOR *et al.*, 2005).

O decaimento da fluorescência foi monitorado a cada minuto durante uma hora, utilizando-se um comprimento de excitação em 493 nm (filtro 485/20) e emissão em 515 nm (filtro 528/20) no leitor de microplacas (Synergy HT, Bio Tek Instruments, Inc., USA).

O cálculo da atividade antioxidante foi feito a partir da área sob a curva de decaimento (NetAUC) do branco e da amostra, em relação a uma curva padrão de Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico, Sigma Aldrich, St. Louis, MO) com concentrações variando de 0 a 100 µM. A atividade antioxidante foi expressa em µmoles de equivalentes de Trolox por grama (µmoles eq. Trolox/g) de soja em base seca.

4.9. Análise estatística

Os dados foram avaliados estatisticamente, usando o software STATISTICA (versão 7.0), a um nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Todos os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão e testados quanto à distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk) e à homogeneidade das variâncias (testes de Levene e Brown-Forsythe).

Para avaliação dos resultados entre soja preta e amarela foi aplicado o teste t-Student para amostras independentes ou, caso o conjunto de dados exigissem tratamento estatístico não-paramétrico, pelo teste de Mann-Whitney. Para avaliar o efeito do processo de cozimento na soja foi utilizado o teste t-Student para amostras dependentes ou, caso o conjunto de dados exigissem tratamento estatístico não-paramétrico, pelo teste de Wilcoxon.

O teste de Spearman foi empregado para determinar o coeficiente de correlação entre os compostos fenólicos e a atividade antioxidante, devido ao $n < 30$ (LIRA, 2004). Neste teste são avaliados os parâmetros de intensidade da associação entre as duas variáveis envolvidas (variando de 0 a 1, sendo 1 indicativo de correlação máxima) e de natureza (positivo ou negativo, indicando a proporcionalidade direta ou inversa) da correlação. Se o coeficiente de correlação (r) apresentar um valor absoluto entre 0,9 e 1,0 a correlação é muito forte, entre 0,6 e 0,9 a correlação é forte, entre 0,3 e 0,6 a correlação é regular e entre 0,0 e 0,3 a correlação é fraca (RODRIGUES & IEMMA, 2005).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Características físicas

As nove amostras de soja madura foram avaliadas quanto as suas características físicas. Analisou-se a massa de 100 grãos, as dimensões do grão, a capacidade de hidratação, bem como o tempo de cozimento.

As massas de 100 grãos variaram entre 18,57 g e 21,43 g (**Tabela 2**) e não foi encontrada diferença significativa entre a soja preta e amarela. Ainda que não tenham sido encontrados trabalhos com soja preta no Brasil, um estudo com 20 variedades de soja preta da Índia descreveu massas de 100 grãos de 6,96 a 19,50 g (SAHA *et al.*, 2008).

Tabela 2. Massa de 100 grãos.

Genótipos	g
NT 2	20,30 ± 0,04
NT 4	20,07 ± 0,15
NT 10	19,91 ± 0,08
NT 12	21,43 ± 0,21
NT 14	19,81 ± 0,19
NT 3001	18,61 ± 0,20
TF 99 1405	21,12 ± 0,41
NT 7001	21,12 ± 0,28
NT 7002	18,57 ± 0,22
Soja	
Amarela ¹	20,18 ^a ± 0,89
Preta ²	19,84 ^a ± 1,42

Média das análises em triplicata; resultados expressos como média ± desvio padrão

¹ Média dos resultados das amostras NT 4 e NT 12

² Média dos resultados das amostras NT 7001 e NT 7002

Médias com a mesma letra na coluna não têm diferença significativa (p<0,05) pelo teste de Mann Whitney.

Quanto à soja amarela, os resultados obtidos são condizentes com Menezes *et al.* (1997) que encontraram massas entre 13,2 e 22,9 g para 22 variedades de soja amarela cultivadas no Rio Grande do Sul. Com exceção do genótipo NT 3001 (genótipo isento de lipoxigenases), nossos valores são superiores

à faixa de variação relatada por Cavarani *et al.* (2009) após avaliarem quatro variedades de soja amarela, cultivadas em diferentes locais do Paraná e em São Paulo. Esses autores descreveram massas de 100 grãos entre 12,32 e 19,75 g, dependendo da variedade e da região de plantio.

Paucar-Menacho *et al.* (2010) também avaliaram duas variedades de soja amarela, cultivadas no Paraná. Uma cultivar apresentou massa similar (22,7 g) à encontrada por nós, enquanto a outra, que possuía menor teor proteico, apresentava massa muito reduzida (12,9 g). Nota-se que esses resultados da literatura apresentam variações mais acentuadas que as observadas neste trabalho. Além das características de cada genótipo, acredita-se que as mesmas condições de cultivo podem ter sido decisivo para a maior homogeneidade de resultados.

Para a análise de dimensões do grão foram tomadas três medidas: espessura, comprimento e largura (**Figura 16**). Foi calculado ainda o volume do grão a partir dessas medidas e assumindo seu formato elipsoidal ($V = \frac{4}{3} \times \pi \times r_1 \times r_2 \times r_3$).

Figura 16. Dimensões e volume do grão de soja (n = 10, por genótipo).

Neste caso, também não foi encontrado diferença significativa entre a soja preta e a amarela. O mesmo trabalho com 20 variedades de soja preta da Índia apresentou dimensões do grão próximo aos nossos, com comprimentos de 6,73 a

8,52 mm e larguras entre 5,04 e 6,87 mm (SAHA *et al.*, 2008). Para a soja preta, os nossos resultados variaram de 6,97 a 8,52 mm de comprimento e de 4,65 a 6,59 mm de largura.

As dimensões da soja amarela foram de 6,96 a 8,51 mm de comprimento, 6,31 a 7,63 mm de espessura e 5,18 a 6,86 mm de largura. A soja amarela do Rio Grande do Sul também apresentou variações semelhantes, com o comprimento entre 7,10 e 8,64 mm, a espessura entre 6,00 e 7,53 mm e a largura entre 4,70 e 6,49 mm (MENEZES *et al.*, 1997).

Observou-se ainda, como era de se esperar, a relação direta entre as dimensões do grão e a massa de 100 grãos, pois os genótipos com menor massa, abaixo de 20 g, também apresentaram as menores dimensões.

A capacidade de hidratação dos grãos (**Tabela 3**), ou seja, a massa de água absorvida por grão, variou de 0,245 a 0,275 g água/grão. O valor médio de intumescimento da soja preta foi igual ao valor médio da soja amarela, de modo que a coloração do grão não interferiu com a absorção de água, embora tenham sido avaliados apenas dois genótipos de soja preta. É interessante notar a massa de água absorvida é superior à massa do próprio grão de soja maduro.

Tabela 3. Capacidade de hidratação.

Genótipos	g água/grão
NT 2	0,275 ± 0,006
NT 4	0,266 ± 0,003
NT 10	0,247 ± 0,005
NT 12	0,262 ± 0,005
NT 14	0,255 ± 0,005
NT 3001	0,245 ± 0,001
TF 99 1405	0,250 ± 0,004
NT 7001	0,259 ± 0,002
NT 7002	0,250 ± 0,002
Soja	
Amarela ¹	0,257 ^a ± 0,011
Preta ²	0,255 ^a ± 0,005

Média das análises em triplicata; resultados expressos como média ± desvio padrão

¹ Média dos resultados das amostras NT 4 e NT 12

² Média dos resultados das amostras NT 7001 e NT 7002

Médias com a mesma letra na coluna não têm diferença significativa (p<0,05) pelo teste t-Student.

Utilizando o mesmo procedimento para determinação da capacidade de hidratação do grão, Saha *et al.* (2008) obtiveram resultados variando entre 0,084 e 0,226 g água/grão de soja preta. Considerando a amplitude da faixa de variação de massa desses grãos de soja da Índia, conforme mencionado anteriormente, era de se esperar que os valores de capacidade de hidratação fossem diretamente proporcionais.

Alguns autores também expressam esses resultados em termos de índice de hidratação, que seria o equivalente a dividir a capacidade de hidratação pela massa do grão, facilitando a comparação através de um valor adimensional. Dessa maneira, nossos resultados teriam índices de hidratação entre 1,18 e 1,36, enquanto os de Saha *et al.* (2008) variaram de 0,82 a 1,26.

Cavariani *et al.* (2009) deixaram os grãos de soja amarela imersos por apenas 8 h ao invés de 12 h, como feito em nossa metodologia, e utilizaram uma proporção entre a massa de grãos e volume de água de 0,20 m/v, diferentemente da nossa que foi de 0,25 m/v. Ainda assim, os seus índices de hidratação foram próximos aos nossos com valores de 1,06 a 1,24, indicando que o grão atinge quase a sua capacidade máxima de absorção de água após 8h de imersão.

Utilizando o cozedor de Mattson, determinou-se um tempo médio de cozimento de 200 minutos, para que os grãos atingissem textura adequada, e não foi encontrada diferença significativa entre o tempo de cozimento para soja preta e amarela. Vieira *et al.* (1997) descreveram um tempo de cozimento variando entre 155 e 219 minutos para seis amostras de soja amarela cultivadas no Brasil e analisadas nas mesmas condições. É importante notar que esses grãos são habitualmente cozidos sob pressão e, por isso, o tempo de cozimento empregando o cozedor de Mattson é maior que o usual.

Características físicas, como a espessura da casca e a capacidade de hidratação, assim como tempo de armazenamento podem influir no tempo de cozimento (WANG *et al.*, 2003). Yeung *et al.* (2009) estudaram feijão de corda com tegumentos de coloração diferentes e também não encontraram correlação entre o tempo de cozimento com a cor nem com a massa do grão cru.

Assim como não foi encontrada diferença significativa entre soja preta e amarela para nenhum atributo físico avaliado, também não foi encontrada correlação significativa entre as características físicas, pelo teste de Spearman, com exceção da massa de 100 grãos e o volume do grão ($r = 0,83$; $p < 0,05$).

5.2. Composição centesimal

Os teores de umidade, resíduo mineral e de proteína dos nove genótipos estão apresentados na **Tabela 4**.

Tabela 4. Teores de umidade, resíduo mineral e proteínas.

Genótipo	Umidade	Resíduo Mineral*	Proteína* (Nx6,25)
		g/100g	
NT 2	8,93 ± 0,03	5,07 ± 0,22	41,52 ± 0,64
NT 4	9,14 ± 0,18	5,19 ± 0,03	42,30 ± 0,23
NT 10	9,02 ± 0,12	5,02 ± 0,01	44,09 ± 0,09
NT 12	9,53 ± 0,07	5,08 ± 0,07	44,71 ± 0,69
NT 14	9,15 ± 0,18	4,75 ± 0,03	43,49 ± 0,35
NT 3001	9,31 ± 0,12	5,39 ± 0,01	43,24 ± 0,72
TF 99 1405	9,70 ± 0,05	4,76 ± 0,02	45,50 ± 0,18
NT 7001	8,56 ± 0,03	4,51 ± 0,02	40,72 ± 0,99
NT 7002	9,32 ± 0,08	5,40 ± 0,02	39,85 ± 0,20
Soja			
Amarela ¹	9,33 ^a ± 0,21	5,14 ^a ± 0,08	43,51 ^a ± 1,40
Preta ²	8,94 ^a ± 0,42	4,95 ^a ± 0,49	40,28 ^b ± 0,81

*em base seca.

Média das análises em triplicata; resultados expressos como média ± desvio padrão

¹ Média dos resultados das amostras NT 4 e NT 12

² Média dos resultados das amostras NT 7001 e NT 7002

Médias com diferentes letras na coluna têm diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Mann Whitney.

A umidade variou entre 8,56 e 9,70 g/100g, indicando que as amostras podem ser armazenadas sem risco de crescimento de microrganismos, por apresentarem umidade abaixo de 13%. A determinação correta da umidade é importante para expressar adequadamente a composição química em base seca. Alguns pesquisadores (KAMIZAKE *et al.*, 2006) podem comprometer os seus resultados por não medirem a perda de água até peso constante da amostra, possivelmente subestimando o teor de umidade presente na soja.

Os teores de resíduo mineral, em base seca, variaram de 4,51 a 5,40 g/100g, não havendo diferenças significativas da soja preta em relação à amarela. Os maiores teores de resíduo mineral foram encontrados nos genótipos NT 7002 (soja preta) e NT 3001 (soja amarela, isenta de lipoxigenases), os mesmos que haviam apresentado menor massa de 100 grãos. Paucar-Menacho *et al.* (2010) também encontraram maior resíduo mineral na cultivar de soja com menor massa. Pelo teste de Spearman verificou-se uma correlação forte com proporcionalidade inversa ($r = -0,62$; $p < 0,05$) entre os resultados de resíduo mineral e de massa de 100 grãos. No entanto, como a composição centesimal varia muito de acordo com as condições ambientais do plantio, não é possível determinar se essa correlação se manteria com um maior número de amostras.

Pesquisas com soja proveniente de Taiwan apresentaram teores de resíduo mineral de 4,72 a 5,72 g/100g, em base seca, de soja preta (SHIH *et al.*, 2002; LIN & LAI, 2006; CHANG *et al.*, 2011) e de 5,41 a 5,83 g/100g de soja amarela (LIN & LAI, 2006). Saha *et al.* (2008) observaram uma maior variação de resíduo mineral, entre 3,93 e 6,15 g/100g, em 20 variedades de soja preta cultivadas na Índia.

Não foram encontrados trabalhos com soja preta no Brasil. A soja amarela cultivada no país apresenta teores de resíduo mineral entre 4,83 e 5,57 g/100g (VIEIRA *et al.*, 1999; JIMENEZ-ESCRIG *et al.*, 2010; PAUCAR-MENACHO *et al.*, 2010). Esses resultados foram semelhantes às amostras de soja amarela que analisamos, cujos teores variaram de 4,75 a 5,39 g/100g, em base seca.

A soja preta e a amarela apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) apenas em relação ao teor proteico. O valor médio foi de 40,28 g/100g em soja preta e de 43,51 g/100g em soja amarela, em base seca. Para o cálculo total de proteínas

utilizamos o fator de conversão 6,25, conforme indicado pela ANVISA e no método 984.13 da AOAC (1995). No entanto, foi observado que alguns artigos utilizam o fator de conversão de 5,71 e outros não explicitam o fator aplicado. Essa variável pode afetar tanto o resultado de proteínas, como consequentemente o cálculo de carboidratos por diferença, como será descrito mais adiante.

Dentre os artigos que avaliaram soja preta, Chang *et al.* (2011) foram os únicos a descrever o fator de conversão utilizado de 6,25. Esses autores encontraram 38,56 g/100g de proteína, porém não explicitaram se esse teor está em base seca ou úmida, o que dificulta a sua comparação com os nossos resultados. Um trabalho com 20 variedades de soja preta utilizou o fator de 5,7 para o cálculo do teor proteico obtendo uma média de 34,40 g/100g (SAHA *et al.*, 2008), porém também não descrevem em que base esse valor é expresso.

Outros autores expressaram, em base seca, os teores de proteína da soja preta, variando entre 38,79 e 45,70 g/100g, porém sem citar o fator de conversão (SHIH *et al.*, 2002; LIN & LAI, 2006). Contudo, os resultados de soja preta deste trabalho estão dentro dessa faixa de variação.

Diferentemente do nosso trabalho, Lin e Lai (2006) não encontraram diferença significativa ($p < 0,05$) entre os teores de proteína da soja preta em relação à soja amarela. As seis variedades de soja amarela, de Taiwan, estudadas por eles apresentaram teores entre 36,48 e 44,57 g/100g, em base seca, semelhante à quantidade de proteína ($N \times 5,71$) determinada em dez cultivares de soja amarela da região Sul e Sudeste do Brasil, que variaram de 37,36 a 42,29 g/100g, em base seca (VIEIRA *et al.*, 1999; JIMENEZ-ESCRIG *et al.*, 2010; PAUCAR-MENACHO *et al.*, 2010).

Como na literatura o conteúdo proteico da soja preta não parece diferir da soja amarela, seria interessante avaliar uma amostragem maior de genótipos de soja preta para confirmar a diferença estatística encontrada em nosso trabalho.

Devido à semelhança entre os genótipos de soja amarela em relação às características físico-químicas, teores de minerais e de proteínas foram selecionados dois genótipos amarelos (NT 4 e NT 12) e os dois genótipos de soja

preta para os experimentos subsequentes. Os genótipos amarelos correspondem a materiais de maior volume de comercialização.

Os teores de lipídeos, em base seca, obtidos por extração em Soxhlet variaram entre 22,01 e 25,43 g/100g e os valores médios para a soja preta e a amarela não apresentaram diferença significativa entre si (**Tabela 5**).

Tabela 5. Teores de lipídeos, em base seca.

Genótipos	Lipídeos
	g/100g
NT 4	23,93 ± 0,25
NT 12	22,01 ± 0,14
NT 7001	25,43 ± 0,32
NT 7002	23,37 ± 0,21
Soja	
Amarela ¹	22,97 ^a ± 1,07
Preta ²	24,40 ^a ± 1,16

Média das análises em triplicata; resultados expressos como média ± desvio padrão

¹ Média dos resultados das amostras NT 4 e NT 12

² Média dos resultados das amostras NT 7001 e NT 7002

Médias com a mesma letra na coluna não têm diferença significativa (p<0,05) pelo teste t-Student.

A literatura também sugere não haver diferenças entre os teores de lipídeos de soja preta e amarela (LIN & LAI, 2006). Resultados semelhantes aos nossos, foram descritos em um estudo com soja preta de Taiwan, cujo teor médio de lipídeos foi de 21,52 g/100g, em base seca (SHIH *et al.*, 2002). Ao avaliar soja preta desse mesmo país, Chang *et al.* (2011) encontraram 17,52 g/100g de lipídeos, porém, como exposto anteriormente, não descrevem se esse resultado está expresso em base seca ou úmida. A mesma dificuldade ocorre ao comparar os dados de Saha *et al.* (2008) que analisaram 20 amostras de soja preta da Índia e relataram conteúdo lipídico entre 10,8 e 19,6 g/100g.

Quanto à soja amarela, os teores de lipídeos relatados na literatura indicam valores próximos aos encontrados neste trabalho. Estudos com soja amarela cultivada no Brasil apresentaram um conteúdo médio de 22,52 g/100g, em base

seca (VIEIRA *et al.*, 1999; JIMENEZ-ESCRIG *et al.*, 2010; PAUCAR-MENACHO *et al.*, 2010). Esses resultados estão próximos a composição apresentadas em tabela de composição de alimentos compilada por Souci *et al.* (2007) que descreveram um valor médio de 22,1 g/100g para lipídeos em soja amarela.

A fibra da soja, tanto preta como amarela, é predominantemente do tipo insolúvel que variou entre 20,60 e 24,83 g/100g, enquanto a fibra solúvel variou entre 8,53 g/100g e 11,99 g/100g (**Tabela 6**). Assim, em termos percentuais, a fibra insolúvel é majoritária e corresponde de 65 a 75% da fibra total. Não houve diferença significativa entre a soja preta e amarela quanto à fibra insolúvel e total.

Tabela 6. Teores de fibra, em base seca.

	Fibra Insolúvel	Fibra Solúvel	Fibra Total
Genótipos	g/100g		
NT 4	24,83 ± 0,94	9,25 ± 0,84	34,08 ± 0,90
NT 12	20,60 ± 0,78	8,53 ± 0,19	29,12 ± 0,65
NT 7001	21,97 ± 1,31	10,05 ± 0,28	32,02 ± 1,39
NT 7002	23,16 ± 1,06	11,99 ± 0,51	35,15 ± 1,02
Soja			
Amarela ¹	22,71 ^a ± 2,40	8,89 ^b ± 0,68	31,60 ^a ± 2,75
Preta ²	22,56 ^a ± 1,27	11,02 ^a ± 1,10	33,58 ^a ± 2,02

Média das análises em triplicata; resultados expressos como média ± desvio padrão

¹ Média dos resultados das amostras NT 4 e NT 12

² Média dos resultados das amostras NT 7001 e NT 7002

Médias com diferentes letras na coluna têm diferença significativa (p<0,05) pelo teste de Mann Whitney.

Outros autores também não encontraram diferença significativa entre soja preta e amarela nos teores de fibra total e de suas frações, solúveis e insolúveis (LIN & LAI, 2006). O conteúdo de fibra total descrito nesse trabalho foi em média de 25,59 g/100g, com valor máximo de 30,31 g/100g em soja preta, em base seca. Os teores da fração insolúvel foram próximos aos nossos, com média de 22,90 g/100g, em base seca. Já a fração solúvel apresentou resultados inferiores, variando de 1,14 a 3,99 g/100g.

A Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (USP, 2008) também apresenta conteúdo semelhante de fibra insolúvel (21,60 g/100g) e um valor reduzido de fibra solúvel (2,34 g/100g) em farinha de soja amarela. Outros trabalhos descrevem teores similares, com média de 26,25 g/100g de fibra insolúvel e 2,85 g/100g de fibra solúvel em soja amarela (PAUCAR-MENACHO *et al.*, 2010; PISARIKOVA & ZRALY, 2010).

Devido ao teor possivelmente superestimado de fibra solúvel ou de outros erros analíticos acumulados, observou-se que os teores de fibra total foram maiores que os carboidratos totais calculados por diferença. Ainda que a maior parte dos carboidratos da soja seja composta por fibras (LIU, 2004a), esperava-se encontrar um valor significativo, entre 5 e 10% de carboidratos disponíveis (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Verificou-se que os teores de resíduo mineral, proteínas e lipídeos descritos na literatura para soja preta e amarela são relativamente próximos entre si (JIMENEZ-ESCRIG, *et al.*, 2010; PAUCAR-MENACHO *et al.*, 2010; REDONDO-CUENCA *et al.*, 2006; LIN & LAI, 2006), enquanto os teores de fibra apresentam variação de até 40%. Consequentemente, o conteúdo dos carboidratos calculados por diferença também apresentou grande variação, conforme pode ser visualizado na **Figura 17**.

Figura 17. Composição centesimal de soja, em base seca.

A composição centesimal das amostras analisadas está dentro das variações descritas nas tabelas de composição de alimentos, 38,22 a 44,85 g/100g de proteínas, 15,50 a 24,47 g/100g de lipídeos e 24,48 a 40,87 g/100g de carboidratos (UNICAMP, 2006; USDA, 2006; USP, 2008). Apenas a faixa descrita para resíduo mineral de 5,32 a 6,20 g/100g é superior aos resultados encontrados (**Tabela 7**).

Tabela 7. Comparação da composição centesimal de soja, em base seca.

	Soja amarela¹	Soja preta²	USP³ (grão)	USDA (grão)	Unicamp (farinha)
	(g/100g, b.s.)		Tabelas de composição (g/100g, b.s.)		
Resíduo mineral	5,14 ^a ± 0,08	4,95 ^a ± 0,49	6,20	5,32	5,41
Proteínas	43,51 ^a ± 1,40	40,28 ^b ± 0,81	44,85	39,90	38,22
Lipídeos	22,97 ^a ± 1,07	24,40 ^a ± 1,16	24,47	21,80	15,50
Carboidratos totais ³	28,39	30,36	24,48	32,98	40,87

Análises em triplicata, por genótipo; resultados expressos como média ± desvio padrão

¹ Média dos resultados das amostras NT 4 e NT 12

² Média dos resultados das amostras NT 7001 e NT 7002

³ Calculado por diferença

Médias com diferentes letras na linha têm diferença significativa (p<0,05) pelo teste t-Student, para amostras independentes (para lipídeos), ou de Mann Whitney (para resíduo mineral e proteínas).

Diversos estudos (KARR-LILIENTHAL *et al.*, 2004; ÁVILA *et al.*, 2007; MERTZ *et al.*, 2009; BARION *et al.*, 2010; FERREIRA & RAO, 2010; STOLF-MOREIRA *et al.*, 2010; ARSLANOGLU *et al.*, 2011) indicam que variações na composição do grão de soja são devidos a fatores ambientais como safra, clima e local de cultivo. Por isso, é possível que a reduzida variação dos resultados da composição química entre os genótipos de soja avaliados neste trabalho tenha sido devido às amostras serem provenientes de uma mesma safra e região de plantio.

Dessa maneira, pode-se concluir que a soja preta apresenta a mesma qualidade nutricional que a soja amarela, não sendo possível diferenciá-las em relação à composição de macronutrientes.

5.3. Análise de ácidos graxos

As frações lipídicas das amostras de soja preta e amarela apresentaram como ácidos graxos principais, o ácido linoléico (54-57%), oléico (20-21%), palmítico (11-13%), linolênico (6-7%) e esteárico (4-5%). Os ácidos graxos minoritários foram os ácidos mirístico, palmitoléico, araquídico, eicosenóico, behênico e Lignocérico.

A soja preta apresentou maiores teores de ácidos linoléico e araquídico e menor teor de ácido mirístico que a soja amarela (p<0,05) (**Tabela 8**). No entanto, como os ácidos araquídico e mirístico são minoritários, essa diferença não parece

ser relevante. O ácido linoléico, que compõe mais de 50% do óleo de soja, apresentou uma massa 3,3% maior (1,29 g/100g) na soja preta que na amarela. Contudo, seria necessário avaliar um número maior de amostras para verificar se essa diferença estatística se mantém.

Esses resultados estão próximos aos encontrados no Brasil para duas variedades de soja amarela (PAUCAR-MENACHO *et al.*, 2010) e para óleo de soja comercial (RIBEIRO *et al.*, 2009). A Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (USP, 2008) também apresenta dados sobre o óleo de soja, incluindo os teores de ácidos graxos saturados totais (16,40 g/100g), de monoinsaturados totais (23,50 g/100g) e de poliinsaturados totais (59,26 g/100g), todos expressos em base seca. Esses valores também são semelhantes aos que obtivemos para soja preta e amarela.

Avaliando o perfil de ácidos graxos em soja amarela, Paucar-Menacho *et al.* (2010) relataram uma relação direta entre o teor de proteínas e o ácido oléico e inversa com os ácidos esteárico, linolênico e docosaenóico. Entretanto, apesar da soja amarela tenha apresentado maior teor proteico, não foram verificadas diferenças significativas no conteúdo desses ácidos graxos. Foi encontrada apenas uma correlação forte e inversa entre o teor de proteínas e o teor de ácido linoléico ($r = -0,78$; $p < 0,05$), pelo teste de Spearman.

Nos artigos que descrevem o perfil de ácidos graxos em soja preta (SLAVIN *et al.*, 2009b; WHENT *et al.*, 2011; LEE & CHO, 2012) foram analisados apenas os compostos majoritários (**Figura 18**). A diferença significativa de ácido linoléico em soja preta encontrada em nossa pesquisa, não foi comprovada por esses autores.

Whent *et al.* (2011) avaliaram três variedades de soja preta e 35 de soja amarela, todas cultivadas em Maryland, EUA, e não encontraram diferenças significativas para nenhum dos ácidos graxos. Por outro lado, ao analisar cinco cultivares de soja preta e sete de soja amarela, plantadas no mesmo estado americano, Slavin *et al.* (2009b) verificaram maior teor de ácido palmítico e α -linolênico em soja preta e maior teor de ácido oléico em soja amarela. Todos esses resultados reforçam a teoria de que as condições ambientais e de cultivo influenciam o conteúdo de ácidos graxos.

Outro fator que pode alterar o teor de ácidos graxos é o tempo de armazenamento dos grãos de soja. Lee e Cho (2012) encontraram um aumento no teor de ácido oléico após dois anos de armazenamento de grãos de soja amarela, ao mesmo tempo que observaram uma redução no teor dos ácidos palmítico, esteárico, linoléico e linolênico. Durante o armazenamento, ocorrem processos de oxidação que causam a degradação de ácidos poliinsaturados, como dos ácidos linoléico e linolênico, os quais podem contribuir para o aumento do teor de ácido oléico.

Tabela 8. Perfil de ácidos graxos na soja.

	Soja amarela ¹	Soja preta ²	Soja amarela (Paukar-Menacho et al., 2010)	Óleo de soja (Ribeiro et al., 2009)
Ácido Graxo	g/100g			
14:0 - Mirístico	0,15 ^a ± 0,05	0,08 ^b ± 0,04	0,09	0,08
16:0 - Palmítico	12,71 ± 1,36	11,06 ± 0,51	11,51	11,37
16:1 - Palmitoléico	0,43 ± 0,38	0,21 ± 0,22	0,09	0,08
18:0 - Esteárico	4,34 ± 0,76	4,59 ± 0,35	3,89	3,46
18:1 - Oléico	20,96 ± 1,10	20,35 ± 0,91	18,71	23,17
18:2 - Linoléico	53,66 ^b ± 1,58	56,92 ^a ± 2,46	56,19	54,87
18:3 - α -Linolênico	6,75 ± 0,18	5,69 ± 2,16	8,39	5,32
20:0 - Araquídico	0,35 ^b ± 0,02	0,40 ^a ± 0,01	0,38	0,38
20:1 - Eicosenóico	0,08 ± 0,09	0,13 ± 0,05	0,16	0,24
22:0 - Behênico	0,40 ± 0,03	0,40 ± 0,01	0,45	0,51
24:0 - Lignocérico	0,17 ± 0,02	0,17 ± 0,02	0,16	0,18
Saturados totais	18,11	16,70	16,46	15,98
Insaturados totais	81,89	83,30	83,54	84,02
Monoinsaturados totais	21,51	20,76	18,96	23,49
Poliinsaturados totais	60,38	62,54	64,58	60,53

Análises em triplicata, por genótipo; resultados expressos como média ± desvio padrão

¹ Média dos resultados das amostras NT 4 e NT 12

² Média dos resultados das amostras NT 7001 e NT 7002

Médias com diferentes letras nas linhas têm diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Mann Whitney.

Figura 18. Perfil de ácidos graxos majoritários na soja, por coloração de tegumento.

5.4. Análise de compostos fenólicos

5.4.1. Comparação de solventes e de metodologias para a extração de compostos fenólicos

Foram avaliadas comparativamente a eficiência dos solventes metanol:água:HCl 0,1M (80:15:5) (DUENAS *et al.*, 2006), etanol:água:HCl 0,1M (80:15:5) (PENALVO *et al.*, 2004), e acetona:água:ácido acético (70:29,5:0,5) (XU & CHANG, 2007a) para a extração de compostos fenólicos totais, flavonóides e antocianinas monoméricas totais. Dentre esses solventes, o extrato cetônico foi o mais límpido resultando em leituras mais exatas. Inclusive, na análise quantitativa de flavonóides, os extratos com metanol e etanol não reagem com alumínio, impossibilitando a leitura espectrofotométrica.

Xu e Chang (2007a), ao compararem diferentes soluções aquosas de metanol, etanol ou acetona, apontaram que a solução extratora mais eficiente para extrair compostos fenólicos e flavonóides em soja preta era acetona/água/ácido acético (70:29,5:0,5, v/v/v). Outros autores também empregaram esse solvente tanto para a soja (TAKAHATA *et al.*, 2001; MALENCIC *et al.*, 2008; KUMAR *et al.*, 2009; KUMAR *et al.*, 2010) como para frutas e vegetais (KAHKONEN *et al.*, 2001; TROSZYNSKA & CISKI, 2002; JING & GIUSTI, 2007; ACOSTA-MONTOYA *et al.*, 2010). Por isso, foi selecionada a mistura de acetona/água/ácido acético (70:29,5:0,5, v/v/v) como solução extratora para os compostos fenólicos totais.

Foi testada ainda a mistura etanol:HCl (85:15) para a extração de antocianinas monoméricas totais (FULEKI & FRANCIS, 1968), que foi mais eficiente que acetona:água:ácido acético (70:29,5:0,5).

Para a avaliação do melhor procedimento de extração de compostos fenólicos, flavonóides e antocianinas monoméricas totais da soja preta e amarela, foram comparados diversos procedimentos, como extração *overnight* em repouso ou com agitação (XU & CHANG, 2007a) e extração assistida por banho ultrassônico (KIM & LEE, 2002).

Observou-se que esta última metodologia foi a mais efetiva e apresentou a vantagem de reduzir do tempo de extração, evitando possível oxidação e degradação dos fenólicos. Esse procedimento de extração tem sido cada vez mais empregado (GHAFOOR *et al.*, 2009; HERRERA & LUQUE DE CASTRO, 2004) e alguns pesquisadores têm demonstrado a maior eficiência desse processo em comparação às metodologias que utilizam apenas o contato do solvente com a amostra com ou sem agitação (CHUNG *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2007). Ghafoor *et al.* (2009) definiram 30 minutos como o tempo ótimo para extração em ultrassom e Krenn *et al.* (2007) verificaram que a extração pode ser realizada a temperatura ambiente sem que ocorra a degradação dos compostos.

Para aperfeiçoar a metodologia de extração por banho ultrassônico, foram feitos experimentos de quantificação de antocianinas variando o número de extrações sucessivas. Para uma massa de 0,5 g de soja preta crua moída foram testadas: duas extrações sucessivas, cada uma com 20 mL de etanol:HCl (85:15), três extrações com 15 mL cada, quatro extrações com 10 mL e cinco extrações com 10 mL, nos quais os sobrenadantes foram combinados.

A absorbância dos extratos foi medida em espectrofotômetro de UV-visível (UV 160, Shimadzu, Japan), no comprimento de absorção máxima (535 nm), lida contra um branco da solução extratora. Verificou-se que quatro extrações de 10 mL de etanol:HCl (85:15) foi mais eficiente que apenas duas ou três extrações e equivalente ao método de cinco extrações (**Figura 19**).

Figura 19. Espectro de absorção de antocianinas monoméricas totais, variando o número de extrações sucessivas e o volume do meio extrator.

Diante desses resultados, foi adotada a extração em ultrassom com quatro repetições de 10 mL cada vez e o solvente utilizado para a extração de compostos fenólicos e flavonóides foi acetona:água:ácido acético (70:29,5:0,5), enquanto para a extração de antocianinas foi utilizado etanol:HCl (85:15). Todas as extrações foram realizadas em triplicata.

5.4.2. Determinação de teor de compostos fenólicos totais (CFT)

Em relação aos compostos fenólicos totais, a soja preta apresentou quantidade significativamente superior à soja amarela, antes e após o processo de cozimento. O teor de CFT em soja preta crua foi 68% maior do que na soja amarela, correspondendo a 4,78 mg EAG/g de soja preta e apenas 2,84 mg EAG/g de soja amarela. O cozimento reduziu esse teor em 47% para a soja preta e em 39% para a soja amarela. Ainda assim, a soja preta cozida manteve quase 50% a mais de CFT que a soja amarela (**Tabela 9**).

Tabela 9. Teor de compostos fenólicos totais, em base seca.

	Cru	Cozido
Genótipos	mg EAG/g	
NT 4	2,80 ± 0,06	1,70 ± 0,02
NT 12	2,88 ± 0,05	1,74 ± 0,05
NT 7001	4,63 ± 0,10	2,56 ± 0,05
NT 7002	4,93 ± 0,01	2,51 ± 0,01
Soja		
Amarela ¹	2,84 ^{b,A} ± 0,06	1,72 ^{b,B} ± 0,04
Preta ²	4,78 ^{a,A} ± 0,18	2,53 ^{a,B} ± 0,04

Média das análises em triplicata; resultados expressos como média ± desvio padrão

¹ Média dos resultados das amostras NT 4 e NT 12

² Média dos resultados das amostras NT 7001 e NT 7002

Médias com diferentes letras minúsculas na coluna têm diferença significativa (p<0,05) pelo teste de Mann Whitney.

Médias com diferentes letras maiúsculas na linha têm diferença significativa (p<0,05) pelo teste de Wilcoxon.

Um estudo comparativo dos CFT em soja preta e amarela crua apresentou resultados próximos aos deste trabalho, com teores médios de 4,9 mg EAG/g de soja preta e 3,5 mg EAG/g de soja amarela (WHENT *et al.*, 2011). Outras pesquisas com soja preta e amarela verificaram uma grande variação de CFT nas cultivares de soja. Foram encontrados teores de 0,81 a 12,10 mg EAG/g em soja preta e de 0,80

a 2,20 mg EAG/g em soja amarela (SLAVIN *et al.*, 2009b; KUMAR *et al.*, 2010; MALENCIC *et al.*, 2012).

Trabalhos específicos sobre soja preta crua relataram conteúdos de CFT entre 4,38 e 7,49 mg EAG/g em três cultivares de soja preta de Taiwan (JENG *et al.*, 2010), enquanto na China, 60 variedades de soja preta apresentaram teores de 0,51 a 6,06 mg EAG/g (ZHANG *et al.*, 2011).

Um estudo com soja amarela crua indicou teores de CFT entre 1,51 e 5,06 mg EAG/g em 11 cultivares de soja amarela provenientes da Índia e Bulgária (SAKTHIVELU *et al.*, 2008). Outro trabalho recente com soja amarela oriunda da Índia apresentou o teor de CFT de 2,17 mg EAG/g (MARATHE *et al.*, 2011), resultado próximo aos teores obtidos na nossa pesquisa.

Como mencionado anteriormente, os solventes e procedimentos de extração dos compostos fenólicos variam muito entre pesquisadores, embora sua quantificação seja frequentemente espectrofotométrica e expressa, para soja, em mg EAG/g. Nos EUA há um grupo de pesquisa da Universidade da Dakota do Norte que publicou diversos artigos em colaboração com o Instituto de Farmácia da Universidade de Dalian na China sobre CFT em soja preta e amarela, nos quais utilizam o mesmo solvente que empregamos no nosso trabalho, ainda que com procedimentos de extração distintos.

Nos seus estudos comparativos de soja preta e amarela crua, esses autores relataram teores de CFT de 6,18 e 2,23 mg EAG/g em soja preta e amarela, respectivamente (XU & CHANG, 2007a) e em outro estudo, 5,57 mg EAG/g em soja preta e 1,71 mg EAG/g em soja amarela (XU & CHANG, 2007b). No ano seguinte, obtiveram resultados superiores de 8,75 e 9,01 mg EAG/g em soja preta e de 2,07 a 2,90 mg EAG/g em soja amarela. Os próprios autores justificaram a discrepância desses resultados devido a safras distintas, condições e tempo de armazenamento dos grãos.

No entanto, é interessante notar que Amarowicz *et al.* (2009) concluíram, após revisar 325 trabalhos, que o efeito de armazenamento e processamento pós-colheita sobre o teor de compostos fenólicos e flavonóides é desprezível em

comparação às diferenças entre os distintos plantios. O efeito da variação das condições climáticas e ambientais sobre a constituição da soja já é comprovado (KIM *et al.*, 2006b; CARRÃO-PANIZZI & ERHAN, 2007; BARION *et al.*, 2010), porém não há um consenso quanto à importância da influência do armazenamento sobre os CFT.

A pesquisa de Correa *et al.* (2010) indicou que não houve redução significativa no teor de CFT em soja preta armazenada a 25 °C, 4 °C e -80 °C por até 18 meses, apesar de outros compostos fitoquímicos, como luteína e γ -tocoferol, terem sido degradados após 1 mês a temperatura ambiente, e após 6 meses a 4°C.

De toda maneira, as amostras analisadas neste trabalho, foram armazenadas a 4 °C, no escuro, e analisadas em até 18 meses. Esperava-se, assim, conforme indicado por Correa *et al.* (2010) não ter havido perdas significativas de CFT. Além disso, como era o objetivo fazer um estudo comparativo da soja preta e amarela, as amostras foram todas avaliadas simultaneamente, de forma a reduzir possíveis diferenças devido a outros fatores que não dos próprios genótipos.

Analisando o efeito de cozimento sobre os CFT da soja, Xu e Chang (2008c) encontraram, após 120 minutos de cozimento a pressão ambiente, teores próximos aos deste estudo. A soja preta cozida continha 2,62 mg EAG/g e a soja amarela, 1,56 mg EAG/g. Observou-se ainda que a redução de CFT devido à cocção foi 35% maior na soja preta do que na soja amarela, totalizando uma perda de 62%. Essa redução foi mais significativa do que a que obtivemos para soja preta.

Outro estudo, desses mesmos autores, indicou uma perda de 75% de CFT em feijão preto (*Phaseolus vulgaris* L.) após 100 minutos de cocção a pressão ambiente (XU & CHANG, 2008d).

Recentemente, os mesmos autores publicaram os resultados de uma pesquisa indicando que o cozimento tanto do feijão preto, como da soja preta e amarela, ocasiona a perda da capacidade antiproliferativa contra células cancerígenas observadas nos grãos crus (XU & CHANG, 2011).

5.4.3. Determinação de teor de flavonóides

O teor de flavonóides foi 135% maior na soja preta crua que na amarela, correspondendo em média a 1,75 mg EC/g, enquanto a soja amarela possuía apenas 0,74 mg EC/g. Após o processo de cozimento da soja, o teor de flavonóides da soja preta se manteve duas vezes maior que a amarela, correspondendo a 0,77 mg EC/g e 0,34 mg EC/g, respectivamente (**Tabela 10**).

Tabela 10. Teor de flavonóides totais, em base seca.

	Cru	Cozido
Genótipos	mg EC/g	
NT 4	0,76 ± 0,02	0,34 ± 0,01
NT 12	0,73 ± 0,02	0,35 ± 0,01
NT 7001	1,70 ± 0,06	0,82 ± 0,03
NT 7002	1,79 ± 0,07	0,71 ± 0,01
Soja		
Amarela ¹	0,74 ^{b,A} ± 0,02	0,34 ^{b,B} ± 0,01
Preta ²	1,75 ^{a,A} ± 0,08	0,77 ^{a,B} ± 0,06

Média das análises em triplicata; resultados expressos como média ± desvio padrão

¹ Média dos resultados das amostras NT 4 e NT 12

² Média dos resultados das amostras NT 7001 e NT 7002

Médias com diferentes letras minúsculas na coluna têm diferença significativa (p<0,05) pelo teste de Mann Whitney.

Médias com diferentes letras maiúsculas na linha têm diferença significativa (p<0,05) pelo teste de Wilcoxon.

Resultados semelhantes aos nossos foram relatadas em um estudo com quatro variedades de soja preta e três de soja amarela com teores de até 2,0 mg EC/g em soja preta e menores que 0,6 mg EC/g em soja amarela (LIN & LAI, 2006).

Xu e Chang obtiveram teores de flavonóides em soja preta superiores aos nossos. Esses autores encontraram 2,57 e 0,41 mg EC/g em soja preta e amarela, respectivamente (XU & CHANG, 2007a), e ainda em outro estudo, 4,04 mg EC/g em soja preta e 1,14 mg EC/g em soja amarela (XU & CHANG, 2007b). Um ano depois,

publicaram outros resultados de flavonóides em soja, após avaliarem 26 cultivares de soja amarela e duas safras da mesma variedade de soja preta. Nesse trabalho, observaram uma faixa de 0,18 a 0,58 mg EC/g em soja amarela e 5,34 e 5,95 mg EC/g em soja preta (XU & CHANG, 2008b).

Alguns possíveis motivos pela variação do teor de flavonóides nesses estudos foram discutidos no item anterior sobre CFT. Além disso, uma recente pesquisa avaliou as alterações de alguns flavonóides em soja preta sujeito a armazenamento à temperatura ambiente por diferentes períodos de tempo. Esse trabalho indicou que as antocianinas e isoflavonas sofrem significativa redução de teor após um ano, ainda que proteína, lipídeos e ácidos graxos não se alterem (LEE & CHO, 2012). Entretanto, ainda que seja conhecido o efeito de luz e temperatura na degradação de antocianinas (LALEH *et al.*, 2006), outro estudo indicou que após um ano o teor de isoflavonas totais em farinha e proteína isolada de soja não se alterou significativamente, quando armazenada a temperaturas de até 42 °C (PINTO *et al.*, 2005).

Xu e Chang (2008a) verificaram ainda que os teores de CFT e de flavonóides encontrados em soja preta sem casca era próximo aos valores encontrados em soja amarela com casca. Esse resultado sugere que a casca da soja preta contribui significativamente nos teores de CFT e de flavonóides.

Ainda que seja difícil comparar os resultados apresentados por Malencic *et al.* (2008 e 2012) por não terem utilizado catequina como padrão, parece interessante citá-los devido à dificuldade de encontrar estudos que avaliem o teor de flavonóides em soja. Estes autores encontraram, em 20 variedades de soja amarela, teores de flavonóides entre 0,27 e 0,89 mg rutina/g (MALENCIC *et al.*, 2008) e 1,16 e 2,19 mg rutina/g para duas variedades de soja preta (MALENCIC *et al.*, 2012), indicando novamente que a soja preta apresenta maior conteúdo de flavonóides.

Os produtos à base de soja preta também podem apresentar valores significativamente superiores de flavonóides em relação àqueles produzidos com soja amarela. O leite de soja à base de soja preta apresentou 0,25 mg EC/g,

enquanto o leite de soja amarela continha apenas metade desse teor (XU & CHANG, 2009a).

Todas as nossas amostras perderam ao redor de 55% de flavonóides no processo de cozimento. A literatura também indica que o cozimento a pressão ambiente por 120 minutos pode causar uma redução de até 78% dos flavonóides presentes em soja preta (XU & CHANG, 2008c). Nesse estudo, o teor de flavonóides da soja preta se reduziu de 3,43 a 0,75 mg EC/g soja após a cocção. Xu e Chang (2009b) também encontraram uma perda de 60% dos flavonóides em feijão preto (*Phaseolus vulgaris* L.) após 80 minutos de cozimento a pressão ambiente.

5.4.4. Determinação de teor de antocianinas monoméricas totais (AMT)

A soja preta apresentou teor médio de AMT de 0,92 mg CyE/g e sofreu uma redução de 70% após o processo de cozimento, restando apenas 0,28 mg CyE/g (**Tabela 11**). Na soja amarela não foram detectadas antocianinas, assim como demonstrado por outros estudos (KIM *et al.*, 2006a, XU & CHANG, 2008c, MALENCIC *et al.*, 2012).

Tabela 11. Teor de antocianinas monoméricas totais, em base seca.

	Cru	Cozido
Genótipos	mg CyE/g	
NT 4	n.d.	n.d.
NT 12	n.d.	n.d.
NT 7001	0,89 ± 0,01	0,29 ± 0,01
NT 7002	0,95 ± 0,01	0,27 ± 0,01
Soja		
Amarela ¹	n.d.	n.d.
Preta ²	0,92 ^A ± 0,03	0,28 ^B ± 0,02

Média das análises em triplicata; resultados expressos como média ± desvio padrão

¹ Média dos resultados das amostras NT 4 e NT 12

² Média dos resultados das amostras NT 7001 e NT 7002

n.d. = não detectado

Médias com diferentes letras maiúsculas na linha têm diferença significativa (p<0,05) pelo teste de Wilcoxon.

A nossa quantificação de AMT foi superior ao teor médio de 0,61 mg CyE/g de soja preta, determinados por Malencic *et al.* (2012), e ao de Xu e Chang (2008c), que encontraram 0,43 mg CyE/g de soja preta. No entanto, os nossos resultados e os desses autores estão condizentes com a faixa de variação de 0,22 a 1,87 mg CyE/g descrita por Jin-rui *et al.* (2007), após avaliarem 127 genótipos de soja preta crua, cultivadas na China.

O conteúdo de antocianinas totais também pode ser determinado por HPLC por meio do cálculo da área debaixo do pico e utilização de um padrão externo. Diversos autores (SÁCHEZ-MORENO *et al.*, 2003; WU *et al.*, 2004; WU *et al.*, 2006) indicam que os teores medidos através dessa análise podem ser maiores que os encontrados por método espectrofotométrico. Ainda assim, há forte correlação entre as duas metodologias (LEE *et al.*, 2008b). Utilizando HPLC, Kim *et al.* (2006a) quantificaram quatro antocianinas e as seis principais antocianidinas em cinco variedades de soja preta. Esses autores obtiveram resultados próximos aos nossos, com teores de até 0,81 mg/g de soja.

Tendo em conta que as antocianinas da soja preta estão majoritariamente presentes na casca e que o cotilédone contém teores insignificantes (KIM *et al.*, 2006a; XU & CHANG, 2008a), alguns pesquisadores optam por medir a concentração desses compostos apenas na casca do grão. Jeng *et al.* (2010), por exemplo, encontraram 7,23, 18,81 e 20,25 mg/g de antocianinas na casca de três cultivares de soja preta. Outro estudo com 60 variedades de soja preta da China apresentou uma variação de 0,98 a 21,32 mg/g, com uma média de 7,70 mg/g (ZHANG *et al.*, 2011). Dez cultivares de soja preta da Coreia também tiveram teores entre 1,58 e 20,18 mg/g (CHOUNG *et al.*, 2001).

Xu e Chang (2008a) descrevem que a casca representa 10,3% da massa do grão de soja preta. Yao *et al.* (2010) também apresentaram uma porcentagem semelhante de 11,3%, após encontrarem 6,55 mg/g de antocianinas na casca de soja preta e 0,74 mg/g no grão inteiro. Sendo assim, verificamos que os teores de antocianinas encontrados para casca de soja preta descritos anteriormente, se fossem extrapolados para o grão inteiro também estariam condizentes com os nossos resultados.

Quanto ao processo de cozimento, Xu e Chang (2008c) observaram uma redução de 93% do teor de antocianinas da soja preta crua, após 120 minutos de cocção a pressão ambiente. Nesse estudo, o teor de antocianinas diminuiu de 0,43 para 0,03 mg CyE/g. Em outra pesquisa foi avaliado o efeito do cozimento sobre as antocianinas de feijão preto (*Phaseolus vulgaris* L.) e também foi verificada uma redução de 93% (XU & CHANG, 2009b). Pode-se observar que as antocianinas foram mais sensíveis ao cozimento do que os outros flavonóides e os compostos fenólicos totais.

5.5. Separação e identificação das antocianinas e das isoflavonas por HPLC-DAD-MS/MS

As antocianinas dos dois genótipos de soja preta, antes e após o cozimento, foram identificadas por HPLC-DAD-MS/MS. A **Figura 20** apresenta os cromatogramas das antocianinas e a **Tabela 12** reúne as características cromatográficas e dos espectros UV-vis e de massas apresentadas por esses pigmentos. Duas antocianinas, a cianidina-O-glicosídeo (pico 1) e a peonidina-O-glicosídeo (pico 2), foram encontradas tanto na soja crua quanto na cozida, enquanto a cianidina (pico 3) foi encontrada apenas na soja crua.

Figura 20. Cromatograma, obtido por HPLC-DAD, das antocianinas de soja preta crua NT 7001 (I) e NT 7002 (II) e de soja preta cozida NT 7001 (III) e NT 7002 (IV). Picos identificados de acordo com a **Tabela 12**.

Tabela 12. Características cromatográficas e espectroscópicas, obtidas por HPLC-DAD-MS/MS, das antocianinas de soja preta crua e cozida.

Pico ^a	Composto	t _R (min) ^b	λ _{max} (nm) ^c	[M] ⁺ (m/z)	Íon fragmentos obtidos por MS/MS (m/z)
1	Cianidina 3-O-glicosídeo	15,4	280, 517	449	287 [M-162] ⁺
2	Peonidina 3-O-glicosídeo	18,3	301, 518 - 521	463	301 [M-162] ⁺
3	Cianidina	23,4	273, 526 - 528	287	n.d. ^d

^a picos numerados de acordo com a **Figura 20**.

^b tempo de retenção na coluna C₁₈ Shim-pack.

^c gradiente linear de água/metanol, ambos com 5% de ácido fórmico.

^d não detectado.

Nas antocianinas identificadas (picos 1 e 2), a fragmentação dos íons moleculares [M]⁺ (**Figura 21**) resultou em uma perda de 162 u (**Tabela 12**), o que corresponde à perda de uma unidade de hexose identificada em ambas as antocianinas, como glicose. Resultados similares foram encontrados por Lee *et al.*, (2009), que empregaram ressonância magnética nuclear (RMN) das estruturas, hexoses e posição de substituição, para a identificação da cianidina e das formas glicosiladas.

Figura 21. Espectro de massas de cianidina-3-O-glicosídeo.

A proporção de antocianinas observada foi 97% de cianidina-3-O-glicosídeo, 2,7% de peonidina-3-O-glicosídeo e 0,3% de cianidina.

Ao avaliar o espectro de massas do pico 2, verificou-se que havia eluição de outro composto com molécula protonada $[M+H]^+$ a m/z 417. A presença do íon fragmento no MS/MS referente à perda de uma unidade de hexose $[M+H-162]^+$ (**Figura 22**) permitiu a identificação do composto como a isoflavona daidzina (VALLS *et al.*, 2009). A hexose foi identificada como glicose, utilizando a comparação com os dados da literatura que confirmaram a identificação por RMN desta isoflavona em amostras de soja (CALIGIANI *et al.*, 2010). Essa isoflavona foi identificada nas amostras de soja preta (NT 7001 e NT 7002) e de soja amarela (NT 4 e NT 12).

Figura 22. Espectro de massas da isoflavona daidzina.

Apesar do método de extração não ter sido específico para isoflavonas, devido a sua polaridade, esses flavonóides continuaram presentes no extrato metanólico, possibilitando a identificação desses compostos, conforme a **Tabela 13**. As mesmas isoflavonas já haviam sido identificadas em soja amarela brasileira por Genovese *et al.* (2005).

Tabela 13. Características cromatográficas e espectroscópicas das isoflavonas, obtidas por HPLC-DAD-MS/MS, de soja preta e amarela, crua e cozida.

Composto	t_R (min) ^a	λ_{max} (nm) ^b	$[M+H]^+$ (m/z)	Íon fragmentos obtidos por MS/MS (m/z)
Daidzina	18,3	246	417	255 $[M+H-162]^+$
Glicitina	19,5	246	447	285 $[M+H-162]^+$
Genistina	22,2	259 - 260	433	271 $[M+H-162]^+$
Malonil-daidzina	24,6	247	503	255 $[M+H-162-86]^+$
Malonil-glicitina	25,4	247	533	285 $[M+H-162-86]^+$
Acetil-daidzina	26,6	247	459	255 $[M+H-162-48]^+$
Malonil-genistina	27,0	247	519	433 $[M+H-86]^+$, 271 $[M+H-162-86]^+$
Daidzeína	29,4	247	255	n.d. ^c
Gliciteína	30,3	247	285	n.d. ^c
Genisteína	31,9	247	271	n.d. ^c

^a tempo de retenção na coluna C₁₈ Shim-pack.

^b gradiente linear de água/metanol, ambos com 5% de ácido fórmico.

^c não detectado.

Na soja preta e amarela crua também foram identificadas as formas glicosiladas glicitina e genistina, com base nos espectros de massas devido à presença da molécula protonada $[M+H]^+$ a m/z 447 e m/z 433 (**Figura 23**) (WU *et al.*, 2003; LUTHRIA *et al.*, 2007; COLLISON, 2008).

Figura 23. Espectro de massas das isoflavonas glicitina (I) e genistina (II).

Todas as amostras de soja, tanto cruas como cozidas, apresentaram três agliconas: daidzeína, gliciteína e genisteína, que correspondem às formas não glicosiladas das isoflavonas daidzina, glicitina e genistina, respectivamente. Essas isoflavonas foram identificadas com base na massa molecular de cada composto devido à presença da $[M+H]^+$ a m/z 255, m/z 285 e m/z 271 (**Figura 24**), respectivamente, na ordem de eluição em coluna C_{18} e em comparação a dados da literatura, confirmados por RMN (COLLISON, 2008; CALIGIANI *et al.*, 2010).

Figura 24. Espectro de massas de daidzeína (I), gliciteína (II) e genisteína (III).

A presença de isoflavonas aciladas foi observada somente nas amostras cozidas. As isoflavonas malonil-daidzina, malonil-glicitina, e malonil-genistina foram identificadas com base nos espectros de massas devido à presença da molécula protonada $[M+H]^+$ a m/z 503, m/z 533 e m/z 519 (**Figura 25**), respectivamente (WU *et al.*, 2003). O íon fragmento detectado no MS/MS $[M+H-162-86]^+$, referente à perda de uma unidade de hexose e de uma unidade do ácido malônico, condiz com dados da literatura confirmados por RMN (YERRAMSETTY *et al.*, 2011).

Figura 25. Espectro de massas de malonil-daizina (I), malonil-glicitina (II), e malonil-genistina (III).

A forma acetilada, acetil-daizina, foi identificada com base no espectro de massas devido à presença da molécula protonada $[M+H]^+$ a m/z 459 (CHEN *et al.*, 2005). A perda de uma unidade de hexose e de uma unidade do radical acetil $[M+H-162-48]^+$ (Figura 26) foi observada pela presença do íon fragmento no MS/MS

(LUTHRIA *et al.*, 2007). A identificação condiz com dados comparados à literatura com relação à ordem de eluição em coluna C₁₈ e a identificação por RMN (CALIGIANI *et al.*, 2010).

Figura 26. Espectro de massas de acetil-daizina.

A isoflavona acetil-glicitina foi identificada com base no espectro de massas devido à presença da molécula protonada $[M+H]^+$ a m/z 489 (**Figura 27**), forma também encontrada em amostras de soja confirmados por RMN em dados da literatura (CHEN *et al.*, 2005; LUTHRIA, 2007; COLLISON, 2008; CALIGIANI *et al.*, 2010).

Figura 27. Espectro de massas da acetil-glicitina.

5.6. Atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH[•]) e pelo método de *oxygen radical absorbance capacity* (ORAC)

Os extratos de compostos fenólicos da soja preta crua apresentaram, pelo método envolvendo sequestro de DPPH[•], três vezes mais atividade que a soja amarela, correspondendo a 12,26 μ moles eq. Trolox/g de soja (**Tabela 14**). Essa atividade antioxidante da soja preta está na faixa de 7,05 e 15,98 μ moles eq. Trolox/g encontrada por Jeng *et al.* (2010) ao avaliar 3 variedades de soja preta pelo mesmo método. Recentemente, outros autores também avaliaram a atividade antioxidante de farinha soja, encontrando de 6,93 a 14,61 μ moles eq. Trolox/g em farinha de soja preta e de 0,48 a 2,38 μ moles eq. Trolox/g em farinha de soja amarela (WHENT *et al.*, 2011).

Tabela 14. Atividade antioxidante dos extratos de compostos fenólicos.

	DPPH [•]		ORAC	
	µmoles eq. Trolox/g de soja em b.s.			
Genótipos	Cru	Cozido	Cru	Cozido
NT 4	3,09 ± 0,30	2,14 ± 0,28	111,24 ± 4,89	65,00 ± 2,56
NT 12	4,35 ± 0,15	2,07 ± 0,44	111,73 ± 4,62	71,21 ± 1,86
NT 7001	12,29 ± 0,05	4,95 ± 0,14	226,25 ± 5,25	146,33 ± 8,25
NT 7002	12,23 ± 0,26	5,09 ± 0,12	228,42 ± 6,32	137,49 ± 5,09
Soja				
Amarela ¹	3,72 ^{b,A} ± 0,72	2,10 ^{b,B} ± 0,33	111,48 ^{b,A} ± 4,26	68,10 ^{b,B} ± 3,95
Preta ²	12,26 ^{a,A} ± 0,17	5,02 ^{a,B} ± 0,14	227,34 ^{a,A} ± 5,33	141,91 ^{a,B} ± 7,81

Média das análises em triplicata; resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão

¹ Média dos resultados das amostras NT 4 e NT 12

² Média dos resultados das amostras NT 7001 e NT 7002

Médias com diferentes letras minúsculas na coluna têm diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Mann Whitney.

Médias com diferentes letras maiúsculas na linha têm diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Wilcoxon.

Alguns estudos comparativos da atividade antioxidante de soja preta e amarela encontraram, pelo método de DPPH[•], uma faixa de variação entre 16,39 e 18,44 μ moles eq. Trolox/g em soja preta e de 0 a 1,4 μ moles eq. Trolox/g em soja amarela (XU & CHANG, 2007a; 2007b; 2008b). Por outro lado, Chung *et al.* (2008) obtiveram uma faixa superior para soja amarela de 2,9 a 4,9 μ moles eq. Trolox/g, mais próximo aos nossos resultados. Nota-se que pode haver uma variação na atividade antioxidante, assim como foram observadas anteriormente diferenças nos teores de compostos fenólicos.

Observou-se ainda, pelo método de DPPH[•], que o processo de cozimento reduziu 15% a mais da atividade antioxidante da soja preta que da amarela (**Tabela 14**). Tendo em conta que a casca da soja preta pode contribuir com 90% da atividade antioxidante pelo método de DPPH[•] (XU & CHANG, 2008a), é possível que esse resultado seja consequência da maior degradação das antocianinas em comparação aos outros compostos fenólicos presentes na soja. Além disso, é interessante notar que embora o processo de cozimento tenha reduzido mais a capacidade antioxidante da soja preta, em valores absolutos a sua atividade antioxidante permaneceu mais que duas vezes maior que a soja amarela.

Similarmente aos nossos resultados, Xu e Chang (2008c) encontraram uma redução de 53 a 58% da atividade antioxidante, pelo método de DPPH[•], após cozimento da soja preta por 120 minutos. Esse autores não verificaram alteração da capacidade antioxidante por esse método em soja amarela, porém os valores medidos foram abaixo de 2 μ moles eq. Trolox/g tanto para soja crua como cozida.

Pelo método de ORAC, a soja preta crua também apresentou o dobro de atividade antioxidante que a soja amarela, correspondendo a 227,34 μ moles eq. Trolox/g e 111,48 μ moles eq. Trolox/g, respectivamente (**Tabela 14**). Esses resultados condizem com a faixa de 75 a 255 μ moles eq. Trolox/g de soja preta (SLAVIN *et al.*, 2009b) e de 71 a 118 μ moles eq. Trolox/g de soja amarela (SLAVIN *et al.*, 2009a; CORREA *et al.*, 2010).

Estudos comparativos de soja preta e amarela também indicam que a soja preta contém mais que o dobro de atividade antioxidante, pelo método de ORAC, que a soja amarela. Como mencionado anteriormente, Slavin *et al.* (2009b) encontraram de 75 a 255 μ moles eq. Trolox/g de soja preta e apenas 25 a 80

$\mu\text{moles eq. Trolox/g}$ de soja amarela. Os resultados encontrados por Xu e Chang (2007a e 2007b) seguem essa tendência, ainda que os valores absolutos sejam mais baixos, variando de 122,75 a 131,34 $\mu\text{moles eq. Trolox/g}$ de soja preta e de 38,73 a 44,08 $\mu\text{moles eq. Trolox/g}$ de soja amarela.

Por outro lado, Chung *et al.* (2010) encontraram resultados até seis vezes maiores que os de Xu e Chang (2007a), variando entre 144,67 e 264,69 $\mu\text{moles eq. Trolox/g}$ de soja amarela. Foi utilizado em ambas as pesquisas acetona 80%, mas no primeiro caso a extração dos compostos fenólicos foi feito com ultrassom, enquanto no segundo, o solvente permaneceu apenas em contato com a amostra *overnight*. É possível que as variações de capacidade antioxidante observadas na literatura sejam consequência tanto das diferenças entre amostras como pelos distintos métodos e solventes empregados na extração.

O cozimento da soja preta e amarela produziu uma redução de 40% da capacidade antioxidante, pelo método de ORAC (**Tabela 14**). Xu e Chang (2008c) também descrevem a diminuição de atividade antioxidante, por ORAC, em 35% para soja amarela e de 47 a 60% em soja preta.

É importante a avaliação da capacidade antioxidante por esses dois métodos, pois como Xu e Chang (2008a) demonstraram, a casca da soja preta foi responsável por aproximadamente 90% da atividade medida por DPPH $\cdot$, enquanto no método de ORAC, a casca foi responsável por apenas 50%. Os mesmos autores verificaram ainda que grãos de soja preta descascados apresentaram níveis de atividade antioxidante próximos aos de soja amarela, tanto pelo método de DPPH $\cdot$ como por ORAC. Sendo assim, é possível que as antocianinas, presentes apenas na casca da soja preta, atuem majoritariamente pela transferência de elétrons.

5.7. Correlação entre compostos fenólicos totais e atividade antioxidante

Na análise de correlação entre os compostos fenólicos e atividade antioxidante, todos os coeficientes de correlação foram acima de 0,59 e estatisticamente significativas ($p < 0,05$) (**Tabela 15**). Isto indica que os teores de compostos fenólicos, flavonóides e antocianinas estão fortemente correlacionados

com a atividade antioxidante de maneira positiva, ou seja, quanto maior o teor de fenólicos, maior a atividade antioxidante observada. Outros autores também verificaram correlações semelhantes entre as análises de fenólicos e às análises de capacidade antioxidante em soja preta (XU & CHANG, 2008a; XU & CHANG, 2008b; SLAVIN *et al.*, 2009b; ZHANG *et al.*, 2011).

Como foi visto anteriormente, o solvente utilizado na extração de compostos fenólicos afeta a sua quantificação e a sua atividade antioxidante. Contudo, é interessante notar que a correlação entre as análises também pode ser afetada pelo solvente empregado. Um estudo indicou que entre os seis solventes testados para a extração de compostos fenólicos, acetona/água/ácido acético (70:29,5:0,5, v/v/v), solvente utilizado em nossa pesquisa, foi o que mais fortemente correlacionou os teores de fenólicos totais e de flavonóides com a atividade antioxidante para oito leguminosas (XU & CHANG, 2007a).

Tabela 15. Correlação pelo teste de Spearman ($p < 0,05$) entre os compostos fenólicos e a atividade antioxidante.

Amostra		DPPH[•]	ORAC
Cru	Fenólicos totais	0,804	0,951
	Flavonóides	0,636	0,769
	Antocianinas	0,847	0,840
Cozido	Fenólicos totais	0,594	0,916
	Flavonóides	0,685	0,937
	Antocianinas	0,720	0,892

Diante desses resultados, vislumbra-se que o consumo de soja preta em grão ou como ingrediente em novos produtos poderá oferecer ao consumidor a possibilidade de diversificar a sua dieta, com um alimento da mesma qualidade nutricional da soja amarela, porém com maior atividade antioxidante. Sendo assim, a criação de um novo nicho de mercado pode ser promissora permitindo a expansão do cultivo da soja preta, inclusive por pequenos produtores.

6. CONCLUSÕES

- Além da coloração da casca, não foram observadas diferenças significativas nas características físicas da soja preta e amarela, como massa, dimensões, capacidade de hidratação e tempo de cozimento dos grãos.
- A soja preta apresentou a mesma qualidade nutricional que a soja amarela, não sendo observadas diferenças significativas no conteúdo de macronutrientes nem no perfil de ácidos graxos.
- A soja preta apresentou teores muito mais elevados de compostos fenólicos totais (CFT) e de flavonóides em relação à soja amarela. Os teores na soja preta foram, em média, de 4,78 mg eq. ácido gálico/g e de 1,75 mg eq. catequina/g, de CFT e de flavonóides, respectivamente. A soja amarela apresentou em média 40% a menos de CFT e aproximadamente 60% a menos de flavonóides.
- Ao contrário da soja amarela que é desprovida de antocianinas, na soja preta foi encontrado um teor médio de 0,92 mg eq. cianidina-3-O-glicosídeo/g. Empregando a técnica de HPLC-DAD-MS/MS foram identificadas duas antocianinas, a cianidina-3-O-glicosídeo e a peonidina-3-O-glicosídeo, além da cianidina.
- A soja preta apresentou atividade antioxidante 70% superior à da soja amarela pelo método de DPPH[•] (12,26 µmoles eq. de Trolox/g) e 50% superior, pelo método de ORAC (227,34 µmoles eq. de Trolox/g).
- O cozimento dos grãos reduziu em pelo menos 40% o teor de compostos fenólicos e a atividade antioxidante, tanto na soja preta como na amarela. Ainda assim, verificou-se que a soja preta manteve atividade antioxidante e teores de compostos fenólicos totais e flavonóides significativamente superiores aos da soja amarela.
- Foi observada uma forte correlação entre os teores de CFT, flavonóides e antocianinas com a atividade antioxidante, antes e após o cozimento da soja.

7. REFERÊNCIAS

- ABDEL-AAL, E. S. M.; HUCL, P. A rapid method for quantifying total anthocyanins in blue aleurone and purple pericarp wheats. **Cereal Chemistry**, v. 76, n.3, p. 350-354, 1999.
- ACOSTA-MONTOYA, O.; VAILLANT, F.; COZZANO, S.; MERTZ, C. PEREZ, A. M.; CASTRO, M. V. Phenolic content and antioxidant capacity of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichus* Schltdl.) during three edible maturity stages. **Food Chemistry**. v. 119, n. 4, p. 1497-1501, 2010.
- ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos**, 2011. Disponível em:
http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm
 Acesso em: 29 mar 2011.
- AMAROWICZ, R.; CARLE, R.; DONGOWSKI, G.; DURAZZO, A.; GALENSA, R.; KAMMERER, D.; MAIANI, G.; PISKULA, M. K. Influence of postharvest processing and storage on the content of phenolic acids and flavonoids in foods. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 53, n.2, p. S151-S183, 2009.
- AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official methods and recommended practices of the AOCS**. Ce 1h-05. Determination of cis-, trans-, saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids in vegetable or non-ruminant animal oils and fats by capillary GLC, 5ed. Champaign, 2004.
- AMERICAN SOYBEAN ASSOCIATION. **Soybean Statistics**, 2012. Disponível em:
http://www.soystats.com/2011/page_30.htm Acesso em: 10 abr 2012.
- ANDERSON, R.L.; WOLF, W.J. Compositional changes in trypsin inhibitors, phytic acid, saponins, isoflavones related to soybean processing. **Journal of Nutrition**. v.125, p.581–588, 1995.
- ANDRADE, P. M. M.; CARMO, M. G. T. Ácidos graxos n-3: um link entre eicosanóides, inflamação e imunidade. **Metabólica**. v. 8, n. 3, p. 135-143, 2006.
- ARSLANOGLU, F.; AYTAC, S.; ONER, E. K. Effect of genotype and environment interaction on oil and protein content of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) seed. **African Journal of Biotechnology**. v. 10, n. 80, p. 18409-18417, 2011.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC), **Official Methods of Analysis**. (técnica 47021) 16ed. p.988, 1995.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC), **Official Methods of Analysis**. (técnica 996.06), 17 ed. cap. 41, p. 20-24 A, 2002.

ARTS, I.C., HOLLMANN, P.C., FESKENS, E.J., BUENO DE MESQUITA, H.B., KROMHAUT, D. Catechin intake might explain the inverse relation between tea consumption and ischemic heart disease. **American Journal of Clinical Nutrition**. v. 74, p. 227–232, 2001.

ASTADI, I.; ASTUTI, M.; SANTOSO, U.; NUGRAHENI, P. In vitro antioxidant activity of anthocyanins of black soybean seed coat in human low density lipoprotein (LDL). **Food Chemistry**, v. 112, n. 3, p. 659-663, 2009.

AVILA, M. R.; BRACCINI, A. L.; SCARPIN, C. A.; MANDARINO, J. M. G.; ALBRECHT, L. P.; VIDIGAL FILHO, P. S. Isoflavone, protein and oil contents and soybean seed quality. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n. 3, p. 111-127, 2007.

AWARD, A.B.; FINK, C.S. Phytosterols as anticancer dietary components: evidence and mechanism of action. **Journal of Nutrition**. v. 130: p.2127–2130, 2000.

BAE, E.A.; HAN, M.J.; CHOO, M.K.; PARK, S.Y.; KIM, D.H. Metabolism of 20(S)- and 20(R)-ginsenoside Rg3 by human intestinal bacteria and its relation to in vitro biological activities. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. v. 25: p.58–63, 2000.

BARION, G.; HEWIDY, M.; MOSCA, G.; VAMERALI, T. Intraspecific variability for soybean cotyledon isoflavones in different cropping and soil conditions. **European Journal of Agronomy**, v. 33, n. 2, p. 63-73, 2010.

BONDET, V.; BRAND-WILLIAMS, W.; BERSET, C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DDPH* free radical method. **LWT - Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v.30, p.609-615, 1997.

BORDIGNON, C. L.; FRANCESCOTTO, V.; NIENOW, A. A.; CALVETE, E.; REGINATTO, F. H. Influência do pH da solução extrativa no teor de antocianinas em frutos de morango. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.29, n.1, p. 183-188, 2009.

BOSCHINI, G.; ARNOLDI, A. Legumes are a valuable source of tocopherols. **Food Chemistry**. v. 127, p. 1199-1203, 2011.

BOULTON, R. The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: a critical review. **American Journal of Enology and Viticulture**. v. 52, n. 2, p. 67-87, 2001.

- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, v.28, p.25-30, 1995.
- BRITZ, S. J.; SCHOMBURG, C. J., KENWORTHY, W. J. Isoflavones in seeds of field-grown soybean: variation among genetic lines and environmental effects. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. 2011.
- CALIGIANI, A.; PALLA, G.; MAIETTI, A.; CIRLINI, M.; BRANDOLINI, V. ¹H NMR fingerprinting of soybean extracts, with emphasis on identification and quantification of isoflavones. **Nutrientes**, v. 2, p. 280-289, 2010.
- CARAYOL, M.; GROSCLAUDE, P.; DELPIERRE, C. Prospective studies of dietary alpha-linolenic acid intake and prostate cancer risk: a meta-analysis. **Cancer Causes Control**. v. 21, p. 347-355, 2010.
- CARRÃO-PANIZZI, M. C.; ERHAN, S. Z. Environmental and genetic variation of soybean tocopherol content under Brazilian growing conditions. **Journal of American Oil and Chemists' Society**. v. 84, p. 921-928, 2007.
- CARRERA, C. S.; REYNOSO, C. M.; FUNES, G. J.; MARTINEZ, M. J.; DARDANELLI, J.; RESNIK, S. L. Amino acid composition of soybean seeds as affected by climatic variables. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 46, n. 12, p. 1579-1587, 2011a.
- CARRERA, C.; MARTINEZ, M. J.; DARDANELLI, J.; BALZARINI, M. Environmental variation and correlation of seed components in nontransgenic soybeans: protein, oil, unsaturated fatty acids, tocopherols and isoflavones. **Crop Science**. v. 51, p. 800-809, 2011b.
- CASTANEDA-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. 113, n. 4, p. 859-871, 2009.
- CAVARIANI, C.; TOLEDO, M. Z.; RODELLA, R. A.; FRANÇA NETO, J. B.; NAKAGAWA, J. Velocidade de hidratação em função de características do tegumento de sementes de soja de diferentes cultivares e localidades. **Revista Brasileira de Sementes**., v. 31, n. 1, p. 30-39, 2009.
- CEDERROTH, C. R.; NEF, S. Soy, phytoestrogens and metabolism: A review. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 304, n. 1-2, p. 30-42, 2009.
- CHAJUSS, D. Soy protein concentrate: technology, properties, and applications. In: LIU, K. **Soybeans as Functional Foods and Ingredients**, Illinois: AOCS Press, cap. 6, 2004.

- CHANG, Y. H.; SHIAU, S. Y.; CHEN, F. B.; LIN, F. R. Effect of microbial transglutaminase on the rheological and textural characteristics of black soybean packed tofu coagulation with Agar. **LWT – Food Science and Technology**. v. 44, n. 4, p. 1107-1112, 2011.
- CHEN, L.J.; ZHAO, X.; PLUMMER, S.; TANG, J.; GAMES, D.E. Quantitative determination and structural characterization of isoflavones in nutrition supplements by liquid chromatography–mass spectrometry, **Journal of Chromatography**, v. 1082, p. 60-70, 2005.
- CHEN, F.; SUN, Y.; ZHAO, G.; LIAO, X.; HU, X.; WU, J.; WANG, Z. Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins in red raspberries and identification of anthocyanins in extract using high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. **Ultrasonics Sonochemistry**. v. 14, n. 6, p. 767-778, 2007.
- CHEN, Y.F.; LEE, S.L.; CHOU, C.C. Fermentation with aspergillus awamori enhanced contents of amino nitrogen and total phenolics as well as the low-density lipoprotein oxidation inhibitory activity of black soybeans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2011.
- CHENNUPATI, P.; SEGUIN, P.; LIU, W. Effects of high temperature stress at different development stages on soybean isoflavone and tocopherol concentrations. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 13081-13088, 2011.
- CHIOU, R. Y. Y.; KU, K. L.; LAI, Y. S.; CHANG, L. G. Antioxidative characteristics of oils in ground pork-fat patties cooked with soy sauce. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 78, n. 1, p. 7–11, 2001.
- CHOI, M. S.; RHEE, K. C. Production and processing of soybeans and nutrition and safety of isoflavone and other soy products for human health. **Journal of Medicinal Food**, v. 9, n. 1, p. 1-10, 2006.
- CHOUNG, M. G.; BAEK, I. Y.; KANG, S. T.; HAN, W. Y.; SHIN, D. C.; MOON, H. P.; KANG, K. H. Isolation and determination of anthocyanins in seed coats of black soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 12, p. 5848-5851, 2001.
- CHUNG, H.; HOGAN, S.; ZHANG, L.; RAINEY, K.; ZHOU, K. Characterization and comparison of antioxidant properties and bioactive components of Virginia soybeans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 56, p. 11515-11519, 2008.
- CHUNG, H.; JI, X.; CANNING, C.; SUN, S.; ZHOU, K. Comparison of different strategies for soybean antioxidant extraction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 58, n. 7, p. 4508-4512, 2010.

- COLLISON, M.W. Determination of Total Soy Isoflavones in Dietary Supplements, Supplement Ingredients, and Soy Foods by High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection: Collaborative Study. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**. v. 91, n. 3, p. 489-500, 2008.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira**, 2011. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/> Acesso em: 10 abr 2012.
- CORREA, C. R.; LI, L.; ALDINI, G.; CARINI, M.; OLIVER CHEN, C. Y.; CHUN, H. K.; CHO, S. M.; PARK, K. M.; RUSSELL, R. M.; BLUMBERG, J. B. Composition and stability of phytochemicals in five varieties of black soybeans (*Glycine max*). **Food Chemistry**, v. 123, n. 4, p. 1176–1184, 2010.
- COUSSENS, L.M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420. p. 860–867, 2002.
- DEGENHARDT, A.; KNAPP, H.; WINTERHALTER, P. Separation and purification of anthocyanins by high-speed countercurrent chromatography and screening for antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 338-343, 2000.
- DEMMIG-ADAMS, B.; MCCAULEY, L. Breast cancer, estrogen, soy genistein, and other dietary factors: Towards an understanding of their mechanistic interactions. **Nutrition & Food Science**. v. 35, n.1, p.35-42, 2005.
- DENG, H.; VAN BERKEL, G. J. Electrospray Mass Spectrometry and UV/Visible Spectrophotometry Studies of Aluminum(III).Flavonoid Complexes. **Journal of Mass Spectrometry**. v. 33, p. 1080-1087, 1998.
- DIXIT, A. K.; KUMAR, V.; RANI, A.; MANJAYA, J. G. ; BHATNAGAR, D. Effect of gamma irradiation on lipoxygenases, trypsin inhibitor, raffinose family oligosaccharides and nutritional factors of different seed coat colored soybean (*Glycine max* L.). **Radiation Physics and Chemistry**. v. 80, p. 597-6-3, 2011.
- DUENAS, M.; HERNANDEZ, T.; ESTRELLA, I. Assessment of in vitro antioxidant capacity 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/producaosoja/SojanoBrasil.htm>. Acesso em 15 mar 2012.
- FANG, E. F.; WONG, J. H.; NG, T. B. Thermostable Kunitz trypsin inhibitor with cytokine inducing, antitumor and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from Korean large black soybeans. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 109, n. 2, p. 211-217, 2010.

- FARIA, A. F.; MARQUES, M. C.; MERCADANTE, A. Z. Identification of bioactive compounds from jambolão (*Syzygium cumini*) and antioxidant capacity evaluation in different pH conditions. **Food Chemistry**, v. 126, p. 1571-1578, 2011.
- FENG, S.; SAW, C. L.; LEE, Y. K.; HUANG, D. Novel process of fermenting black soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] yogurt with dramatically reduced flatulence-causing oligosaccharides but enriched soy phytoalexins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 21, p. 10078-10084, 2008.
- FERREIRA, D. B.; RAO, V. B. Recent climate variability and its impacts on soybean yields in Southern Brazil. **Theoretical and Applied Climatology**. 2010.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Federal Register**, v. 72, n. 245, p. 72738, 2007. Disponível em: <http://www.fda.gov/OHRMS/DOCKETS/98fr/E7-24812.pdf> Acesso em: 14 mai 2012.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Health Claims Meeting**, 2011. Disponível em: <http://www.fda.gov/food/labelingnutrition/labelclaims/healthclaimsmeetingsignificantscientificagreementssa/default.htm> Acesso em: 16 mar 2011.
- FORESTER, S.C.; WATERHOUSE, A.L. Gut metabolites of anthocyanins, gallic acid, 3-o-methylgallic acid, and 2,4,6-trihydroxybenzaldehyde, inhibit cell proliferation of caco-2 cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 5320-5327, 2010.
- FRIEDMAN, M.; BRANDON, D. L. Nutritional and health benefits of soy proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 3, p. 1069-1086, 2001.
- FULEKI, T.; FRANCIS, F. J. Quantitative methods for anthocyanins: extraction and determination of total anthocyanin in cranberries. **Journal of Food Science**. v. 33, p. 72-77, 1968.
- FURUTA, S.; TAKAHASHI, M.; TAKAHATA, Y.; NISHIBA, Y.; OKI, T.; MASUDA, M.; KOBAYASHI, M.; SUDA, I. Radical-scavenging activities of soybean cultivars with black seed coats. **Food Science and Technology Research**, v. 9, n. 1, p. 73-79, 2003.
- GELEIJNSE, J. M.; GOEDE, J.; BROUWER, I. A. Alpha-linolenic acid: Is it essential to cardiovascular health? **Current Atherosclerosis Reports**. v. 12, p. 359-356, 2010.
- GENOVESE, M. I.; HASSIMOTO, N. M. A.; LAJOLO, F. M. Isoflavone profile and antioxidant activity of Brazilian soybean varieties. **Food Science and Technology International**. v. 11, n. 3, p. 205-211, 2005.

- GHAFOOR, K.; CHOI, Y. H.; JEON, J. Y.; JO, I. H. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (*Vitis vinifera*) seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 57, n. 11, p. 4988-4994, 2009.
- GIBBS, B.F.; ZOUGMAN, A.; MASSE, R.; MULLIGAN, C. Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food. **Food Research International**. v. 37, n. 2, p. 123–131, 2004.
- GRANT, G.; WATT, W.B.; STEWART, J.C.; PUSZTAI, A. Changes in the small intestine and hind-leg muscles of rats induced by dietary soybean (Glicine max) proteins. **Medical Science Research**. v. 15, p. 1355–1356, 1987.
- HA, T. J.; LEE, M. H.; PARK, C. H.; PAE, S. B.; SHIM, K. B.; KO, J. M.; SHIN, S. O.; BAEK, I. Y.; PARK, K. Y. Identification and characterization of anthocyanins in yard-long beans (*Vigna unguiculata* ssp. *sesquipedalis* L.) by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization/mass spectrometry (HPLC- DAD- ESI/MS) analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 4, p. 2571–2576, 2010.
- HAIWEI, R. Antioxidant and free radical-scavenging activities of black soybean peptides (BSP). **International Journal of Agricultural and Biological Engineering**. v. 3, n. 2, p. 64-69, 2010.
- HERRERA, M. C.; LUQUE DE CASTRO, M. D. Ultrasound-assisted extraction for the analysis of phenolic compounds in strawberries. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. v. 379, n. 7, p. 1106-1112, 2004.
- HOLLMAN, P. C. H.; HERTOOG, M. G. L.; KATAN, M. B. Analysis and health effects of flavonoids. **Food Chemistry**, v. 57, n. 1, p. 43–46, 1996.
- HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, n.6, p.1841-1856, 2005.
- HUANG, R. Y.; CHOU, C. C. Heating affects the content and distribution profile of isoflavones in steamed black soybeans and black soybean koji. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 18, p. 8484-8489, 2008.
- HUANG, R. Y.; CHOU, C. C. Stability of isoflavone isomers in steamed black soybeans and black soybean koji stored under different conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 5, p. 1927-1932, 2009.
- HUANG, R. Y.; WANG, Y. J.; SHEEN, L. Y.; CHOU, C. C. Storage temperature and packaging condition affect the total phenolic content and antioxidant activity of black soybeans and koji. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 45, n. 3, p. 437–443, 2010.

- IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V. I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chemistry**. v. 126, p. 1821-1835, 2011.
- IKEDA, I.; SUGANO, M. Some aspects of mechanism of inhibition of cholesterol absorption by sitosterol. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 732, p. 651–658, 1983.
- INGAKI, S.; MORIMURA, S.; GONDO, K.; TANG, Y. Q.; AKUTAGAWA, H.; KIDA, K. Isolation of tryptophol as an apoptos-inducing component of vinegar produced from boiled extract of black soybean in human monoblastic leukemia U937 cells. **Bioscience, Biotechnology, Biochemistry**. v. 71, p. 371–379, 2007.
- ISANGA, J.; ZHANG, G. N. Soybean bioactive components and their implications to health - A review. **Food Reviews International**, v. 24, n. 2, p. 252-276, 2008.
- JACOBS, E. T.; LANZA, E.; ALBERTS, D. S.; HSU, C. H.; JIANG, R.; SCHATZKIN, A.; THOMPSON, P. A.; MARTINEZ, M. E. Fiber, sex, and colorectal adenoma: results of a pooled analysis. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 83, p. 343-349, 2006.
- JANG, E. H.; KO, J. H.; AHN, C. W.; LEE, H. H. ; SHIN, J. K.; CHANG, S. J.; PARK, C. S.; KANG, J. H. *In vivo* and *in vitro* application of black soybean peptides in the amelioration of endoplasmic reticulum stress and improvement of insulin resistance. **Life Sciences**, v. 86, n. 7-8, p. 267–274, 2010a.
- JANG, H.; HA, U.; KIM, S.; YOON, B.; HAN, D.; YUK, S.; KIM, S. Anthocyanin extracted from black soybean reduces prostate weight and promotes apoptosis in the prostatic hyperplasia-induced rat model. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 58, p. 12686-12691, 2010b.
- 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, n. 4, p. 1112–1116, 2010.
- JIA, Z.; TANG, M.; WU, J. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**. v. 64, p. 555-559, 1999.
- JIMENEZ-ESCRIG, A.; SERRA, M. T.; RUPEREZ, P. Non-digestible carbohydrates in Brazilian soybean seeds [Glycine max (L.) Merrill]. **International Journal of Food Science & Technology**. v. 45, n. 12, p. 2524-2530, 2010.

- JIN-RUI, X.; ZHANG, M. W.; XING-HUA, L.; ZHANG-XIONG, L.; RUI-FEN, Z.; LING, S.; LI-JUAN, Q. Correlation between antioxidation and the content of total phenolics and anthocyanin in black soybean accessions. **Agricultural Sciences in China**, v. 6, n. 2, p. 150–158, 2007.
- JING, P.; GIUSTI, M. M. Effects of extraction conditions on improving the yield and quality of an anthocyanin-rich purple corn (*Zea mays* L.) color extract. **Journal of Food Science**. v. 72, n. 7, p. 363-368, 2007.
- JUN-MING, S.; BAO-LI, S.; FEN-XIA, H.; SHU-RONG, Y.; HUA, Y.; KIKUCHI, A. Rapid HPLC method for determination of 12 isoflavone components in soybean seeds. **Agricultural Sciences in China**. v. 10, n. 1, p. 70-77, 2011.
- KAHKONEN, M. P.; HOPIA, A. I.; HEINONEN, M. Berry phenolics and their antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 49, n. 8, p. 4076-4082, 2001.
- KAMIZAKE, N. K. K.; NOVACKI, C.; ZAIA, D. A. M. Determination of total proteins and lipids, ash, humidity, macro (Ca, Mg, K) and micro (Fe, Cu, Mn, Zn) elements in varieties of soybeans [*Glycine max* (L.) Merrill] not transgenics and transgenics. **Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 27, n. 2, p. 175–181, 2006.
- KANG, J.; BADGER, T. M.; RONIS, M. J. J.; WU, X. Non-isoflavone phytochemicals in soy and their health effects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, p. 276–282, 2010.
- 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, n. 20, p. 6193-6199, 2004.
- KIM, D. O.; LEE, C. Y. Extraction and isolation of polyphenolics. In: WROLSTAD, R. E. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, John Wiley & Sons, Inc., cap. I1.2, 2002.
- KIM, H.Y.; YU, R.; KIM, J.S.; KIM, Y.K.; SUNG, M.K. Antiproliferative crude soy saponin extract modulates the expression of protein kinase C, and cyclooxygenase-2 in human colon cancer cells. **Cancer Letter**. v. 210, n. 1, p. 1–6, 2004.
- KIM, J. A.; JUNG, W. S.; CHUN, S. C.; YU, C. Y.; MA, K. H.; GWAG, J. G.; CHUNG, I. M. A correlation between the level of phenolic compounds and the antioxidant capacity in cooked-with-rice and vegetable soybean (*Glycine max* L.) varieties. **European Food Research and Technology**, v. 224, n. 2, p. 259-270, 2006a.

- KIM, E. H.; KIM, S. H.; CHUNG, J. I.; CHI, H. Y.; KIM, J. A.; CHUNG, I. M. Analysis of phenolic compounds and isoflavones in soybean seeds (*Glycine max* (L.) Merrill) and sprouts grown under different conditions. **European Food Research and Technology**, v. 222, n. 1-2, p. 201-208, 2006b.
- KIM, J. M.; KIM, J. S.; YOO, H.; CHOUNG, M. G.; SUNG, M. K. Effects of black soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] seed coats and its anthocyanidins on colonic inflammation and cell proliferation *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 18, p. 8427-8433, 2008.
- KIM, H. G.; KIM, G. W.; OH, H.; YOO, S. Y.; KIM, Y. O.; OH, M. S. Influence of roasting on the antioxidant activity of small black soybean (*Glycine max* L. Merrill). **LWT – Food Science and Technology**, v. 44, n. 4, p. 992-998, 2011a.
- 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, 2011b.
- KOH, K.; YOUN, J. E.; KIM, H. S. Identification of anthocyanins in black soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) varieties. **Journal of Food Science and Technology**, 2011
- KRENN, L.; STEITZ, M.; SCHILICHT, C.; KURTH, H.; GAEDCKE, F. Anthocyanin- and proanthocyanidin-rich extracts of berries in food supplements – analysis with problems. **Pharmazie**, v. 62, n. 11, p. 803-812, 2007.
- KUMAR, V.; RANI, A.; DIXIT, A. K.; BHATNAGAR, D.; CHAUHAN, G. S. Relative changes in tocopherols, isoflavones, total phenolic content, and antioxidative activity in soybean seeds at different reproductive stages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 7, p. 2705-2710, 2009.
- 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, n. 1, p. 323–328, 2010.
- KWON, S.H.; AHN, I.S.; KIM, S.O.; *et al.* Anti-obesity and hypolipidemic effects of black soybean anthocyanins. **Journal of Medicinal Food**, v. 10, n. 3, p. 552-556, 2007.
- LAFAY, S.; GIL-IZQUIERDO, A. Bioavailability of phenolic acids. **Phytochemistry Reviews**, v. 7, n. 2, p. 301-311, 2008.

- LALEH, G. H.; FRYDOONFAR, H.; HEIDARY, R.; JAMEEI, R.; ZARE, S. The effect of light, temperature, pH and species on stability of anthocyanin pigments in four berberis species. **Pakistan Journal of Nutrition**. v. 5, n. 1, p. 90-92, 2006.
- LEE, J.; DURST, R. W.; WROLSTAD, R. E. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 88, n. 5, p. 1269-1278, 2005.
- LEE, S. J.; KIM, J. J.; MOON, H. I.; AHN, J. K.; CHUN, S. C.; JUNG, W. S.; LEE, O. K.; CHUNG, I. M. Analysis of isoflavones and phenolic compounds in Korean soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] seeds of different seed weights. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 8, p. 2751-2758, 2008a.
- LEE, J.; RENNAKER, C.; WROLSTAD, R. E. Correlation of two anthocyanin quantification methods: HPLC and spectrophotometric methods. **Food Chemistry**, v. 110, n. 3, p. 782-786, 2008b.
- LEE, J. H.; KANG, N. S.; SHIN, S. K.; SHIN, S. H.; LIM, G. S.; 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, n. 1, p. 226-231, 2009.
- LEE, S. J.; SEGUIN, P.; KIM, J. J.; MOON, H. I.; RO, H. M.; KIM, E. H.; SEO, S. H.; KANG, E. Y.; AHN, J. K.; CHUNG, I. M. Isoflavones in Korean soybeans differing in seed coat and cotyledon color. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, n. 2, p. 160-165, 2010.
- 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.
- LI, X.; YAO, S.; TU, B.; LI, X. ; JIA, C.; SONG, H. Determination and comparison of flavonoids and anthocyanins in Chinese sugarcane tips, stems, roots and leaves. **Journal of Separation Science**, v. 33, p. 1216-1223, 2010.
- LIENER, I.E. Implications of antinutritional components in soybean foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 34, p. 31-67, 1994.
- LIN, P. Y.; LAI, H. M. Bioactive compounds in legumes and their germinated products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 11, p. 3807-3814, 2006.
- LIRA, S. A. **Análise de correlação: abordagem teórica e de construção dos coeficientes com aplicações**. Tese (Mestrado em Ciência) – Universidade Federal do Paraná, 209 f., 2004.

- LIU, K. Soybeans as a powerhouse of nutrients and phytochemicals. In: LIU, K. **Soybeans as Functional Foods and Ingredients**, Illinois: AOCS Press, cap. 1, 2004a.
- LIU, K. Edible soybean products in the current market. In: LIU, K. **Soybeans as Functional Foods and Ingredients**, Illinois: AOCS Press, cap. 2, 2004b.
- LUTHRIA, D.; PASTOR-CORRALES, M. Phenolic acids content of fifteen dry edible bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n. 2-3, p. 205-211, 2006.
- LUTHRIA, D.L.; BISWAS, R.; NATARAJAN, S. Comparison of extraction solvents and techniques used for the assay of isoflavones from soybean, **Food Chemistry**, v. 105, p. 325-333, 2007.
- MAENZ, D.D.; IRISH, G.G.; CLASSEN, H.L. Carbohydrate-binding and agglutinating lectins in raw and processed soybean meals. **Animal Feed Science Technology**, v. 76, n. 3-4, p. 335-343, 1999.
- MALENCIC, D.; MAKSIMOVIC, Z.; POPOVIC, M.; MILADINOVIC, J. Polyphenol contents and antioxidant activity of soybean seed extracts. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 14, p. 6688-669, 2008.
- MALENCIC, D.; CVEJIC, J.; MILADINOVIC, J. Polyphenol content and antioxidant properties of colored soybean seeds from Central Europe. **Journal of Medicinal Food**, v. 15, n. 1, p. 89-95, 2012.
- MALESEV, D.; KUNTIC, V. Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. **Journal of Serbian Chemists' Society**, v. 72, n. 10, p. 921-938, 2007.
- MARATHE, S. A.; RAJALAKSHMI, V.; JAMDAR, S. N.; SHARMA, A. Comparative study on antioxidant activity of different varieties of commonly consumed legumes in India. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 2005-2012, 2011.
- MCCUE, P.; SHETTY, K. Health benefits of soy isoflavonoids and strategies for enhancement: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 44, n. 5, p. 361-367, 2004.
- MEJIA, E.; LUMEN, B. O. Soybean bioactive peptides: A new horizon in preventing chronic disease. **Sexuality, Reproduction and Menopause**, v. 4, n. 2, p. 91-95, 2006.
- MENEZES, N. L.; GARCIA, D. C.; RUBIN, S. A. L.; BERNARDI, G. E. Caracterização de vagens e sementes de soja. **Ciência Rural**, v. 27, n. 3, p. 387-391, 1997.

- MERKEN, H. M.; BEECHER, G. R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 3, p. 577-599, 2000.
- MERTZ, L. M.; HENNING, G. A.; CRUZ, H. L.; MENEGHELLO, G. E.; FERRARI, C. S.; ZIMMER, P. D. Structural differences between soybean seeds coat with contrasting permeability. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 1, p. 23-29, 2009.
- MESSINA, M. A brief historical overview of the past two decades of soy and isoflavone research. **The Journal of Nutrition**, v. 140, n. 7, p. 1350-1354, 2010.
- MILES, C.W. Effects of vegetable proteins on iron and zinc absorption and availability in humans. **Journal of the American Chemical Society**, v. 66, p. 924-931, 1989.
- MIRA, N. V. M.; MASSARETTO, I. L.; PASCUAL, C. S. C. I.; MARQUEZ, U. M. L. Comparative study of phenolic compounds in different Brazilian rice (*Oryza sativa* L.) genotypes. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 22, p. 405-409, 2009.
- MOGHADASIAN, M.H.; FROHLICH, J.J. Effects of dietary phytosterols on cholesterol metabolism and atherosclerosis clinical and experimental evidence. **American Journal of Medicine**, v. 107, p. 588-594, 1999.
- MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazil (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Journal of Science and Technology**, v.26, n.2, p.211-219, 2004.
- MORIYAMA, M.; OBA, K. Polyphenol content and antioxidant properties of colored soybean seeds from Central Europe. **Journal of Nutrition and Science Vitaminology**, v. 54, p. 1-6, 2008.
- MURAMATSU, T.; YATSUYA, H.; TOYOSHIMA, H.; SASAKI, S.; LI, Y.; OTSUKA, R.; WADA, K.; HOTTA, Y.; MITSUHASHI, H.; MATSUSHITA, K.; MUROHARA, T.; TAMAKOSHI, K. Higher dietary intake of alpha-linolenic acid is associated with lower insulin resistance in middle-aged Japanese. **Preventive Medicine**, v. 50, p. 272-276, 2010.
- NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography, A**, v. 1054, n. 1-2, p. 95-111, 2004.
- NAGATA, C. Factors to consider in the association between soy isoflavone intake and breast cancer risk. **Journal of Epidemiology**, v. 20, n. 2, p. 83-89, 2010.

- NGUEMENI, C.; DELPLANQUE, B.; ROVERE, C.; SIMON-ROUSSEAU, N.; GANDIN, C.; AGNANI, G.; NAHON, J. L.; HEURTEUAX, C.; BLONDEAU, N. Dietary supplementation of alpha-linolenic acid in an enriched rapeseed oil diet protects from stroke. **Pharmacological Research**. v. 61, p. 226-233, 2010.
- NIZAMUTDINOVA, I. T.; KIM, Y. M.; CHUNG, J. I.; SHIN, S. C.; JEONG, Y. K.; SEO, H. G.; LEE, J. H.; CHANG, K. C.; KIM, H. J. Anthocyanins from black soybean seed coats preferentially inhibit TNF- α -mediated induction of VCAM-1 over ICAM-1 through the regulation of GATAs and IRF-1. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 16, p. 7324-7330, 2009a.
- NIZAMUTDINOVA, I. T.; KIM, Y. M.; CHUNG, JONG IL; SHIN, S. C.; JEONG, Y.-K.; SEO, H. G.; LEE, JAE HEUN; CHANG, K. C.; KIM, H. J. Anthocyanins from black soybean seed coats stimulate wound healing in fibroblasts and keratinocytes and prevent inflammation in endothelial cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 11, p. 2806-2812, 2009b.
- OKAZAKI, Y.; IQBAL, M.; KAWAKAMI, N.; YAMAMOTO, Y.; TOYOKUNI, S.; OKADA, S. A beverage containing fermented black soybean ameliorates ferric nitrilotriacetate-induced renal oxidative damage in rats. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**. v. 47, p. 198-207, 2010.
- OKUBO, K.; KUDOU, S.; UCHIDA, T.; YOSHIKI, Y.; YOSHIKOSHI, M.; TONOMURA, M. Soybean saponin and isoflavonoids: structure and antiviral activity against human immunodeficiency virus in vitro. In: **Food Phytochemicals for Cancer Protection I: Fruits and Vegetables**, HUANG, M.T.; OSAWA, T.; HO, C.T.; ROSEN, R.T., **American Chemical Society**: Washington, DC; p. 330–339, 1994.
- OLIVEIRA, M. A.; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; MANDARINO, J.M.G; 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, n. 1, p. 23-29, 2010.
- OMONI, A. O.; ALUKO, R. E. Soybean foods and their benefits: potential mechanisms of action. **Nutrition Reviews**, v. 63, n. 8, p. 272–283, 2005.
- ORGAARD, A.; JENSEN, L. The effects of soy isoflavones on obesity. **Experimental Biology and Medicine**, v. 233, n. 9, p. 1066-1080, 2008.
- OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.4619-4626, 2001.

- PARK, K. Y.; KWON, S. H.; AHN, I. S.; KIM, S. O.; KONG, C. S.; CHUNG, H. Y.; DO, M. S. Weight reduction and lipid lowering effects of black soybean anthocyanins in rats fed high fat diet. **Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB J)**. v. 21, p. 842–846, 2007.
- PASCUAL-TERESA, S.; MORENO, D. A.; GARCIA-VIGUERA, C. Flavanols and anthocyanins in cardiovascular health: A review of current evidence. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, p. 1679–1703, 2010.
- PAUCAR-MENACHO, L. M.; AMAYA-FARFÁN, J.; BERHOW, M. A.; MANDARINO, J. M. G.; MEJIA, E. G.; CHANG, Y. K. A high-protein soybean cultivar contains lower isoflavones and saponins but higher minerals and bioactive peptides than a low-protein cultivar. **Food Chemistry**, v. 120, n. 1, p. 15–21, 2010.
- PENALVA, J. L.; NURMI, T.; ADLERCREUTZ, H. A simplified HPLC method for total isoflavones in soy products. **Food Chemistry**. v. 87, n. 2, p. 247-305, 2004.
- PINTO, M. D. S.; LAJOLO, F. M.; Genovese, M. I. Effect of storage temperature and water activity on the content and profile of isoflavones, antioxidant activity, and in vitro protein digestibility of soy protein isolates and defatted soy flours. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 6340–6346, 2005.
- PISARIKOVA, B.; ZRALY, Z. Dietary fibre content in lupine (*Lupinus albus* L.) and soya (*Glycine max* L.) seeds. **Acta Veterinaria Brno**. v. 79, n. 2, p. 211-216, 2010.
- POZO-INSFRAN, D.; BRENES, C. H.; TALCOTT, S. T. Phytochemical composition and pigment stability of açai (*Euterpe oleracea* Mart.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 1539–1545, 2004.
- 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.
- PROCTOR, J. R.; WATTS, B. M. Development of a modified Mattson bean cooker procedure based on sensory panel cookability evaluation. **Canadian Institute of Food Science and Technology**. v. 20, n. 1, p. 9-14, 1987.
- REDONDO-CUENCA, A.; VILLANUEVA-SUAREZ, M.; RODRIGUEZ-SEVILLA, M.; MATEOS-APARICIO, I. Chemical composition and dietary fibre of yellow and green commercial soybeans (*Glycine max*). **Food Chemistry**. v. 101, n. 3, p. 1216-1222, 2006.
- RIBEIRO, A. P. B.; GRIMALDI, R.; GIOIELLI, L. A.; GONÇALVES, L. A. G. Zero trans fats from soybean oil and fully hydrogenated soybean oil: Physico-chemical properties and food applications. **Food Research International**. v. 42, n. 3, p. 401-410, 2009.

- RIEDL, K. M.; LEE, J. H.; RENITA, M.; MARTIN, S. K. S.; SCHWARTZ, S. J.; VODOVOTZ, Y. Isoflavone profiles, phenol content, and antioxidant activity of soybean seeds as influenced by cultivar and growing location in Ohio. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, n. 7, p. 1197-1206, 2007.
- ROBBINS, R. J.; BEAN, S. R. Development of a quantitative high-performance liquid chromatography-photodiode array detection measurement system for phenolic acids. **Journal of Chromatography, A**, v. 1038, n. 1-2, p. 97-105, 2004.
- RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia sequencial de planejamentos. 1 ed., Campinas: Casa do Pão Editora, 326p., 2005.
- ROTUNDO, J. L.; WESTGATE, M. E. Meta-analysis of environmental effects on soybean seed composition. **Field Crops Research**, v. 110, p. 147-156, 2009.
- ROSSO, V. V.; MERCADANTE, A. Z. HPLC-PDA-MS/MS of anthocyanins and carotenoids from dovyalis and tamarillo fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 9135-9141, 2007.
- ROSSO, V. V.; HILLEBRAND, S.; MONTILLA, E. C.; BOBBIO, F. O.; WINTERHALTER, P.; MERCADANTE, A. Z. Determination of anthocyanins from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) and açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) by HPLC-PDA-MS/MS. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, p. 291-299, 2008.
- SAHA, S.; GUPTA, A.; MAHAJAN, V.; KUNDU, S.; GUPTA, H. S. Physicochemical and nutritional attributes in 20 black soybean lines (*Glycine max* L.) of Himalayan Region, India. **Journal of Food Quality**, v. 31, p. 79-95, 2008.
- SACKS, F. M.; LICHTENSTEIN, A.; HORN, L. V.; HARRIS, W.; KRIS-ETHERTON, P.; WINSTON, M. Soy protein, isoflavones, and cardiovascular health. **Circulation – Journal of the American Heart Association**, v. 113, p. 1034-1044, 2006.
- SAKAKIBARA, H.; HONDA, Y.; NAKAGAWA, S.; ASHIDA, H.; KANAZAWA, K. Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 3, p. 571-581, 2003.
- SAKTHIVELU, G.; AKITHA DEVI, M. K.; GIRIDHAR, P.; RAJASEKARAN, T.; RAVISHANKAR, G. A.; NIKOLOVA, M. T.; ANGELOV, G. B.; TODOROVA, R. M.; KOSTURKOVA, G. P. Isoflavone composition, phenol content, and antioxidant activity of soybean seeds from India and Bulgaria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 6, p. 2090-2095, 2008.

- SAMUEL, P.; ZAKHARKIN, S. O.; SPITZNAGEL, E.; GREAVES, K. A.; BUTTEIGER, D. N.; KRUL, E. S. Meta-analysis confirms soy protein's cholesterol lowering efficacy. **Circulation – Journal of the American Heart Association**. v. 118, p. 1122, 2008.
- SÁCHEZ-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 highbush blueberry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 4889-4896, 2003.
- SEGUIN, P.; TREMBLAY, G.; PAGEAU, D.; LIU, W. Soybean tocopherol concentrations are affected by crop management. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p.5495-5501, 2010.
- SEIBEL, N. F.; BELEIA, A. P. Carbohydrates from cotyledon fibers and proteins of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) derivatives. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 3, p. 607-613, 2008.
- SELMA, M. V.; ESPIN, J. C. TOMAS-BABERAN, F. Interaction between phenolics and gut microbiota: role in human health. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 57, n. 15, p. 6485-6501, 2009.
- SETCHELL, K. D. R.; BROWN, N. M.; ZIMMER-NECHEMIAS, L.; BRASHEAR, W. T.; WOLFE, B. 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. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 76, n. 2, p. 447-453, 2002.
- SHIH, M. C.; YANG, K. T.; KUO, S. J. Quality and antioxidative activity of black soybean tofu as affected by bean cultivar. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 67, n. 2, p. 480–484, 2002.
- SHINOMIYA, K.; TOKUNAGA, S.; SHIGEMOTO, Y.; KAMEI, C. Effect of seed coat extract from black soybeans on radial maze performance in rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**. v. 32, p. 757–760, 2005.
- SHON, M. Y.; LEE, J.; CHOI, J. H.; CHOI, S. Y.; NAM, S. H. ; SEO, K. I.; LEE, S. W.; SUNG, N. J.; PARK, S. K. Antioxidant and free radical scavenging activity of methanol extract of chungkukjang. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, n. 2, p. 113-118, 2007.
- SHURTLEFF, W.; AOYAGI, A. History of soy in South America. In: **History of Soybeans and Soyfoods in South America (1882-2009)**, California: Soyinfo Center, cap. 5, 2009.

- SILVA, M. R.; SILVA, M. A. A. P. Fatores antinutricionais: inibidores de proteínas e lectinas. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 13, n. 1, p. 3-9, 2000.
- SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMMELA-RAVENSON, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods of Enzymology**, v.299, p.152-178, 1999.
- SINNECKER, P. **Degradação da clorofila durante a maturação e secagem de sementes de soja**. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade de São Paulo, 103 f., 2002.
- SLAVIN, M; CHENG, Z.; LUTHER, M.; KENWORTHY, W; 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, n. 1, p. 20-27, 2009a.
- SLAVIN, M.; KENWORTHY, W.; YU, L. Antioxidant properties, phytochemical composition, and antiproliferative activity of Maryland-grown soybeans with colored seed coats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 23, p. 11174-11185, 2009b.
- SOUCI, S. W. *et al.* **Food composition and nutrition tables**. 7th ed. Stuttgart: Ed. Medpharm Scientific Publishers, p. 1364, 2007.
- SOYFOODS. **The U.S. Market 2011**. Soyatech, Inc., 2012. Disponível em: <http://www.soyfoods.org/soy-information/sales-and-trends> Acessado em: 25-V-2012.
- STOLF-MOREIRA, R.; MEDRI, M. E.; NEUMAIER, N.; LEMOS, N. G.; PIMENTA, J.A.; TOBITA, S.; BROGIN, R. L.; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C.; OLIVEIRA, M. C. N.; FARIAS, J. R. B.; ABDELNOOR, R. V.; NEPOMUCENO, A. L. Soybean physiology and gene expression during drought. **Genetics and Molecular Research**. v. 4, p. 1946-1956, 2010.
- SUGANO, M.; GOTO, S.; YAMADA, Y.; YOSHIDA, K.; HASHIMOTO, Y.; MATSUO, T.; KIMOTO, T. Cholesterol-lowering activity of various undigested fractions of soybean protein in rats. **Journal of Nutrition**. v. 120, p. 977–985, 1990.
- TAKAHASHI, R.; OHMORI, R.; KIIYOSE, C.; MOMIYAMA, Y.; OHSUZU, F.; KONDO, K. Antioxidant activities of black and yellow soybeans against low density lipoprotein oxidation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 11, p. 4578-4582, 2005.
- TAKAHATA, Y.; OHNISHI-KAMEYAMA, M.; FURUTA, S.; TAKAHASHI, M.; SUDA, I. Highly polymerized procyanidins in brown soybean seed coat with a high radical-scavenging activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 12, p. 5843-5847, 2001.

- TROSZYNSKA, A.; CISKA, E. Phenolic compounds of seed coats of white and coloured varieties of pea (*Pisum sativum* L.) and their total antioxidant activity. **Czech Journal of Food Sciences**. v. 20, n. 1, p. 15-22, 2002.
- TSOYI, K.; PARK, H. B.; KIM, Y. M.; CHUNG, J. I.; SHIN, S. C.; LEE, W. S.; SEO, H. G.; LEE, J. H.; CHANG, K. C.; KIM, H. J. Anthocyanins from black soybean seed coats inhibit UVB-induced inflammatory cyclooxygenase-2 gene expression and PGE₂ production through regulation of the nuclear factor- κ B and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 19, p. 8969-8974, 2008a.
- TSOYI, K.; PARK, H. B.; KIM, Y. M.; CHUNG, J. I.; SHIN, S. C.; SHIM, H. J.; LEE, W. S.; SEO, H. G.; LEE, J. H.; CHANG, K. C.; KIM, H. J. Protective effect of anthocyanins from black soybean seed coats on UVB-induced apoptotic cell death in vitro and in vivo. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 22, p. 10600-10605, 2008b.
- TYUG, T. S.; PRASAD, K. N.; ISMAIL, A. Antioxidant capacity, phenolics and isoflavones in soybean by-products. **Food Chemistry**, v. 123, n. 3, p. 583-589, 2010.
- UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS – UNICAMP. Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação – NEPA, 2006. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos - TACO**. 2 ed. Disponível em: http://www.unicamp.br/nepa/taco/contar/taco_versao2.pdf. Acesso em: 1 fev 2011.
- UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental/BRASILFOODS. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos-USP**, 2008. Versão 5.0. Disponível em: <http://www.fcf.usp.br/tabela>. Acesso em: 1 fev 2011.
- USDA – United States Department of Agriculture. Agricultural Research Service. **USDA Nutrient Database for Standard Reference**, 2006. Disponível em: <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/Data/SR16/sr16.html>. Acesso em: 1 fev 2011.
- VALLS, J.; MILLÁN, S.; M. MARTÍ, P. BORRÀS, E.; AROLA, L. Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 7143-7172, 2009.
- VAN DAMME ELS, J.M.; PEUMANS, W.J.; PUSZTAI, A.; BARDOCZ, S. Handbook of plant lectins: Properties and biomedical applications. **Wiley**: Chichester; p. 224, 1997.
- VAN EE, J. H. Soy constituents: modes of action in low-density lipoprotein management. **Nutrition Reviews**. v. 67, n. 4, p. 222-234, 2009.

- VANCLEAVE, J. **John Wiley & Sons, Inc.** Disponível em: <http://www.education.com/science-fair/article/seed-parts/> Acesso em: 25 mar 2012.
- VIEIRA, C.R.; CABRAL, L.C.; PAULA, A.C.O. de. Caracterização física e tecnológica de seis cultivares de soja plantadas no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.17, p.291-294, 1997.
- VIEIRA, C.R.; CABRAL, L.C.; PAULA, A.C.O. de. Composição centesimal e conteúdo de aminoácidos, ácidos graxos e minerais de seis cultivares de soja destinadas à alimentação humana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, n. 7, p.1277-1283, 1999.
- WANG, N.; DAUN, J. K.; MALCOLMSON, L. J. Relationship between physicochemical and cooking properties, and effects of cooking on antinutrients, of yellow field peas (*Pisum sativum*). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 83, p. 1228–1237, 2003.
- WANG, Y. J.; SHEEN, L. Y.; CHOU, C. C. Storage effects on the content of anthocyanin, mutagenicity and antimutagenicity of black soybean koji. **LWT-Food Science and Technology**, v. 43, n. 4, p. 702–707, 2010.
- WHENT, M.; SLAVIN, M.; KENWORTHY, W.; YU, L.. Potential relationships between fatty acid compositions and phytochemicals of selected low linolenic soybeans grown in Maryland. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 87, n. 5, p. 549-558, 2010.
- WHENT, M.; LV, J.; LUTHRIA, D.L.; KENWORTHY, W.; YU, L. Isoflavone composition and antioxidant capacity of modified-lipoxygenase soybeans grown in Maryland. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 12902-12909, 2011.
- WOODWARD, G.; KROON, P.; CASSIDY, A.; KAY, C. Anthocyanin stability and recovery: implications for the analysis of clinical and experimental samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 12, p. 5271-5278, 2009.
- WROLSTAD, R. E.; DURST, R. W.; LEE, J. Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, n. 9, p. 423-428, 2005.
- WU, Q.; WANG, M.; SIMON, J. E. Determination of isoflavones in red clover and related species by high-performance liquid chromatography combined with ultraviolet and mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography**, v. 1016, p. 195-209, 2003.

- WU, X.; GU, L.; PRIOR, R. L.; MCKAY, S. Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in some cultivars of Ribes, Aronia, and Sambucus and their antioxidant capacity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 7846-7856, 2004.
- WU, X.; BEECHER, G. R.; HOLDEN, J. H.; HAYTOWITZ, D. B.; GEBHARDT, S. E.; PRIOR, R. L. Concentration 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.
- XU, B.; CHANG, S. K. C. A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. **Journal of Food Science**. v. 72, n. 2, p. 159-166, 2007a.
- XU, B.; CHANG, S. K. C. Comparative analyses of phenolic composition, antioxidant capacity, and color of cool season legumes and other selected food legumes. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 2, p. 167-177, 2007b.
- XU, B.; CHANG, S. K. C. Antioxidant capacity of seed coat, dehulled bean, and whole black soybeans in relation to their distributions of total phenolics, phenolic acids, anthocyanins, and isoflavones. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 18, p. 8365-8373, 2008a.
- XU, B.; CHANG, S. K. C. Characterization of phenolic substances and antioxidant properties of food soybeans grown in the North Dakota–Minnesota region. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 19, p. 9102-9113, 2008b.
- XU, B. J.; CHANG, S.K.C. total phenolics, phenolic acids, isoflavones, and anthocyanins and antioxidant properties of yellow and black soybeans as affected by thermal processing. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 56, p. 7165-7175, 2008c.
- XU, B. J.; CHANG, S.K.C. Total phenolic content and antioxidant properties of eclipse black beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by processing methods. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 2, p. 19-27, 2008d.
- XU, B.; CHANG, S. K. C. Total phenolic, phenolic acid, anthocyanin, flavan-3-ol, and flavonol profiles and antioxidant properties of pinto and black beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by thermal processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 11, p. 4754-4764, 2009a.
- XU, B.; CHANG, S. K. C. Isoflavones, flavan-3-ols, phenolic acids, total phenolic profiles, and antioxidant capacities of soy milk as affected by ultrahigh-temperature and traditional processing methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 11, p. 4706-4717, 2009b.

- XU, B.; CHANG, S. K. C. Reduction of antiproliferative capacities, cell-based antioxidant capacities and phytochemical contents of common beans and soybeans upon thermal processing. **Food Chemistry**, v. 129, p. 974-981, 2011.
- YAMAI, M.; TSUMURA, K.; KIMURA, M.; FUKUDA, S.; MURAKAMI, T.; KIMURA, Y. Antiviral activity of a hot water extract black soybean against a human respiratory virus. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**. v. 67, p. 1071–1079, 2003.
- YAMAYA, A.; ENDO, Y.; FUJIMOTO, K.; KITAMURA, K. Effects of genetic variability and planting location on the phytosterols content and composition in soybean seeds. **Food Chemistry**. v.120, n. 4, p. 1071–1075, 2007.
- YANG, K.; JEONG, N.; MOON, J. K.; LEE, Y. H.; LEE, S. H.; KIM, H. M.; HWANG, C. H.; BACK, K.; PALMER, R. G.; JEONG, S. C. Genetic analysis of genes controlling natural variation of seed coat and flower colors in soybean. **Journal of Heredity**. v. 101, n. 6, p. 757-768, 2010.
- YAO, Y.; SANG, W.; ZHOU, M.; REN, G. Antioxidant and alpha-glucosidase inhibitory activity of colored grains in china. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 2, p. 770–774, 2010.
- YEN, G.-C.; LAI, H.-H. Inhibition of reactive nitrogen species effects in vitro and in vivo by isoflavones and soy-based food extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 27, p. 7892-7900, 2003.
- YERRAMSETTY, V.; MATHIAS, K.; BUNZEL, M.; ISMAIL, B. Detection and structural characterization of thermally generated isoflavone malonylglucoside derivatives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 174–183, 2011.
- YOSHIKI, Y.; KINUMI, M.; KAHARA, T.; OKUBO, K. Chemiluminescence of soybean saponins in the presence of active oxygen species. **Plant Science** 116, p. 125–129, 1996.
- YUAN, J. P.; WANG, J. H.; LIU, X. Metabolism of dietary soy isoflavones to equol by human intestinal microflora – implications for health. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 51, n. 7, p. 765-781, 2007.
- YEUNG, H.; EHLERS, J. D.; WANISKA, R. D.; ALVIOLA, J. N.; ROONEY, L. W. Rapid screening methods to evaluate cowpea cooking characteristics. **Field Crops Research**. v. 112, p. 245-252, 2009.

- 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 of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 5935-5944, 2011.
- ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, v. 64, p. 555-559, 1999.