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

**DEGRADAÇÃO DA CLOROFILA DURANTE A MATURAÇÃO E
SECAGEM DE SEMENTES DE SOJA**

PATRÍCIA SINNECKER

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:

Prof^a. Dr^a. Ursula Maria Lanfer Marquez

São Paulo
2002

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

Sinnecker, Patrícia
S617d Degradação da clorofila durante a maturação e secagem
de sementes de soja / Patrícia Sinnecker. -- São Paulo, 2002.
103p.

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

Orientador: Lanfer Marquez, Ursula Maria

1. Soja : Bioquímica dos alimentos 2. Bromatologia
I. T. II. Lanfer Marquez, Ursula Maria, orientador.

641.35655 CDD

PATRÍCIA SINNECKER

DEGRADAÇÃO DA CLOROFILA DURANTE A MATURAÇÃO E SECAGEM DE
SEMENTES DE SOJA

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof.^a. Dr.^a. Ursula Maria Lanfer Marquez
orientador/presidente

Prof. Dr. Alexandre Lima Nepomuceno
1.^o. examinador

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

Prof. Dr. Luiz Antônio Gioielli
3.^o. examinador

Prof. Dr. Jorge Mancini Filho
4.^o. examinador

São Paulo, 11 de abril de 2002.

O FAZENDEIRO E OS FILHOS

Esopo

Um fazendeiro sentiu a morte próxima e chamou os filhos para contar um segredo.

— Meus filhos, eu vou morrer. Quero dizer que no nosso terreno há um tesouro escondido. Se vocês cavarem vão encontrar.

Logo que o pai morreu, os filhos pegaram pás e ancinhos e reviraram o terreno de todo jeito procurando o tesouro. Não acharam nada, mas a terra trabalhada produziu uma colheita nunca vista.

O TRABALHO É O VERDADEIRO TESOURO

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a Dr.^a Ursula Maria Lanfer Marquez, pela dedicada orientação, por apresentar-se sempre receptiva às idéias e discussões, pelo constante incentivo à pesquisa, por sempre despertar a admiração e a curiosidade científicas e pela grande amizade que surgiu deste convívio.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, pelo ensinamento.

Ao Ministério da Educação, através do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de formação de pesquisador I (doutorado).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão de auxílio à pesquisa, processo nº. 00/13767-8.

Ao Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), através do pesquisador Roberto Tetsuo Tanaka, da Seção de Leguminosas, pela cooperação técnico-científica e pelo fornecimento das amostras de soja.

Ao Laboratório de Instrumentação e Partículas (LIP) do Instituto de Física – USP, em especial aos professores Kiyomi Koide e Eduardo Luiz Augusto Macchione, pelos ensaios realizados por espectrometria de massa.

Aos amigos do Laboratório de Análise de Alimentos, pelo carinho, amizade e agradável convivência.

Aos meus pais, Vera e Alex, pelo apoio e confiança às minhas escolhas de vida.

Ao Daniel, pelo amor, companheirismo e incentivo constantes nesse período.

SUMÁRIO

	<i>Página</i>
LISTA DE TABELAS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	ii
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
1 - INTRODUÇÃO.....	01
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	04
2.1 - Soja.....	04
2.1.1 <i>Produção e utilização</i>	04
2.1.2 <i>Características da planta e da semente</i>	08
2.1.3 <i>Estádios de desenvolvimento das sementes</i>	09
2.1.4 <i>Sistemas de classificação</i>	12
2.2 - Óleos provenientes de sementes verdes.....	15
2.3 - Ocorrência de sementes oleaginosas com alto teor de clorofila.....	16
2.4 - Clorofila e derivados.....	20
3 - OBJETIVOS.....	30
4 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
4.1 - Amostras.....	31
4.1.1 <i>Origem, plantio e colheita</i>	31

4.1.2 <i>Secagem</i>	34
4.2 - Métodos analíticos.....	36
4.2.1 <i>Umidade das sementes</i>	36
4.2.2 <i>Extração dos pigmentos</i>	36
4.2.3 <i>Cromatografia líquida de alta eficiência</i>	40
4.2.3.1 <i>Equipamentos e reagentes</i>	40
4.2.3.2 <i>Condições cromatográficas</i>	41
4.2.3.3 <i>Preparo dos padrões</i>	42
4.2.3.4 <i>Separação e identificação dos compostos</i>	45
4.2.4 <i>Confirmação da identidade por espectrometria de massa</i>	45
4.3 – Tratamento de dados.....	47
 5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	 52
5.1 – Teores de umidade.....	52
5.2 – Tipos de pigmentos encontrados nas amostras.....	57
5.3 – Curvas de calibração e características espectrais dos padrões.....	60
5.3.1 <i>Clorofila a</i>	62
5.3.2 <i>Clorofila b</i>	64
5.3.3 <i>Feofitina a</i>	66
5.3.4 <i>Feofitina b</i>	68
5.3.5 <i>Carotenóides (luteína e beta-caroteno)</i>	70
5.4 – Alterações nos pigmentos durante a maturação no campo.....	71
5.5 – Alterações nos pigmentos durante a secagem à temperatura ambiente.....	75
5.6 – Alterações nos pigmentos após as secagens a 25° e 40°C.....	81
5.7 – Alterações nos pigmentos após a secagem a 75°C.....	86
 6 – CONCLUSÕES	 92
 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 94

LISTA DE TABELAS

	<i>Página</i>
Tabela 1 - Descrição dos estádios vegetativos e reprodutivos de soja propostos por Fehr & Caviness (1977).....	11
Tabela 2 - Datas de plantio e colheita das amostras de soja estudadas.....	33
Tabela 3 - Pigmentos investigados nas amostras de sementes de soja.....	43
Tabela 4 - Teores de umidade das sementes de soja recém-colhidas em diferentes estádios de maturação.....	52
Tabela 5 - Índices pluviométricos mensais referentes às safras de 1999 e 2001.....	54
Tabela 6 - Umidade residual de sementes secas em três condições: temperatura ambiente, estufa a 40°C e estufa a 75°C.....	56
Tabela 7 - Tempos de retenção dos pigmentos encontrados.....	59
Tabela 8 - Linearidade e limite de detecção dos padrões.....	61
Tabela 9 - Teores de clorofila e feofitina em sementes de soja IAC-17, colhida em seis estádios de maturação, durante a secagem à temperatura ambiente (25°C).....	76
Tabela 10 - Teores de clorofila e derivados, em sementes de soja IAS-5 e IAC-17, colhidas no ano de 1999, em cinco estádios de maturação e secas a 25° e 40°C.....	85
Tabela 11 - Teores de clorofila e derivados, em sementes de soja IAC-17, colhidas no ano de 2001, em seis estádios de maturação e secas a 25°, 40° e 75°C.....	89
Tabela 12 - Teores de clorofila e derivados, em sementes de soja IAC-22, colhidas no ano de 2001, em seis estádios de maturação e secas a 25°, 40° e 75°C.....	90

LISTA DE FIGURAS

	<i>Página</i>
Figura 1 - Espectro de absorção da clorofila.....	21
Figura 2 - Estrutura da clorofila a.....	22
Figura 3 - Esquema geral das transformações da clorofila em seus derivados.....	23
Figura 4 - Hidrólise química da clorofila.....	23
Figura 5 - Hidrólise enzimática da feofitina.....	24
Figura 6 - Hidrólise enzimática da clorofila.....	24
Figura 7 - Mecanismo proposto para a degradação da clorofila em tecidos de vegetais.....	26
Figura 8 - Esquema do terreno de plantio.....	32
Figura 9 - Planejamento experimental dos ensaios.....	35
Figura 10 - Fluxograma da extração dos pigmentos verdes.....	39
Figura 11 - Fluxograma do tratamento de dados para medir as alterações nos pigmentos durante a maturação no campo.....	49
Figura 12 - Fluxograma do tratamento de dados para medir as alterações nos pigmentos após os tratamentos de secagem (25°, 40° e 75°C).....	50
Figura 13 - Fluxograma do tratamento de dados para medir as alterações nos pigmentos durante a secagem lenta à temperatura ambiente.....	51
Figura 14 - Teores de umidade (%) em sementes de soja recém-colhidas em seis estádios de maturação.....	53
Figura 15 - Cromatograma representativo de um extrato de soja (IAC-17 colhida no estágio R ₆ , seca em estufa à 40°C)	58
Figura 16 - Curva de calibração obtida para clorofila a.....	62
Figura 17 - Espectro de absorção visível obtido para clorofila a	63
Figura 18 - Espectro de massa obtido para clorofila a	63
Figura 19 - Curva de calibração obtida para clorofila b	64

Figura 20 - Espectro de absorção visível obtido para clorofila b	65
Figura 21 - Espectro de massa obtido para clorofila b	65
Figura 22 - Curva de calibração obtida para feofitina a.....	66
Figura 23 - Espectro de absorção visível obtido para feofitina a.....	67
Figura 24 - Espectro de massa obtido para feofitina a.....	67
Figura 25 - Curva de calibração obtida para feofitina b	68
Figura 26 - Espectro de absorção obtido para feofitina b.....	69
Figura 27 - Espectro de massa obtido para feofitina b.....	69
Figura 28 - Espectro de absorção obtido para luteína.....	70
Figura 29 - Espectro de absorção obtido para beta-caroteno.....	70
Figura 30 - Teores de clorofila (ppm) e umidade (%) durante a maturação no campo.....	71
Figura 31 - Teores de feofitina (ppm) e umidade (%) durante a maturação no campo.....	72
Figura 32 - Teores de clorofila a durante a secagem à temperatura ambiente (25°C).....	77
Figura 33 - Teores de clorofila b durante a secagem à temperatura ambiente (25°C).....	77
Figura 34 - Teores de feofitina a durante a secagem à temperatura ambiente (25°C)	79
Figura 35 - Teores de feofitina b durante secagem à temperatura ambiente (25°C).....	79
Figura 36 - Degradação da clorofila em sementes de soja IAS-5, colhidas em diferentes estádios de maturação no ano 1999 e submetidas a duas condições de secagem.....	82
Figura 37 - Degradação da clorofila em sementes de soja IAC-17, colhidas em diferentes estádios de maturação no ano 1999 e submetidas a duas condições de secagem.....	82

Figura 38 - Degradação da clorofila em sementes de soja IAC-17, colhidas em diferentes estádios de maturação no ano 2001 e submetidas a três condições de secagem.....	87
Figura 39 - Degradação da clorofila em sementes de soja IAC-22, colhidas em diferentes estádios de maturação no ano 2001 e submetidas a três condições de secagem.....	88

RESUMO

A presença de clorofila e/ou seus derivados em óleos provenientes da extração de grãos verdes reduz sua estabilidade oxidativa, confere coloração escura indesejável e diminui a velocidade do processo de hidrogenação, sendo que a sua remoção, eleva o custo da refinação. Da mesma forma, a presença do pigmento reduz o valor comercial dos grãos, levando a prejuízos na comercialização, frente ao enorme volume de exportação brasileira. A retenção da clorofila em sementes oleaginosas, tais como a soja e a canola, pode ocorrer em condições de colheita prematura, que é utilizada para evitar perdas e quebras da safra. A degradação da clorofila é função do estágio de maturação, do teor de umidade e da temperatura de secagem. O pigmento pode ser degradado em condições de secagem lenta à temperatura ambiente, enquanto a utilização de secagem rápida em estufa resulta na retenção da cor verde. Porém, a influência de fatores externos no mecanismo de degradação da clorofila ainda não está totalmente esclarecida. Não está claro se a via de degradação química ocorre independentemente, ou concomitante à via enzimática e também ainda não estão elucidados quais produtos são formados quando os grãos são submetidos à secagem rápida. Neste trabalho investigou-se a degradação da clorofila e o aparecimento de seus derivados durante a maturação de três cultivares brasileiras de soja, colhidas em seis estádios de maturação e secas em três temperaturas: 25°, 40° e 75°C. Os pigmentos foram extraídos com acetona 80%, identificados por HPLC e confirmados por espectrometria de massa por dessorção de plasma. Tanto na maturação no campo, como na secagem a 25°C, o mecanismo de degradação parece ocorrer por via enzimática, possivelmente mediada por oxigenases, com formação de compostos incolores. A 40°C, houve retenção da cor verde e o mecanismo parece ocorrer por duas vias: enzimática, mediada por clorofilases, evidenciada pelo acúmulo de derivados defetilados e química, evidenciada pelo acúmulo de feofitinas. A 75°C, observou-se também o acúmulo de clorofila e feofitina, provavelmente pela inativação de todas as enzimas e o favorecimento da feofitinização. A degradação completa da clorofila somente pode ser obtida se a soja for colhida a partir do estágio R₇. Para evitar a retenção de clorofila e garantir a qualidade dos grãos para a comercialização, sugerimos a colheita em R₈, com secagem rápida ou lenta. Se for necessário antecipar a colheita, a secagem deve ser conduzida a temperaturas inferiores a 40°C.

ABSTRACT

The presence of chlorophyll or their derivatives in edible oils from green seeds decreases its oxidative stability, produces an undesirable color and impairs the hydrogenation process. Besides that, it reduces the commercial value of the crops. The removal of pigments from the crude oils by absorption imposes increasing costs of refining. The maintenance of green color in soybean seeds arises primarily from the common practice of early swathing in order to hasten the harvesting process and to reduce shattering losses. The rate of degreening depends on the stage of maturity, the initial moisture content and the drying temperature. The pigment can be degraded by ambient air drying, whereas fast drying with hot air results in the retention of the green color. Despite this, little is known about the influences of external conditions on the pathways of chlorophyll degradation. It is not clear whether the chemical route takes place independently or in addition to an enzymatic pathway, nor is it clear which breakdown products could be accumulated when seeds are submitted to fast drying. Studies on three Brazilian cultivars were performed over the whole maturation period by analyzing chlorophyll and its derivatives produced under three drying conditions: ambient temperature (25°C) and fast drying in oven at 40° and at 75°C with circulating air. Pigments were extracted with 80% acetone and were isolated by HPLC and analyzed by plasma desorption mass spectrometry (PDMS) to confirm their identities. During maturation on the field, as well as drying at 25°C, the degradation route showed to occur mainly enzymatically, probably mediated by oxygenases with formation of colourless compounds, as no further color pigments had been detected. At 40°C, both degradation processes seem to take place: enzymatic, probably mediated by chlorophyllase, with the appearance of small amounts of chlorophyllides and pheophorbides; and chemical, demonstrated by high levels of pheophytins. At 75°C we observed also high levels of chlorophylls and pheophytins, probably due to inactivation of all enzymes, supporting pheophytinization. In order to avoid retention of chlorophyll and to guarantee marketing quality of seeds, we suggest harvesting at stage R₈, followed by fast or slow drying. When it is necessary to hasten swathing, the drying should be performed at temperatures below 40°C, otherwise the seed quality could be compromised

1 - INTRODUÇÃO

As sementes oleaginosas comestíveis mais importantes no mercado mundial em termos de volume de produção e exportação são: soja, canola, girassol, palma e coco. A utilização da soja tem se expandido nas últimas décadas e a produção mundial está em crescimento. Em 1999, a produção global foi de 160 milhões de toneladas, sendo os principais países produtores os EUA, o Brasil e a Argentina (74,6, 31,0 e 19,9 milhões de toneladas, respectivamente). Em 2001, a produção brasileira de soja alcançou safra recorde (39,8 milhões de toneladas). O Brasil possui liderança mundial nas exportações do farelo de soja e a vice liderança no comércio internacional do óleo de soja, superado apenas pelos EUA.

Diante deste mercado em crescimento e da importância econômica que ele representa para o Brasil, é necessário o controle da produção de grãos e dos padrões de comercialização global, tendo em vista a garantia da qualidade para atender a todas as especificações dos produtos alimentícios derivados da soja. Existem vários sistemas internacionais de classificação de grãos de soja e os critérios utilizados em todos eles são similares e baseiam-se mais em metodologias subjetivas e físicas (defeitos dos grãos, umidade, cor, impurezas e crescimento microbiano) do que em fatores químicos.

Óleos com elevado teor de clorofila, provenientes da extração de grãos verdes, continuam sendo um problema nas indústrias esmagadoras de grãos oleaginosos. O conteúdo de clorofila é um parâmetro na avaliação da qualidade e sua presença implica na produção de um óleo de cor escura, comercialmente inadequado, por algumas razões: além da coloração escura ser indesejável para os consumidores, a

clorofila e seus derivados, principalmente a feofitina, são fotossensíveis e, conseqüentemente, reduzem a estabilidade oxidativa do óleo, levando à rancificação e reduzindo sua vida de prateleira. A presença de clorofila também tem sido relacionada com a diminuição da velocidade do processo de hidrogenação do óleo. Os pigmentos podem ser removidos por adsorção em agentes clarificantes, mas esse processo aumenta os custos da refinação e, à medida que aumenta o volume de terras diatomáceas utilizadas no processo de filtração, aumentam também as perdas de óleo, por retenção.

Da mesma forma, a presença de grãos verdes resulta em menor valor comercial e em prejuízos, quando o objetivo é a comercialização e/ou exportação. Observa-se também que as sementes verdes apresentam reduzido poder germinativo, embora as hipóteses para explicar a inviabilidade das sementes não tenham sido ainda comprovadas.

Apesar da evidente importância do desaparecimento da clorofila como medida de controle no amadurecimento de sementes oleaginosas, o conhecimento relativo ao mecanismo de degradação do pigmento, durante o processo de maturação e armazenamento, é escasso. Aparentemente, trata-se de um processo enzimático, evidenciado pelo aumento de clorofilídeos, embora acoplado a um mecanismo químico, não-enzimático, que resulta em um aumento de feofitinas e outros derivados fitilados. Em alguns estudos é relatado que o teor de clorofila em sementes de soja é determinado pelo genótipo e sofre uma variação significativa entre as variedades. Esses níveis podem ser fortemente afetados, tanto pelo estágio de maturação, como pelas condições de secagem pós-colheita, ou pelas condições climáticas que podem interferir no amadurecimento normal no campo.

Em vista da dificuldade em produzir grãos de soja com grau de qualidade adequado para atender às especificações dos diversos produtos finais, este trabalho visou a investigar as possíveis vias de degradação da clorofila durante a maturação e secagem da soja, buscando maiores conhecimentos sobre o mecanismo intrínseco que resultasse na degradação/retenção dos pigmentos verdes nas sementes de soja para contribuir nos procedimentos de colheita e armazenagem dos grãos, evitando a retenção da cor verde.

Este trabalho teve como objetivo estudar a degradação da clorofila em sementes de soja, isolando e identificando os produtos de degradação através de cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massa, ao longo da maturação das sementes submetidas a diferentes condições de secagem. O modelo de estudo proposto consistiu no acompanhamento do acúmulo e da cinética de formação de certos derivados, característicos da degradação por via enzimática, química ou ambas as vias. Obtidos os produtos intermediários, sugerimos os possíveis mecanismos químicos e bioquímicos envolvidos na degradação da clorofila, bem como algumas condições práticas de colheita e secagem que resultam em grãos com reduzidos teores de clorofila.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - Soja

2.1.1 - Produção e utilização

A soja é uma cultura de grande expressão econômica, cuja utilização mundial está em expansão, tanto no mercado oriental, que sempre possuiu essa leguminosa como hábito alimentar, como também agora tem seu mercado em crescimento na civilização ocidental, sendo os principais países produtores os EUA, o Brasil e a Argentina, cujas produções, em 1999, foram de 74,6, 31,0 e 19,9 milhões de toneladas, respectivamente. A tendência de aumento da área cultivada, tomando-se como base as últimas três décadas, reflete a necessidade de oferta crescente de sementes melhoradas. Em 2001, a produção brasileira de soja alcançou safra recorde (39,8 milhões de toneladas). O principal país consumidor e processador é a China, que aumentou seu volume de importação de 3 milhões de toneladas, entre os anos de 1997 e 1999, para 10 milhões de toneladas em 2000, devido aos avanços em técnicas de processamento e desenvolvimento de novos produtos (BRASIL SECEX, 1998-2001).

A maior parte da produção anual de soja é convertida em óleo e farelo. O farelo teve um aumento em seu consumo, substituindo ingredientes de origem animal nas rações, principalmente devido ao aparecimento da BSE "Bovine Spongiform Encephalopathy", conhecida como a "doença da vaca louca". O consumo de óleo vem crescendo devido aos avanços nos processos de refinação e pós-refinação, que permitem uma ampla utilização, incluindo óleos de cozinha e de salada, gorduras

vegetais hidrogenadas, margarinas, maioneses, molhos, produtos para panificação, entre outros.

No setor agrícola e agroindustrial da economia brasileira, a soja alcançou nas últimas décadas uma explosão de consumo, principalmente por ser o elo fundamental para a viabilização da produção de proteínas animais de ciclo curto (aves, suínos e peixes). Em paralelo, o óleo vegetal substituiu a banha e a gordura bovina, por ser mais saudável e barato. O Brasil possui a liderança mundial nas exportações do farelo de soja e a vice liderança no comércio internacional do óleo de soja, superado apenas pelos EUA. O volume de exportação de soja e derivados pelo Brasil em 1998 foi de 21,1 milhões de toneladas, incluindo grão, farelo e óleo e, no ano 2001, alcançou seu auge com 26,1 milhões de toneladas (BRASIL SECEX, 2001). A boa resposta dos agricultores nessa área da atividade agrícola pode ser atribuída, em parte, aos ganhos com a produtividade. Novas variedades de plantas proporcionam o avanço e também as novas oportunidades para agregar valor na cadeia de soja (farinhas, proteínas texturizadas, proteínas concentradas, proteínas isoladas, fibras dietéticas, tocoferóis, isoflavonas, lecitinas, etc.) (CONAB, 2000). Os maiores compradores da soja em grãos atualmente são China, Países Baixos, Alemanha, Espanha, Portugal, Bélgica, Luxemburgo, Japão e Itália. A elevação de compras efetuadas pela China, atualmente o maior comprador mundial do produto, e a maior demanda global da União Européia são fatores que contribuíram para a elevação das exportações de soja brasileira (BRASIL SECEX, 2001).

A importância econômica da soja não se limita à exportação. A partir do grande salto que ela obteve nos anos 70, o óleo de soja foi conquistado pelo mercado brasileiro, até atingir a quase unanimidade de que desfruta neste início de século. Hoje, pelo menos 95% dos óleos comestíveis produzidos e consumidos na cozinha brasileira

são derivados da soja, além dos diversos subprodutos, como as margarinas e gorduras vegetais hidrogenadas (ABIOVE, 2001).

A produção e utilização da soja como alimento surgiu na China no século XI a.C. Há milhares de anos os chineses e as populações orientais têm o hábito cultural de consumir a soja de diversas formas tradicionais em alimentos, tais como tofu, molho de soja, missô, soja frita, soja verde, etc. Por outro lado, nos EUA, a maior porcentagem da soja produzida vai para a indústria de óleo e de ração (material desengordurado). Enquanto o óleo de soja é destinado prioritariamente para consumo humano, a soja desengordurada é utilizada em grande parte para ração animal. Apenas uma pequena porcentagem do material desengordurado é processado em produtos protéicos de soja, através de modernos processos tecnológicos. Esses produtos de soja processada não são consumidos diretamente, mas são incorporados como ingredientes em diversos alimentos consumidos no ocidente (Liu, 2000).

Na entrada deste novo século, esta oleaginosa, de cultura tão antiga, tem se tornado altamente popular e tem sido alvo de muitas pesquisas, tanto devido às qualidades nutricionais e funcionais, como pela sua versatilidade na produção de diversos alimentos e ingredientes. Alimentos à base de soja são, hoje, a categoria que mais cresce na indústria de alimentos, com uma diversidade de produtos, que vão desde os tradicionais até os ingredientes protéicos de soja e produtos alternativos de leite e carne, ou produtos enriquecidos com proteína de soja (Golbitz, 2000). Eles podem ser divididos em seis grandes grupos: alimentos contendo óleo de soja, alimentos tradicionais da população oriental (tofu, kinako, natto, shoyu), produtos protéicos (concentrados e isolados), alimentos da nova geração (sorvetes, iogurtes, queijos, hamburgueres, substitutos de gordura, molhos e balas feitos à base de soja), alimentos enriquecidos com soja (pães, macarrão, cereais, snacks) e ingredientes

funcionais/suplementos de dietas (lecitina, oligossacarídeos, isoflavonas, tocoferóis, fitosteróis, fitatos, inibidores de tripsina). O interesse na soja alcançou um progresso significativo desde que o Departamento de Controle de Alimentos e Medicamentos dos E.U.A. (UNITED STATES FDA – Food and Drug Administration) aprovou, em 1999, a regulamentação que diz que a proteína da soja é uma alegação de saúde, alimento funcional que ajuda a reduzir o risco, prevenir diversas doenças crônicas e manter a saúde humana (UNITED STATES FDA, 1999; Pszczola, 1999).

Existem muitas razões pelas quais a soja se tornou um “commodity” econômico e agrícola; o fato de ela ter características agrônômicas favoráveis, incluindo boa capacidade de adaptação a uma ampla variedade de solos e climas e a habilidade em fixar nitrogênio do solo, torna a soja uma cultura de rotação com outras culturas que necessitam de altas concentrações de nitrogênio, como o milho e o arroz.

Em segundo lugar, a soja possui uma composição química peculiar. Em média, considerando-se a base seca, a soja contém cerca de 40% de proteína e 20% de óleo. Esta característica torna-a a primeira cultura no “ranking” de conteúdo protéico e a segunda, em relação ao teor de óleo entre as leguminosas (o amendoim possui um teor de 48% de óleo).

Em terceiro lugar, a soja é nutritiva. Os componentes protéicos e lipídicos contidos na soja não têm apenas alto valor quantitativo, mas também qualitativo. O óleo de soja contém uma alta proporção de ácidos graxos insaturados, da série ômega-3, tais como ácido linoléico e linolênico. A proteína da soja contém todos os amino ácidos essenciais, sendo que muitos deles estão presentes em quantidades similares às requeridas por humanos e animais, exceto os sulfurados. Além disso, ela possui índice de digestibilidade protéica semelhante ao das proteínas do ovo e da caseína (JOINT FAO/WHO, 1990). A soja também contém diversas outras substâncias,

em menor quantidade, conhecidas como fitoquímicas, que têm sido correlacionadas nos últimos anos com benefícios únicos à saúde (Messina, 1999; Wang & Wixon, 1999 apud Liu, 2000). Portanto, a soja apresenta versatilidade na sua utilização, incluindo alimentação humana, animal e uso como alimento funcional.

2.1.2 - Características da planta e da semente

Do ponto de vista botânico, a soja pertence à família *Fabaceae* e ao gênero *Glycine*, que compreende cerca de 15 espécies, sendo a comercial a *Glycine max* (L.) Merril (Caruso, 1997).

A soja apresenta diversas exigências bioclimáticas: térmicas, hídricas e fotoperiódicas. A cultura adapta-se bem entre 20° e 30°C, sendo que seu maior desenvolvimento ocorre quando a temperatura do ar está em torno de 30°C e sua floração é induzida quando as temperaturas se encontram acima de 13°C. Porém, o principal fator de indução do florescimento em soja é a redução no fotoperíodo. As cultivares desenvolvidas para as regiões norte, nordeste e centro-oeste do Brasil são mais sensíveis à temperatura do que as cultivares desenvolvidas para o sul e sudeste, que são mais sensíveis ao fotoperíodo. O ciclo da soja dura de 110 a 160 dias, de acordo com as condições locais e a variedade (Cenkowski *et al.*, 1989^a; Cenkowski & Jayas, 1993; Caruso, 1997; EMBRAPA, 1990).

Com relação às exigências hídricas, pode-se dizer que índices pluviométricos anuais entre 700 e 1000 mm, bem distribuídos durante o ciclo, são suficientes para um desenvolvimento satisfatório e bom rendimento da cultura (EMBRAPA, 1990). Precipitações pluviométricas freqüentes ou prolongadas durante o período de pré-colheita, alternadas com períodos secos, fazem com que a semente, ainda no campo, sofra constantes alterações no seu teor de umidade, acelerando os processos de

deterioração ou prejudicando o enchimento de grãos. A semente de soja deve ser colhida tão logo atinja a maturação de colheita (R_8), quando 95% dos legumes atingem coloração marrom, a menos que ocorram períodos chuvosos que impeçam a colheita (Cerqueira & Popinigis, 1981).

As condições climáticas e fatores ambientais afetam a qualidade da semente de soja, principalmente a partir da fase de maturação fisiológica e do momento em que a sua umidade cai abaixo de 25%, pela secagem na própria vagem. A recomendação técnica é de que a colheita ocorra quando a umidade chegue a 12-14%. Durante o armazenamento, devem ser controlados, tanto a umidade do próprio grão, assim como a temperatura e umidade relativa do ambiente. A semente de soja é de natureza higroscópica, absorvendo ou perdendo água para a atmosfera circundante, até que a pressão de vapor da semente e do ar atinjam o equilíbrio (Teckroni *et al.*, 1987; Machado, 1981).

Embora a qualidade da semente não possa ser melhorada durante o armazenamento, boas condições durante esse período contribuem para preservar sua viabilidade. A umidade dos grãos e a temperatura do ar são determinantes primários das mudanças de qualidade durante o armazenamento (Teckrony *et al.*, 1987; Machado, 1981). Deterioração durante a estocagem, manejo ou carregamento, pode resultar em um óleo de difícil processamento e com grande perda no refinamento (Mounts *et al.*, 1990).

2.1.3 - Estádios de desenvolvimento das sementes

Plantas de soja de diferentes variedades, cultivadas em condições ambientais distintas, podem apresentar ciclos de desenvolvimento vegetativo e reprodutivo de duração variável, entre 110 a 160 dias.

A comparação dos resultados de pesquisas, especialmente de diferentes áreas geográficas, exige um conhecimento exato dos estádios de desenvolvimento das plantas. Estes estádios foram descritos no passado por definições e termos imprecisos, muitas vezes conhecidos apenas pelo agricultor. Atualmente, a adoção de sistemas de classificação facilitou a descrição e classificação das fases de desenvolvimento da planta de soja.

Fehr & Caviness (1977) estabeleceram uma escala de estádios de desenvolvimento da soja, visando a contribuir para a uniformização da comunicação entre pesquisadores, produtores e demais pessoas envolvidas em atividades agrícolas; essa escala considera basicamente a idade fisiológica da planta. Os autores propuseram um sistema (Tabela 1) que introduziu a diferenciação entre os estádios vegetativos e reprodutivos. Basearam-se somente no caule principal e no número de nós produzidos durante a fase vegetativa, não considerando os ramos laterais. Os estádios vegetativos, referentes ao período pré-florescimento, foram caracterizados com a letra V. Considera-se como primeiro nó aquele das folhas unifoliadas. Os demais nós são contados logo depois de se desenrolar completamente sua folha trifoliada. Este ponto se determina ao observar a folha formada no nó imediatamente superior. Se esta estiver suficientemente desenrolada, permitindo a separação das bordas de seus folíolos, inclui-se o nó da folha inferior na contagem. No nó terminal considera-se a folha completamente desenvolvida quando os folíolos se estenderem horizontalmente e ela revelar o aspecto de folha mais velha. O período vegetativo é completado com o início do florescimento aos 40-70 dias após a emergência das plantas, dependendo do cultivar, época de semeadura, condições climáticas e região (Marcos Filho, 1986).

Tabela 1 - Descrição dos estádios vegetativos e reprodutivos de soja propostos por Fehr & Caviness (1977)

Descrição dos estádios vegetativos		
<i>Estádio</i>	<i>Subtítulo</i>	<i>Descrição</i>
V _E	emergência	cotilédones acima da superfície do solo
V _C	estádio cotiledonar	folhas unifoliadas com as margens não mais se tocando
V ₁	primeiro nó	folhas unifoliadas desenvolvidas
V ₂	segundo nó	folhas trifoliadas desenvolvidas no nó acima das folhas unifoliadas
V ₃	terceiro nó	três nós do caule com folhas desenvolvidas, começando com o nó das folhas unifoliadas
V _n	“n” nó	“n” número de nós no caule com folhas unifoliadas
Descrição dos estádios reprodutivos		
<i>Estádio</i>	<i>Subtítulo</i>	<i>Descrição</i>
R ₁	início do florescimento	uma flor aberta em qualquer nó do caule
R ₂	florescimento	flores nos quatro últimos nós do caule com folhas desenvolvidas
R ₃	início da frutificação	um legume com cinco milímetros em um dos quatro últimos nós do caule, com folhas desenvolvidas
R ₄	vagem desenvolvida	um legume com dois centímetros em um dos quatro últimos nós do caule, com folhas desenvolvidas
R ₅	início de formação dos grãos	grãos com três milímetros em um legume dos quatro últimos nós do caule, com folhas desenvolvidas
R ₆	grãos desenvolvidos	legume contendo ao menos um grão verde que ocupa toda a sua cavidade em um dos últimos nós do caule, com folha desenvolvida
R ₇	maturação fisiológica	um legume normal que atingiu a cor de legume maduro
R ₈	ponto de colheita	95% dos legumes atingiram a cor de legume maduro

Fonte: Costa & Marquezan (1982); Marcos Filho (1986)

Os estádios reprodutivos foram identificados com a letra “R”, acompanhada de um número. O período reprodutivo compreende a floração, desenvolvimento de legumes, enchimento de grãos e maturação (Miyasaka & Medina, 1981). Não há uma

transição definida entre os períodos de florescimento e de frutificação; esta se inicia, em média, 10 a 15 dias após o início do florescimento. As taxas de crescimento das vagens e de acúmulo de matéria seca pelas sementes são relativamente lentas, até cerca de 25-30 dias após o início do florescimento (R₅). A partir deste momento tornam-se rápidas, ao mesmo tempo em que as vagens e sementes vão perdendo a coloração verde e assumindo a coloração amarela.

A maturidade fisiológica, que ocorre aos 40-70 dias após o início da frutificação, tem sido caracterizada pelo máximo peso da matéria seca dos grãos. Nesse momento os grãos assumem coloração amarela e apresentam grau de umidade de aproximadamente 28-30% (Marcos Filho, 1986; Teckrony *et al.*, 1987).

2.1.4 - Sistemas de classificação

No comércio internacional existem vários sistemas de classificação de grãos oleaginosas para controlar a produção e os padrões de comercialização, levando em consideração as diversas finalidades da matéria-prima. Todos os critérios de classificação são similares. De acordo com Pritchard (1983), cerca de 80% do mercado internacional de todos os óleos e gorduras é controlado pelo FOSFA (Federation of Oils and Fats Associations). Outra Associação importante é a NSPA "National Soybean Processor Association", que controla as regulamentações para óleo e ração. No Canadá, os padrões foram estabelecidos pela "Canadian Grain Commission".

Para promover as relações de comercialização de soja entre produtores e compradores, tanto nos mercados nacionais como nos internacionais, cada país desenvolveu suas normas quanto aos procedimentos de padrões, classificação e comercialização de soja. Apesar das diferenças dos limites de tolerância em cada país,

em geral, os parâmetros para a classificação são similares e baseiam-se em fatores físicos e subjetivos, tais como defeitos dos grãos, cor e crescimento microbiano, além da umidade, fatores esses aceitos internacionalmente como critérios para exportação (Pritchard, 1983; Liu, 1997).

Nos E.U.A. os padrões para classificação e comercialização de grãos de soja são estabelecidos pelo USDA (United States Department of Agriculture). Existem quatro níveis de classificação, sendo que para grãos de primeira qualidade, os limites máximos permitidos de grãos quebrados, impurezas e/ou matérias estranhas, grãos avariados e grãos de outras cores (que não amarela) são: 10%, 1%, 2% e 1% respectivamente (Liu, 1997; Erickson, 1986). No Brasil, existe apenas uma classificação de grãos de soja, definida como padrão básico (PB), na qual os limites de tolerância são menos rigorosos no que diz respeito a grãos quebrados (30%), grãos avariados (8%) e grãos esverdeados (10%) (BRASIL Ministério da Agricultura, 1983).

Transcrevemos abaixo a classificação brasileira do grão de soja, feita com base na portaria do Ministério da Agricultura número 262, de 23 de novembro de 1983. De acordo com a portaria, os principais defeitos do grão de soja são:

- A) *Grãos avariados: é o conjunto de grãos ardidos, brotados, danificados, imaturos, chochos e mofados. (Grãos ardidos: grãos ou pedaços de grãos que se apresentam visivelmente fermentados, com coloração escura na casca e interiormente).*
- B) *Grãos esverdeados: grãos ou pedaços de grãos que apresentam coloração escura na casca e na polpa, em decorrência de maturação forçada.*

Os limites máximos de tolerância de defeitos permitidos para o grão de soja, Padrão Básico (PB), segundo a portaria 262, é de 8% de grãos avariados, 10% de grãos esverdeados, 30% de grãos quebrados, 1% de impurezas e/ou matérias estranhas e 14% de umidade. A soja que não se enquadrar dentro dos limites máximos de tolerância de defeitos será considerada “Fora do Padrão Básico” FPB.

A incidência de grãos verdes na soja é muito comum em países tropicais como o Brasil, em que as condições climáticas são caracterizadas por altas temperaturas associadas a grandes variações nos índices pluviométricos. Principalmente na região sul do Brasil, onde ocorrem muitas chuvas perto da época de colheita, é comum a utilização de colheitas prematuras, o que aumenta a ocorrência de retenção da clorofila nas sementes.

Nos E.U.A. e Canadá, a incidência de grãos verdes é observada na canola, trazendo os mesmos problemas para as indústrias de óleo. Este fato faz com que o pigmento verde seja um parâmetro de controle de qualidade desta semente nestes países. No Canadá, segundo Cenkowski & Jayas (1993), o teor máximo de clorofila permitido para sementes de canola de primeira qualidade é 22 mg/kg (base seca). Na Europa, a Suécia já reconheceu a importância do teor de clorofila e, desde 1970, além do sistema clássico de classificação, o preço da canola é estabelecido pelo teor de clorofila no óleo, sendo que sementes de primeira qualidade correspondem a um óleo com um teor máximo de 30 ppm de clorofila total (Dahlén, 1973; Mounts *et al.*, 1990).

Embora no Brasil a clorofila ainda não seja um parâmetro de qualidade exigido pela legislação, tendo em vista a globalização da economia, o controle do teor deste pigmento torna-se cada vez mais importante, sendo necessárias mudanças nas práticas agrícolas e o estabelecimento de parâmetros de colheita para garantir homogeneidade e qualidade na produção de soja.

2.2 - Óleos provenientes de grãos verdes

Óleos com elevado teor de clorofila, provenientes da extração de grãos verdes, são um problema nas indústrias esmagadoras de sementes oleaginosas. O conteúdo de clorofila é um parâmetro na avaliação da qualidade do óleo; sua presença confere uma coloração indesejável ao óleo e, por ser um molécula prooxidante, reduz a estabilidade oxidativa (Levadoux *et al.*, 1987; Mínguez-Mosquera *et al.*, 1990; Cenkowski & Jayas, 1993; Tautorus & Low, 1993).

A presença de clorofila também tem sido relacionada com a diminuição da velocidade do processo de hidrogenação. A clorofila bloqueia os centros ativos do catalisador, inibindo a taxa de hidrogenação do óleo de canola (Abraham & DeMan, 1986; Ward *et al.*, 1995).

Alguns autores, que estudaram a estabilidade oxidativa de óleos de soja e de canola, relataram que a atividade prooxidante da feofitina é até três vezes maior do que a da clorofila. Tanto a clorofila quanto a feofitina promovem, de forma similar, a fotoxidação do óleo em uma ampla faixa de comprimento de onda, provavelmente porque elas possuem espectros de absorção semelhantes. Porém, a maior atividade prooxidante da feofitina foi relacionada com sua maior estabilidade química. Durante a fotoxidação ou autoxidação do óleo vegetal, a clorofila é degradada mais rapidamente do que a feofitina. Uma outra observação importante é que óleos vegetais refinados contêm teores de feofitina bem maiores do que os de clorofila. Este fato, juntamente com a maior atividade prooxidante e maior estabilidade da feofitina na autoxidação do óleo comparada à da clorofila, torna-se muito importante a medida do teor de feofitina como medida de controle da estabilidade oxidativa de óleos vegetais (Usuki *et al.*, 1984^{a,b}; Tautorus & Low, 1993).

Desta forma, é fundamental que se faça a remoção da clorofila e seus derivados ou, então, que a ocorrência de grãos verdes seja evitada. A presença dos pigmentos, mesmo em pequenas quantidades, aumenta o custo de refinação e reduz o valor comercial dos grãos. Os lotes com grãos nestas condições não podem ser comercializados no mercado internacional, fato que se torna relevante frente ao enorme volume de exportação.

2.3 - Ocorrência de sementes oleaginosas com alto teor de clorofila

Há significativos índices de correlação entre os níveis de clorofila e a maturidade da semente na época da colheita (Cenkowski *et al.* 1989^{a, b}; Liu, 1996). Antes de as vagens se apresentarem secas, a semente de soja atinge uma maior capacidade germinativa e vigor e apresenta um teor máximo de matéria seca. Tal ponto é definido como maturação fisiológica e ocorre aproximadamente 60-65 dias após a fecundação, coincidindo com 28-30% de umidade na semente, embora o período de maturação fisiológica e o teor de umidade possam variar em função das condições climáticas e da variedade da soja (Marcos Filho, 1986). A maturação de colheita é caracterizada por uma umidade abaixo de 13%, o que garante a preservação dos grãos em relação ao desenvolvimento microbiano.

As sementes de soja podem ser colhidas a partir da maturação fisiológica, até a maturação comercial, embora seja mais usual a colheita ocorrer quando a planta atinge uma umidade por volta de 14%. Na prática, a presença de sementes verdes é resultado de condições climáticas desfavoráveis e/ou de procedimentos de colheita prematura, quando a colheita é antecipada para reduzir as quebras ou perdas

(Levadoux *et al.*, 1987; Cenkowski & Jayas, 1993). Na maturação fisiológica, a clorofila e a umidade ainda estão presentes em concentração elevada, mas o pigmento pode ser degradado naturalmente se as sementes forem secas lentamente à temperatura ambiente. Nestas condições, o óleo resultante apresentará índices de qualidade aceitáveis (Adams *et al.*, 1983). A secagem tem por finalidade principal reduzir o teor de água das sementes até atingir níveis seguros para a sua conservação durante o período de estocagem e obter grau de umidade adequado para a comercialização. Após a maturidade fisiológica, o produtor dispõe de duas alternativas: a primeira é aguardar a secagem dos grãos na própria planta, durante o menor período de tempo possível, até que eles atinjam um grau de umidade favorável à colheita mecânica e mais seguro para o armazenamento, ou seja, efetuar a colheita apenas quando os grãos atinjam um grau de umidade igual ou inferior a 13%, não necessitando de secagem adicional antes do armazenamento. Outra alternativa, seria realizar a colheita antes de atingir este teor de umidade, porém, sementes com um teor de umidade ainda elevado devem ser submetidas à secagem rápida para evitar-se a deterioração por reações enzimáticas ou por desenvolvimento de microrganismos e fungos, que produzem lipases hidrolíticas e, conseqüentemente, aumentam o teor de ácidos graxos livres (Pritchard, 1983). A secagem rápida na indústria é geralmente feita em estufas com temperaturas variando entre 38° até 80°C, dependendo do destino dos grãos (para isolados protéicos são utilizadas temperaturas mais baixas e, para produção de óleo, temperaturas mais altas) (Cerqueira & Popinigis, 1981). Nessas condições, ao final da secagem, uma significativa porcentagem dos grãos se mantêm verdes, comprometendo a qualidade do óleo.

No campo pode ocorrer uma situação similar à que ocorre na estufa: se a colheita é feita em condições de alta temperatura e baixa umidade relativa, com rápida

perda de umidade, ou quando são aplicados produtos químicos dessecantes na cultura para acelerar o amadurecimento, pode haver a ocorrência de sementes verdes (Adams *et al.*, 1983; Cenkowski *et al.*, 1989^a; Ward *et al.*, 1992; Nwugo, 1994; Ward *et al.*, 1995).

Apesar da importância da transformação da clorofila em seus derivados durante o amadurecimento da soja, pouco se conhece sobre o mecanismo de degradação do pigmento nessas sementes durante o processo de maturação e armazenamento. Aparentemente, trata-se de um processo enzimático, evidenciado pelo aumento de clorofilídeos, embora acoplado a um mecanismo químico não-enzimático, que resulta em um aumento de feofitinas e outros derivados fitilados (Schwartz & Lorenzo, 1990; Heaton & Marangoni, 1996; Mangos & Berger, 1997; Suzuki *et al.*, 1999).

Vários autores têm estudado a cinética de síntese/degradação da clorofila em diversos vegetais e sementes oleaginosas, tais como canola (*Brassica sp*) (Johnson-Flanagan & Thiagarajah, 1990; Endo *et al.*, 1992), azeitona (Mínguez-Mosquera *et al.*, 1994; Mínguez-Mosquera & Gallardo-Guerrero, 1995; Boekel, 2000), salsa (Yamauchi & Watada, 1993), couve, espinafre, brócolis, repolho (Schwartz *et al.*, 1981; Khachik *et al.*, 1986; Heaton *et al.*, 1996; Mangos & Berger, 1997; López-Ayerra *et al.*, 1998; Teng & Chen, 1999; Weemaes *et al.*, 1999), feijão verde (Cano *et al.*, 1998; Monreal *et al.*, 1999) e broto de batata (Kozukue *et al.*, 2001). As metodologias aplicadas nestes estudos são variadas; alguns se baseiam em indicadores do teor de clorofila, como medida de cor ou atividade enzimática, por exemplo, outros investigam os pigmentos diretamente, monitorando o acúmulo e/ou a retenção da clorofila e seus derivados através de técnicas conjugadas (espectrofotometria, cromatografia de camada delgada, cromatografia líquida de alta eficiência, espectrometria de massa, ressonância magnética nuclear). A utilização de técnicas conjugadas é necessária em

casos onde se tem um conjunto complexo de compostos a serem identificados e quantificados. (Schwartz & Lorenzo, 1990; Breemen *et al.*, 1991, Teng & Chen, 1999). No caso da complexa mistura de pigmentos esverdeados (clorofilas e derivados) e amarelados (xantofilas e carotenos), com todos os respectivos epímeros e isômeros, onde se tem cromatogramas com 10, 15, 20 ou mais picos, a utilização de técnicas tais como, espectrometria de massa ou de ressonância magnética nuclear, permite a confirmação da identidade dos picos, pois essas técnicas complementam as informações obtidas por cromatografia líquida. No caso de alômeros de clorofila e derivados, por exemplo, constata-se espectros de absorção eletromagnética idênticos, porém eles têm pesos moleculares diferentes e, portanto, diferentes espectros de massa. Por outro lado, podem ocorrer compostos (epímeros) de mesma massa atômica, porém de diferentes absorções eletromagnéticas (Zissis *et al.*, 1999). O método publicado pela AOAC – Association of Official Analytical Chemists (1995) baseia-se em espectrofotometria estimando o teor total de clorofila e feofitina através de fórmulas que consideram as absorções máximas de cada pigmento (clorofila a e b, feofitina a e b) em determinados comprimentos de onda, dependendo do solvente utilizado. Porém, é uma estimativa grosseira do ponto de vista quantitativo, já que estas absorção características de cada substância e nem toda clorofila é convertida apenas em feofitina (Daun & Thorsteinson, 1989).

2.4 – Clorofila e derivados

As clorofilas são os pigmentos absorvedores de luz responsáveis pela fotossíntese, o principal processo para converter energia da luz solar em energia química. A fotossíntese abrange dois processos: as reações luminosas, que ocorrem apenas quando as plantas estão iluminadas, e as reações de fixação de carbono, que ocorrem tanto na luz quanto na escuridão. Nas reações luminosas, a clorofila e outros pigmentos das células fotossintetizantes absorvem a energia luminosa e a conservam na forma química de dois produtos ricos em energia, o ATP e o NADPH. Simultaneamente, o O₂ é produzido. Nas reações de fixação de carbono, o ATP e o NADPH são utilizados para reduzir o CO₂ para formar glicose e outros compostos orgânicos. As duas reações ocorrem nos cloroplastos. Estes são envolvidos por uma membrana externa contínua que é permeável a moléculas pequenas e íons. Um sistema de membranas envolve o compartimento interno, onde há muitas vesículas ou sacos achatados, envoltos por membranas, chamados tilacóides, que usualmente, são arranjados em pilhas denominadas de grana. As membranas dos tilacóides são separadas da membrana interna do cloroplasto. As clorofilas e as enzimas requeridas para as reações luminosas encontram-se incrustadas nas membranas tilacóides, associadas a proteínas. O fluido no compartimento que circunda as vesículas tilacóides, o estroma, contém a maioria das enzimas requeridas para as reações fixadoras de carbono (Gross, 1991; Rüdiger & Schoch, 1988; Jackson, 1976).

As clorofilas são ésteres, solúveis na maioria dos solventes orgânicos (etanol, acetona, benzeno, éter e clorofórmio), mas não são solúveis em água; são extremamente lábeis, sensíveis à luz, ao calor, ao oxigênio e à degradação química; são fluorescentes quando em solução. Elas absorvem luz vermelha e azul-violeta

(Figura1), refletem luz verde e ocorrem em cinco formas conhecidas (a, b, c, d, e). A sua absorção varia de acordo com o solvente utilizado na solução. Tanto em acetona como em éter etílico, ela é máxima a 428-430 nm e 660-662 nm. Todas as plantas verdes contêm clorofila a e clorofila b (Porra *et al.*, 1989).

Figura 1 – Espectro de absorção da clorofila

Ambas as clorofilas, a e b, são derivadas da dehidroporfirina quelada com um átomo de magnésio, localizado no centro da molécula (Figura 2).

Figura 2 – Estrutura da clorofila a

Todas as clorofilas são porfirinas, formadas por quatro anéis pirrólicos e possuem um quinto anel (V) isocíclico, localizado ao lado do terceiro anel (III) pirrólico. No quarto anel (IV), o substituinte ácido propiônico é esterificado com álcool isoprenóide monoinsaturado, fitol ($\text{C}_{20}\text{H}_{39}\text{OH}$), localizado no C_{20} e que é o lado hidrofóbico da molécula, sendo o resto da molécula hidrofílico. A dupla ligação do fitol é caracterizada por estar na configuração *trans* (Jackson, 1976). A clorofila d é similar à clorofila a, sendo que no lugar do grupo vinil, existe um grupamento formil (Holt, 1961). A clorofila b difere da clorofila a apenas por possuir um grupo aldeído ($-\text{CHO}$) no lugar do grupamento metil na posição três (Dougherty *et al.*, 1966).

O átomo central de Mg é facilmente removido da clorofila, principalmente em condições ácidas, sendo substituído por hidrogênio, formando as feofitinas, como pode

ser observado nas Figuras 3 e 4. A hidrólise do grupo fitol da feofitina com ácido ou álcali, dá origem aos feoforbídeos (Figuras 3 e 5).

A clivagem do grupo fitol sem remoção do íon Mg^{2+} é geralmente catalisada enzimaticamente pela clorofilase endógena, produzindo os clorofilídeos (Figuras 3 e 6).

Figura 3 – Esquema geral das transformações da clorofila em seus derivados

Figura 4 – Hidrólise química da clorofila

Figura 5 – Hidrólise enzimática da feofitina

Figura 6 – Hidrólise enzimática da clorofila

A epimerização do C₁₀, induzida por aquecimento brando, forma os isômeros a' e b'. O prolongamento do aquecimento causa uma decarbometoxilação no C₁₀, substituindo o grupo carbometoxi (CO₂CH₃) por hidrogênio e originando os "piro"

derivados (Schwartz & Lorenzo, 1990), como pode ser visualizado nas Figuras 4 e 6. Eles têm a mesma absorção no espectro que os pigmentos que lhes deram origem e são chamados de 10-epiclorofilas (Gross, 1991).

A degradação do pigmento clorofila em vegetais e sementes pode ser desejável ou não, conforme o destino comercial do produto. Em vegetais frescos ou enlatados, como a ervilha por exemplo, em azeitonas e azeites de oliva, é interessante manter a cor verde. Em sementes como soja, canola e seus óleos derivados, a presença do pigmento é indesejável.

A alteração mais comum que ocorre em vegetais verdes é a conversão da clorofila em feofitina, causando uma mudança de cor do verde brilhante para a cor parda ou castanha. Essa conversão é maior quando os vegetais verdes recebem tratamento térmico prolongado e é dependente da quantidade dos ácidos que se formam durante o processamento e estocagem. Geralmente a clorofila é convertida em feofitina e esta origina a pirofeofitina. Segundo Johnson-Flanagan & Thiagarajah (1990), a clorofila a é mais sensível à feofitinização do que a clorofila b.

Visando a preservação da clorofila, alguns pesquisadores recomendam o uso de matéria-prima de alta qualidade, o controle de pH, a mínima exposição ao calor pela aplicação de altas temperaturas em curto tempo (HTST – High Temperature Short Time), ou a associação dessas técnicas (Schwartz & Lorenzo, 1990), ou mesmo a substituição do Mg central por Cu ou Zn, na tentativa de estabilizar a cor.

No entanto, pouco se conhece sobre os processos e mecanismos responsáveis pela degradação fisiológica da clorofila como processo bioquímico pós-colheita ou de senescência.

Figura 7 - Mecanismo proposto para a degradação da clorofila em tecidos de vegetais (Heaton & Marangoni, 1996)

Heaton & Marangoni (1996) propuseram um mecanismo de degradação que envolve cinco etapas (Figura 7). A primeira etapa corresponde à clivagem do grupo fitol da clorofila pela ação da enzima clorofilase, resultando na formação de clorofilídeo. Paralelamente, pode ocorrer a remoção do íon Mg^{2+} em meio ácido, formando feofitina. O clorofilídeo, por sua vez, pode ser convertido em feoforbídeo pela perda do seu íon Mg^{2+} e a feofitina pode ser também convertida em feoforbídeo pela perda do grupo fitol.

Uma segunda etapa da degradação envolve a clivagem do anel da porfirina, provavelmente pela ação da enzima oxigenase, formando compostos fluorescentes e incolores. A ação desta enzima requer um redutor como cofator, tal como a glucose-6-fosfato. Os compostos são então exportados dos cloroplastos para o vacúolo, onde são convertidos em compostos não fluorescentes, "rusty pigments". Esta etapa consiste em uma mudança da localização das duplas ligações, levando a uma perda da fluorescência. O produto final é incolor. Não é conhecido se nesse momento os compostos não fluorescentes são ainda degradados dentro do vacúolo ou se permanecem estáveis até a morte da célula (Heaton & Marangoni, 1996).

A primeira etapa da degradação da clorofila é iniciada na senescência por fatores endógenos e pode ser influenciada por fatores externos, tais como estresse hídrico, redução de luz, mudanças de temperatura, aumento do teor de etileno ou por fatores internos, tais como aumento de permeabilidade da membrana e mudança de pH; esses fatores interferem no processo normal, levando a disparar ou retardar a degradação da clorofila (Heaton & Marangoni, 1996; Takamiya *et al.*, 2000).

A remoção do grupo fitol causa um drástico aumento da polaridade da molécula da clorofila que, por consequência, diminui a sua estabilidade na membrana tilacóide. Isto resulta em uma ruptura das interações proteína-lipídeo e, possivelmente, em uma desnaturação das associações clorofila-proteína. A ruptura da membrana pode

também liberar plastoquinonas e carotenóides e, assim, reduzir o transporte de elétrons e a habilidade de suprimir radicais livres, respectivamente. O aumento dos radicais livres pode causar alterações conformacionais nas pontes de proteínas com clorofila a e b e, desse modo, aumentar sua susceptibilidade ao ataque proteolítico. Pequenas variações de pH podem também aumentar a especificidade enzimática para remover a molécula de clorofilídeo das ligações de proteína com clorofila a/b e, possivelmente, remover o átomo de Mg do centro. A remoção do Mg^{2+} pode ser também promovida pela enzima magnésio-dequelatase. Apesar de a existência desta enzima não ter sido confirmada, as evidências sugerem que ela exerça um papel no catabolismo da clorofila (Heaton & Marangoni, 1996).

A atividade e a expressão da enzima clorofilase ainda não são bem conhecidas, mas estudos demonstram que ela possui características muito peculiares. *In vivo* ela tem atividade latente nos cloroplastos, *in vitro*, a sua ativação necessita de altas concentrações de solventes polares e, em meio aquoso, a temperatura ótima de atividade é entre 40° e 60°C. Em temperaturas acima de 80°C, sua atividade é significativamente reduzida (Mínguez-Mosquera *et al.*, 1989; Johnson-Flanagan & Thiagarajah, 1990; Weemaes *et al.*, 1999; Takamyia *et al.*, 2000).

Há divergências na literatura quanto ao primeiro catabólito formado durante a degradação da clorofila; aparentemente, ele varia de vegetal para vegetal e parece ser dependente do pH. No repolho, por exemplo, Heaton *et al.* (1996) relataram que o catabólito inicial da degradação da clorofila é a feofitina, em pH 4,8, enquanto que Mínguez-Mosquera *et al.* (1994) determinaram que o clorofilídeo foi o catabólito inicial em pH 7,0, durante o processo de salga de azeitonas verdes.

Durante o armazenamento e/ou processamento de alimentos, há um acúmulo de diferentes produtos intermediários. Todos os derivados podem ser detectados

devido às características de absorção de luz no espectro, mas o que dificulta demasiadamente a localização e a seqüência dos eventos dos catabólitos durante a senescência é que eles aparecem e rapidamente desaparecem, sem deixar rastros (Heaton & Marangoni, 1996). O não-acúmulo dos intermediários da degradação da clorofila durante a senescência e a maturação de plantas sugere que existem diversas reações de degradação ocorrendo ao mesmo tempo (Takamyia *et al.*, 2000).

3 - OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo estudar a degradação da clorofila durante a maturação e três condições de secagem de grãos de soja, buscando ainda estabelecer condições práticas de campo e armazenagem dos grãos que evitam a retenção da cor verde.

O planejamento experimental consistiu em:

- A) Estudar o perfil de pigmentos (clorofila e derivados coloridos) em grãos de soja colhidas em seis estádios de maturação, em dois anos alternados.
- B) Identificar e caracterizar os produtos de degradação da clorofila destas sementes após submetê-las a três condições de secagem (temperatura ambiente a 25°C, estufa a 40° e a 75°C). Foram empregadas metodologias de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – High Performance Liquid Chromatography) e espectrometria de massa (MS – Mass Spectrometry).
- C) A partir dos produtos intermediários encontrados, propor os possíveis mecanismos químicos e/ou bioquímicos envolvidos na degradação da clorofila em função do estágio de desenvolvimento e da temperatura de secagem, bem como conhecer as condições de colheita e de secagem que resultam na retenção do pigmento verde em sementes de soja.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Amostras

4.1.1 - Origem, plantio e colheita

Três cultivares comerciais de soja (*Glycine max* L. Merr), IAS-5, IAC-17 e IAC-22 foram plantados no Instituto Agronômico de Campinas (IAC), São Paulo. O experimento foi conduzido em duas safras, uma em 1999, na qual se estudaram as variedades IAS-5 e IAC-17 e outra, em 2001, com as variedades IAC-17 e IAC-22, sendo esta última variedade caracterizada por um perfil de desenvolvimento similar à variedade IAS-5.

Foram pesados 1,5 kg de sementes de cada cultivar. As sementes foram tratadas com *Tecto*, um fungicida sistêmico do grupo dos benzimidazóis para controle da doença “damping-off”, de ocorrência comum em soja. O terreno do plantio foi riscado de forma a marcar, com uma distância de 60 em 60cm, as linhas para a semeadura e uma distância de 1,5m entre as variedades. Foram marcadas 10 fileiras de 10m de comprimento para cada variedade, como ilustrado na Figura 8. O solo foi adubado de forma a colocar 170g de adubo formulado por sulco. Após o preparo do solo, foram semeadas 30 sementes por metro linear, correspondendo aproximadamente a 240.000 sementes/ha. As semeaduras foram realizadas em 23 de novembro de 1998 e em 30 de novembro de 2000.

Figura 8 - Esquema do terreno de plantio

Para cada cultivar, as amostras foram colhidas em seis estádios de maturação, segundo a escala de Fehr & Caviness (1977), com a adição de três estádios intermediários. *Estádio R_6* , caracterizado pela existência de legumes contendo sementes verdes de tamanho máximo em qualquer um dos quatro nós superiores que tivesse a folha completamente desenrolada; três estádios intermediários entre R_6 e R_7 : $R_6-R_7(I)$, $R_6-R_7(II)$ e $R_6-R_7(III)$; *estádio R_7* , caracterizado pelo amarelamento das vagens, com 50% das folhas amareladas, o que indica a maturação fisiológica, e *estádio R_8* , quando 95% das vagens se tornam da cor palha-marrom, indicando a maturidade comercial. A adição de três estádios intermediários na escala proposta por Fehr & Caviness se deu após testes preliminares realizados com amostras cultivadas em estufa, nos quais se observou que, se considerássemos apenas a classificação clássica, não seria possível a identificação dos compostos intermediários da degradação da clorofila. Ou seja, optou-se por detalhar mais a fase entre maturação fisiológica e maturação comercial, para tentar localizar os produtos intermediários da degradação do pigmento verde. O critério de diferenciação entre os estádios intermediários R_6-R_7 (I, II e III) foi apenas temporal.

Para cada estágio de maturação foi realizada uma colheita (datas apresentadas na Tabela 2), sempre no período da manhã (entre 7-8h00). Para cada tratamento eram

colhidas as plantas de duas fileiras intercaladas, previamente sorteadas, para minimizar os efeitos de localização da planta na área de plantio. As plantas colhidas de cada variedade eram conduzidas para um galpão coberto, onde se realizava a retirada de todas as vagens que continham sementes e o acondicionamento em sacos de papel, identificados com o nome do cultivar e o estágio de colheita referentes. As vagens eram transportadas para São Paulo, ainda no período da manhã. Chegando ao laboratório, as vagens de cada cultivar colhido naquele dia eram separadas em quatro partes. Uma pequena parte para fazer análise imediata de umidade e de pigmentos nas amostras recém-colhidas, e as três partes restantes divididas homogeneamente, uma para a secagem em estufa a 40°C, outra em estufa a 75°C e a terceira para secagem à temperatura ambiente.

As datas de plantio e colheita são apresentadas na Tabela 2:

Tabela 2 – Datas de plantio e colheita das amostras de soja estudadas

		Safr 1998 - 1999		Safr 2000 - 2001	
		IAS - 5	IAC - 17	IAC - 22	IAC - 17
Plantio		23 / 11 / 1998	23 / 11 / 1998	24 / 11 / 2000	23 / 11 / 2000
Colheita - Estádios de maturação	R ₆	01 / 03 / 1999 98	03 / 03 / 1999 100	02 / 03 / 2001 99	02 / 03 / 2001 100
	R ₆ -R ₇ (I)	05 / 03 / 1999 102	07 / 03 / 1999 104	06 / 03 / 2001 103	06 / 03 / 2001 104
	R ₆ -R ₇ (II)	08 / 03 / 1999 105	10 / 03 / 1999 107	09 / 03 / 2001 106	09 / 03 / 2001 107
	R ₆ -R ₇ (III)	—	—	15 / 03 / 2001 112	15 / 03 / 2001 114
	R ₇	19 / 03 / 1999 117	21 / 03 / 1999 119	20 / 03 / 2001 119	20 / 03 / 2001 119
	R ₈	25 / 03 / 1999 123	07 / 04 / 1999 125	26 / 03 / 2001 125	26 / 03 / 2001 125

● - dias após a emergência

— não foi realizada a colheita no estágio R₆-R₇(III) nesta safra

4.1.2 - Secagem

Após a colheita, as sementes, ainda nas vagens, foram submetidas a três condições de secagem, de maneira que as sementes atingissem uma umidade final menor ou igual a 13% (exigida pelas normas de comercialização):

- **secagem ambiental** ($25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$, durante 10 dias, em galpão coberto e aberto dos lados)
- **secagem rápida** (durante 5 dias, em estufa ventilada, com temperatura de $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$)
- **secagem rápida** (durante 2,5 dias, em estufa ventilada, com temperatura de $75^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$)

Todas as amostras secas, ainda nas vagens, foram armazenadas em câmara fria (2°C - 4°C), em sacos de papel identificados com a variedade, o estágio de maturação e o tipo de secagem, protegidas da luz, até o procedimento das análises.

A seguir, na Figura 9, descreve-se o fluxograma das etapas, desde o plantio até as análises químicas.

Figura 9 – Planejamento experimental dos ensaios

4.2 – Métodos analíticos

Todas as análises a seguir foram realizadas em todos os tratamentos estudados (tanto nas sementes recém-colhidas, como também naquelas que foram submetidas à secagem). Dependendo da quantidade de amostra necessária para cada tipo de análise, preparava-se uma amostragem de vagens, adequada para a realização de triplicatas autênticas, ou seja, separava-se uma quantidade de vagens adequada para debulhar as sementes e obter três amostras de mesmo peso para cada análise. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.2.1 - Umidade das sementes

A umidade das sementes frescas recém-colhidas foi determinada em 10 g de sementes íntegras em estufa a 105°C, até atingirem peso constante (aproximadamente 36h). A umidade residual das sementes de soja secas a temperatura ambiente, a 40°C ou a 75°C, foi determinada para controlar se elas haviam atingido uma umidade menor ou igual a 13%. Foram pesadas 3 g de sementes, estas foram moídas e secas em estufa a 105°C, até peso constante (24 horas aproximadamente).

4.2.2 - Extração dos pigmentos

A extração dos pigmentos foi realizada em todas as amostras de soja, tanto nas frescas quanto nas secas, em todos os estádios de maturação. O procedimento de extração foi realizado com o cuidado em minimizar os efeitos da luz, da temperatura e da ação enzimática sobre a degradação da clorofila, protegendo, sempre que possível, as vidrarias contendo as amostras contra a incidência de luz e utilizando solventes de

extração, gelados. Todos os solventes utilizados na extração foram de grau de pureza analítica (p.a.) da marca Carlo Erba. Outro cuidado tomado foi a máxima redução do tempo de extração, minimizando a possibilidade de degradação dos pigmentos analisados. O tempo de extração foi padronizado para não ultrapassar 30 minutos entre a pesagem da amostra até a injeção no cromatógrafo.

A extração dos pigmentos verdes foi realizada em triplicata, com aproximadamente 5 g (para cada repetição) de sementes de soja secas e moídas (Polymix KCH- Analytical Mill A10, Kinematica AG, Luzern, Switzerland), para melhorar a eficiência da extração e tornar a amostra mais homogênea. A extração das amostras frescas também foi feita com 5g de sementes, com a diferença de serem trituradas diretamente com o solvente no homogeneizador, sem moagem prévia. As amostras foram homogeneizadas (Omni TH) por 2 minutos a 30000 rpm, com aproximadamente 30 mL de solução gelada de acetona 80%, de forma a manter uma relação constante de 1:6 (p/v) e depois foram filtradas a vácuo em funil com placa sinterizada. A extração de clorofila em acetona 80% foi a mais eficiente para remover a clorofila das sementes de soja, tanto frescas como secas. Foram feitos testes preliminares com outros solventes, tais como metanol, hexano, etanol e várias concentrações de acetona. A acetona a 80% e utilizada em excesso permitiu a fácil remoção da clorofila presente nos cloroplastos. Para as amostras em estádios de maturação avançados (R_7 e R_8), contendo um alto teor de óleo, foi possível a extração dos pigmentos verdes, mesmo quando estes estavam presentes em quantidades mínimas (traços). O resíduo foi submetido à reextração por duas vezes, o que foi suficiente para que a amostra não apresentasse mais coloração verde. A solução contendo os pigmentos foi transferida para um funil de separação, ao qual foi adicionado aproximadamente 50 mL de éter de petróleo e 50 mL de água destilada, para que os pigmentos migrassem para a fase etérea e a acetona fosse removida com a água. A fase aquosa foi descartada e o

procedimento de lavagem com água foi repetido 3 a 4 vezes, até que toda a acetona fosse removida. O éter de petróleo contendo os pigmentos foi desidratado com sulfato de sódio anidro e concentrado até secar em rotoevaporador (Heidolph Elektro GmbH & Co., WB2000, Kelheim, Germany). O resíduo contido no balão do rotoevaporador foi ressuspenso em 5 mL de acetona (grau HPLC) e transferido para um béquer de 10 mL. Esta última etapa do procedimento foi realizada cuidadosamente, por partes, utilizando-se alíquotas de 2 em 2 mL para lavar o balão, para minimizar a perda de pigmento retido na parede do mesmo. A suspensão foi então filtrada em membrana PTFE-Millipore (0.45µm), transferida para um vial de 1,5 mL e imediatamente analisada por cromatografia líquida.

A seguir (Figura 10) segue um fluxograma da extração dos pigmentos verdes nas amostras de soja.

Figura 10 – Fluxograma da extração dos pigmentos verdes

4.2.3 - Cromatografia líquida de alta eficiência

4.2.3.1 - Equipamentos e reagentes

A análise por HPLC (High Performance Liquid Chromatography) foi baseada no método descrito por Mangos & Berger, 1997. Foi utilizado um cromatógrafo da marca Shimadzu, Tokyo, Japan (CLASS-M10A) UV/Vis, composto de um sistema de três bombas (LC-10ADVP), injetor automático (SIL-10ADVP), forno com controle de temperatura (CTO-10ASVP), detector de arranjos de fotodiodos (SPD-M10AVP) e um sistema de software (CLASS-VP 5.032) para realizar a aquisição dos dados.

A separação foi feita em coluna Nucleosil EC 250/4 ODS 100-5 C18, conectada a uma pré-coluna CC 8/4 Nucleosil 100-5 C18, ambas da marca Macherey-Nagel, Düren, Germany.

Todos os reagentes utilizados na análise por cromatografia foram de grau HPLC, da marca Carlo Erba, e foram previamente filtrados em membrana Millipore 0.45 µm PVDF (solventes aquosos) e PTFE (solventes orgânicos). No preparo das soluções foi utilizada água purificada pelo sistema purificador de água, Millipore, modelo Milli-Q PLUS. Antes de cada corrida em HPLC, os solventes foram degaseificados durante 10 minutos, com degaseificador (gás Hélio), da marca Shimadzu, modelo DGU-2A.

4.2.3.2 - Condições cromatográficas

Para a separação dos pigmentos foi utilizado um sistema de três fases móveis, com gradiente ternário, conforme descrito por Mangos & Berger (1997):

A) Metanol / Acetato de amônio – 1M tamponado (pH 7.0 ajustado com ácido acético) (80:20 v/v)

B) Metanol / Acetona (80:20 v/v)

C) Acetona

Gradiente de eluição:

Iniciou-se o gradiente com 100% de **A**, prosseguindo linearmente até 100% de **B**, por 20 minutos

fluxo isocrático de **B**, por 2,5 minutos

fluxo linear de **B** até 100% de **C**, por 7,5 minutos

recondicionamento da coluna com o eluente inicial **A**, por 4 minutos

Vazão: 1,0 mL / minuto

Volume de injeção: 10 a 50 μ L (dependendo da concentração de pigmento contido na amostra)

Pressão máxima: 220 Kgf / cm²

Detector: arranjo de fotodiodos

Canais de detecção: 669 e 432 nm

Espectro de absorção gravado de: 380 a 670 nm (gravado de 2 em 2 segundos)

As condições cromatográficas utilizadas, empregando-se gradiente ternário com detecção UV/Vis de arranjo de fotodiodos e levando-se em consideração as diversas polaridades dos compostos, foram eficientes e proporcionaram a separação dos principais produtos polares e não-polares em uma mesma coluna de fase reversa, sem necessidade de uma etapa de pré-fracionamento em coluna aberta. A incorporação do acetato de amônio tamponado foi necessária para manter os compostos polares parcialmente dissociados, permitindo assim a sua eluição (Mangos & Berger, 1997). O gradiente de eluição com metanol-acetona como segundo eluente permitiu a separação das xantofilas e clorofilas dos feoforbídeos e clorofilídeos. A acetona como eluente final foi necessária para eluir os pigmentos mais apolares (feofitinas).

4.2.3.3 - Preparo dos padrões

Os pigmentos investigados nas amostras de sementes de soja estão descritos na Tabela 3. Foram utilizados padrões de *clorofila a* (Sigma C5753) e *clorofila b* (Sigma C5878) provenientes de espinafre, com grau de pureza de 99.99%. Os padrões de luteína (Sigma X6250) e de beta caroteno (Sigma C4582) foram utilizados apenas para investigar a presença destes carotenóides nas amostras de soja. Devido à inexistência no mercado de padrões dos derivados da clorofila, foi necessário sintetizá-los a partir dos padrões de clorofila a e b.

Tabela 3 – Pigmentos investigados nas amostras de sementes de soja

Nome	Sigla	Peso molecular* (g/mol)	Fórmula química
Clorofila a	Clo a	893,5	$C_{55}H_{72}MgN_4O_5$
Clorofila a'	Clo a'	893,5	$C_{55}H_{72}MgN_4O_5$
Clorofila b	Clo b	907,5	$C_{55}H_{70}MgN_4O_6$
Clorofila b'	Clo b'	907,5	$C_{55}H_{70}MgN_4O_6$
Feofitina a	Feo a	871,2	$C_{55}H_{74}N_4O_5$
Feofitina a'	Feo a'	871,2	$C_{55}H_{74}N_4O_5$
Feofitina b	Feo b	885,2	$C_{55}H_{72}N_4O_6$
Feofitina b'	Feo b'	885,2	$C_{55}H_{72}N_4O_6$
Clorofilídeo a	Clod a	615,0	$C_{35}H_{34}MgN_4O_5$
Clorofilídeo a'	Clod a'	615,0	$C_{35}H_{34}MgN_4O_5$
Clorofilídeo b	Clod b	628,9	$C_{35}H_{32}MgN_4O_6$
Clorofilídeo b'	Clod b'	628,9	$C_{35}H_{32}MgN_4O_6$
Feoforbídeo a	Feod a	592,7	$C_{35}H_{36}N_4O_5$
Feoforbídeo a'	Feod a'	592,7	$C_{35}H_{36}N_4O_5$
Feoforbídeo b	Feod b	606,6	$C_{35}H_{34}N_4O_6$
Feoforbídeo b'	Feod b'	606,6	$C_{35}H_{34}N_4O_6$
Beta caroteno	β -Carot	536,9	$C_{40}H_{56}$
Luteína	Lut	568,9	$C_{40}H_{56}O_2$

*Cálculo baseado nos isótopos mais abundantes: $^{12}_{6}C^{12,011}$; $^1_1H^{1,0079}$; $^{24}_{12}Mg^{24,305}$; $^{14}_7N^{14,007}$; $^{16}_8O^{15,999}$

Os epímeros clorofila a' e clorofila b' foram preparados dissolvendo-se os padrões de clorofila a e b em piridina e deixando-os reagir no escuro à temperatura ambiente (Mangos & Berger, 1997). As feofitinas (Feo a e Feo b) e seus respectivos epímeros Feo a' e Feo b' foram preparados por acidificação controlada com HCl (2M)

das soluções padrão de Clo a, Clo b, Clo a' e Clo b', levando à remoção do átomo de magnésio do centro do anel pirrólico (Mangos & Berger, 1997). Os derivados defitilados, clorofilídeos (Clod a, Clod b, Clod a' e Clod b') e feoforbídeos (Feod a, Feod b, Feod a' e Feod b') foram obtidos por hidrólise enzimática controlada das suas respectivas clorofilas e feofitinas originais, empregando-se a enzima clorofilase extraída de casca de citrus, seguindo metodologia descrita por Johnson-Flanagan & Thiagarajah (1990) e Amir-Shapira *et al.* (1987). Todos os derivados foram eluídos na coluna cromatográfica e suas características espectrais e tempos de retenção foram armazenados para posterior comparação com os picos encontrados nas amostras e com dados da literatura. Os espectros de absorção de cada substância foram obtidos através de análises de varredura entre 380 e 750 nm, realizadas durante as corridas no cromatógrafo.

As curvas padrão dos pigmentos Clo a, Clo b, Feo a e Feo b foram construídas a partir de seis diluições entre 50 e 150% do valor nominal da amostra. Cada diluição foi preparada em triplicata e cada uma das soluções foi injetada três vezes. Com as concentrações e as áreas obtidas para cada pico referente a cada solução, efetuou-se a análise de regressão linear, obtendo-se assim as curvas padrão. As áreas dos picos encontrados nas amostras foram calculadas e os resultados interpolados nas curvas de calibração, para estimar a concentração dos pigmentos existentes nas amostras analisadas.

Os limites de detecção e quantificação foram determinados segundo Snyder & Kirkland (1979), utilizando-se as soluções padrão, e foram calculados considerando-se três e cinco vezes a altura média do ruído, respectivamente.

4.2.3.4 - Separação e identificação dos compostos

Após o procedimento de extração, todas as amostras, preparadas em triplicata, foram imediatamente submetidas à cromatografia de fase reversa para evitar possíveis reações de degradação e isomerização. As medidas das áreas dos picos foram utilizadas para quantificar os correspondentes pigmentos através das curvas de calibração dos respectivos padrões. Ou seja, pela medida da área, o valor da concentração (mg de pigmento / mL de solução) foi estimado através da equação de regressão da curva padrão. Em seguida, o teor de pigmento da amostra foi calculado levando em consideração todas as diluições feitas ao longo do procedimento. A unidade final dos cálculos foi dada em ppm ou (mg de pigmento / kg de amostra) em base seca.

Alguns carotenóides (luteína e outras xantofilas), clorofilas (Clo a, Clo b, Clo a' e Clo b') e seus principais derivados (Feo a, Feo b, Feo a', Feo b', Clod a, Clod b, Feod a e Feod b) foram identificados de acordo com seus respectivos comportamentos cromatográficos, caracterizados pelo tempo de retenção e pelo espectro de absorção UV/Vis, na faixa de comprimento de onda entre 380 e 670 nm. O perfil espectral de cada substância encontrada foi sobreposto ao do padrão referencial correspondente, permitindo assim a identificação dos pigmentos.

4.2.4 – Confirmação da identidade por espectrometria de massa

Para a confirmação dos compostos identificados por cromatografia líquida (HPLC), foi empregado o método de espectrometria de massa. Após separação dos pigmentos por tempos de retenção diferentes, foram coletadas manualmente as frações relativas a cada pico e identificadas por espectrometria de massa.

Foi utilizado o método de espectrometria de massa por dessorção de plasma (PDMS = Plasma Desorption Mass Spectrometry), que é usado para determinar a massa de biomoléculas não voláteis (MacFarlane & Torgerson, 1974; Chait *et al.*, 1981). O método se baseia na produção de íons secundários pela colisão da amostra com íons de alta energia, medindo-se o tempo de voo (TOF – Time of Flight). A fissão espontânea do radionuclídeo califórnio ^{252}Cf é a característica principal desta técnica. Em cada evento de fissão ocorre movimentação de pares de íons pesados, energizados, para direções opostas. Um deles colide com o detector (“start detector”) acionando um cronômetro eletrônico de alta precisão, enquanto o outro colide com a amostra, dessorvendo e ionizando moléculas da superfície. Os íons secundários emitidos pela superfície da amostra são acelerados eletrostaticamente em direção a uma rede e viajam por uma região livre com velocidade constante, até colidirem com um segundo detector (“stop detector”). O intervalo de tempo medido entre o início e o fim da corrida, correspondente ao tempo de voo, pode ser convertido em valor de massa através de um procedimento prévio de calibração (Macchione, 1998).

Empregou-se um espectrômetro de massa desenvolvido no Laboratório de Instrumentação e Partículas (LIP) do Instituto de Física da Universidade de São Paulo (Macchione, 1998). O equipamento foi operado à pressão de 10^{-7} Torr, potencial de aceleração de +13,5 kV e a aquisição dos espectros foi feita com acúmulo de dados de 10^6 medidas de intervalo de tempo.

As amostras para análise por PDMS (Plasma Desorption Mass Spectrometry) foram preparadas com 160 μL de solução contendo o pigmento, em uma concentração de aproximadamente 2 mg / mL de acetona. A alíquota foi depositada sobre um substrato de “mylar” aluminizado, coberto com nitrocelulose e, após secagem, o suporte, contendo a amostra, foi introduzido no espectrômetro.

4.3 – Tratamento dos dados

Três experimentos (I, II e III) foram realizados e repetidos em dois anos alternados. Em cada safra, duas variedades de soja foram cultivadas em campo pelo Instituto Agrônomo de Campinas, Seção de Leguminosas, IAS-5 e IAC-17 na safra de 1999 e IAC-17 e IAC-22 na safra de 2001. Em cada ano, cada cultivar foi colhido em seis estádios de maturação (R_6 , $R_6-R_7(I)$, $R_6-R_7(II)$, $R_6-R_7(III)$, R_7 e R_8 , com base na escala de Fehr & Caviness (1977) e foram feitas análises nessas sementes recém-colhidas (experimento I) para acompanhar as alterações de pigmentos durante a maturação no campo (Figura 11). Após a colheita nos diversos estádios de maturação, as sementes de soja foram submetidas a três condições de secagem: temperatura ambiente, estufa a 40°C e estufa a 75°C; nestas amostras secas também foram realizadas as análises (experimento II). Neste experimento II, no total foram analisadas 36 amostras distintas (2 variedades X 6 estádios de maturação X 3 secagens) para cada safra (1999 e 2001). A extração dos pigmentos seguida de análise por cromatografia foi realizada em triplicata, gerando um conjunto de 216 cromatogramas (Figura 12). As substâncias encontradas em cada cromatograma foram comparadas aos dados da literatura e aos padrões dos pigmentos de interesse, comparando-se o tempo de retenção e o perfil de absorção eletromagnética de cada um; desta maneira, os picos foram identificados. Para cada pigmento identificado foi feita a análise em espectrômetro de massa, gerando os espectros de massa relativos às amostras e comparados com os padrões para confirmar a identificação por cromatografia. Desta forma, foi possível visualizar o acúmulo das clorofilas a e b e seus derivados, segundo método de Weemaes *et al.*, 1999 e Mangos & Berger, 1997. A partir desses resultados foi traçado o perfil de degradação da clorofila durante as diferentes condições postuladas no modelo experimental.

Adicionalmente, apenas a amostra IAC-17 submetida à secagem lenta a temperatura ambiente, durante 10 dias, foi analisada, em triplicata, diariamente durante esta secagem e a degradação da clorofila e o aparecimento de seus derivados foram monitorados para construir a cinética de degradação da clorofila durante a secagem nesta temperatura (experimento III). Este grupo de sementes analisadas em triplicata gerou um conjunto de 150 amostras (1 variedade X 5 estádios de maturação X 10 dias de secagem) (Figura 13).

Os dados foram computados e as análises de regressão dos padrões e gráficos conclusivos das amostras foram feitos pelos programas "Excel", "Origin" e "Statistica Software Package".

A seguir, apresentamos nas Figuras 11-13, os fluxogramas dos tratamentos de dados para os conjuntos de amostras.

Figura 11 – Fluxograma do tratamento de dados para medir as alterações nos pigmentos **durante a maturação no campo**

Figura 12 – Fluxograma do tratamento de dados para medir as alterações nos pigmentos após os tratamentos de secagem (25°, 40° e 75° C)

Figura 13 – Fluxograma do tratamento de dados para medir as alterações nos pigmentos **durante a secagem lenta à temperatura ambiente (25°C)**

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 – Teores de umidade

Os teores de umidade das amostras de soja de diferentes variedades, recém-colhidas, referentes ao experimento I, em vários estádios de maturação nas safras de 1999 e 2001 foram medidos e os resultados estão apresentados na Tabela 4, representando a perda de umidade dos grãos, ocorrida naturalmente no campo.

Tabela 4 – Teores de umidade das sementes de soja recém-colhidas em diferentes estádios de maturação

Estádios de maturação	Umidade (%)							
	Safr 1999				Safr 2001			
	IAS – 5	IAC – 17	IAC – 22	IAC – 17	Média total	DP	EP	CV
R ₆	73,9 ^a ± 0,1	72,2 ^a ± 0,5	69,0 ^a ± 0,2	71,4 ^a ± 0,3	71,6	1,86	0,54	2,59
R ₆ -R ₇ (I)	68,3 ^b ± 0,2	67,5 ^b ± 0,3	66,8 ^b ± 0,1	68,4 ^b ± 0,3	67,7	0,74	0,21	1,09
R ₆ -R ₇ (II)	66,6 ^c ± 0,3	65,4 ^c ± 0,4	66,7 ^c ± 0,1	64,3 ^c ± 0,4	64,2	4,13	1,19	6,43
R ₆ -R ₇ (III)	-*	-*	58,7 ^d ± 0,2	62,1 ^d ± 0,6	60,4	1,91	0,55	3,17
R ₇	34,6 ^e ± 0,2	36,2 ^e ± 0,3	28,6 ^e ± 0,5	31,5 ^e ± 0,3	32,7	3,08	0,89	9,41
R ₈	11,9 ^f ± 0,5	12,7 ^f ± 0,4	13,6 ^f ± 0,3	14,9 ^f ± 0,5	13,3	1,24	0,36	9,37

-* não foram colhidas amostras em R₆-R₇ (III) nesta safra
 DP – desvio padrão; EP – erro padrão; CV coeficiente de variação
 médias de triplicatas ± d.p.
 a,b,c,d,e,f – médias não diferem significativamente entre si; t < t_(4, 005)

O perfil de secagem das sementes no campo, nos seus diversos estádios de maturação, foi semelhante nos dois anos de colheita, não houve diferença significativa

entre as variedades ($p < 0,05$), foi lento no início (do estágio R_6 até o estágio $R_6-R_7(III)$), variando entre $71,4 \pm 2,0\%$ e $60,4 \pm 2,4\%$. A partir do estágio R_7 (maturação fisiológica) a perda de água foi rápida, atingindo valores entre 12 e 15% no estágio R_8 (maturação comercial), podendo estes valores variar em função das condições climáticas e da variedade da soja (Marcos Filho, 1986). Estas mudanças podem ser melhor visualizadas na Figura 14. A brusca perda de umidade observada nos dois estádios finais da maturação, comparada à lenta perda de umidade nos estádios iniciais, ocorreu pela interrupção de translocação de água e matéria orgânica para as sementes, fato que ocorre a partir da maturação fisiológica. A planta inicia a senescência e perde água por evaporação.

Figura 14 – Teores de umidade (%) em sementes de soja recém-colhidas em seis estádios de maturação

As sementes colhidas nestes diversos estádios de maturação e secas em três condições de temperatura (25°, 40° e 75°C) atingiram teores de umidade inferiores a 13%. Segundo Pritchard (1983) os grãos devem atingir um grau de umidade igual ou inferior a 13%, para evitar a deterioração por reações enzimáticas ou por desenvolvimento de microrganismos e fungos, que produzem lipases hidrolíticas e, conseqüentemente, aumentam o teor de ácidos graxos livres (Pritchard, 1983). Porém, como observado no trabalho de Gomes (1998), mesmo colhendo a soja no estágio de maturação R₈, não se tem a garantia de obter sementes com conteúdo de umidade adequado, já que este pode mudar conforme os índices pluviométricos na época de colheita. Para caracterizar o perfil hídrico da região de plantio durante o período dos experimentos, apresentamos na Tabela 5 os índices pluviométricos totais dos meses, desde o plantio até a colheita de cada safra.

Tabela 5 – Índices pluviométricos mensais referentes às safras de 1999 e 2001

MESES	Índices Pluviométricos totais mensais (mm chuva)*	
	Safra	
	1998-1999	2000-2001
Novembro (Plantio)	75,4	276,2
Dezembro	309,1	216,7
Janeiro	421,3	167,7
Fevereiro (início da colheita)	228,1	316,9
Março (final da colheita)	140,5	113,9

*Dados fornecidos pela Estação Experimental do IAC - Campinas – SP

Durante a fase vegetativa, do início do plantio (novembro) até o período que antecedeu a colheita (janeiro), os índices pluviométricos totais mensais das duas

safras foram bastante distintos. Em novembro de 2001, mês de plantio, choveu quase 4 vezes mais do que no mesmo mês de 1999; nos dois meses seguintes houve uma inversão, ocorrendo mais chuvas em 1999 (309,1 e 421,3 mm) do que em 2001 (216,7 e 167,7 mm). No período entre o início e o fim da colheita (fevereiro e março) as diferenças hídricas entre as duas safras foram menores. Assim, essas diferenças hídricas, mais suaves no período da colheita, não interferiram no comportamento das variedades frente à perda de umidade e a desidratação de todas as variedades nas duas safras foi semelhante.

Além do controle de umidade das sementes, imediatamente após a colheita em cada estágio de maturação, foram feitas medidas de umidade nas amostras após os tratamentos de secagem, nas três condições previstas no experimento: temperatura ambiente (25°C) por 10 dias, estufa a 40°C por 5 dias e estufa a 75°C por 2 dias e os resultados são apresentados na Tabela 6.

Todos os tratamentos de secagem garantiram um teor de umidade seguro para comercialização e estocagem dos grãos; ou seja, abaixo de 13%. As sementes de soja secas à temperatura ambiente (25°C) alcançaram teores de umidade de 9,9%, enquanto que as secagens rápidas a 40° e 75°C abaixaram esses teores para 7,5% e 3,8%, respectivamente. A secagem rápida em temperatura de 75°C provocou uma queda brusca nos teores de umidade e levou a um escurecimento na superfície da semente. Um teste anterior, utilizando secagem a 80°C, queimou a superfície das sementes, indicando que esta temperatura de secagem foi inadequada para reduzir a umidade de sementes de soja, pois causou comprometimento de outras substâncias.

Tabela 6 - Umidade residual das sementes secas em três condições: temperatura ambiente, estufa a 40°C e estufa a 75°C

Estádio de maturação	Secagem	Teor de Umidade (%)*			
		Safrá 1999		Safrá 2001	
		IAS-5	IAC-17	IAC-22	IAC-17
R₆	Temp. ambiente (25°C)	11,31 ± 0,07	11,49 ± 0,17	9,22 ± 0,08	8,76 ± 0,05
	Estufa a 40°C	9,74 ± 0,19	9,22 ± 0,27	5,61 ± 0,17	6,58 ± 0,23
	Estufa a 75°C	—	—	1,85 ± 0,07	1,87 ± 0,12
R₆-R₇ I	Temp. ambiente (25°C)	11,53 ± 0,06	11,26 ± 0,27	8,18 ± 0,20	7,98 ± 0,12
	Estufa a 40°C	9,35 ± 0,08	9,74 ± 0,41	5,62 ± 0,18	6,44 ± 0,10
	Estufa a 75°C	—	—	3,42 ± 0,13	3,31 ± 0,11
R₆-R₇ II	Temp. ambiente (25°C)	11,45 ± 0,19	12,01 ± 0,07	10,57 ± 0,06	9,16 ± 0,11
	Estufa a 40°C	9,44 ± 0,33	9,11 ± 0,20	6,22 ± 0,13	6,25 ± 0,13
	Estufa a 75°C	—	—	4,38 ± 0,19	4,99 ± 0,19
R₆-R₇ III	Temp. ambiente (25°C)	—	—	8,95 ± 0,10	8,55 ± 0,01
	Estufa a 40°C	—	—	5,53 ± 0,11	5,36 ± 0,15
	Estufa a 75°C	—	—	5,73 ± 0,26	4,41 ± 0,20
R₇	Temp. ambiente (25°C)	11,15 ± 0,16	10,77 ± 0,09	8,53 ± 0,10	8,07 ± 0,08
	Estufa a 40°C	9,81 ± 0,27	9,56 ± 0,25	4,98 ± 0,08	4,44 ± 0,19
	Estufa a 75°C	—	—	3,93 ± 0,12	3,35 ± 0,09
R₈	Temp. ambiente (25°C)	12,53 ± 0,31	12,18 ± 0,42	7,35 ± 0,53	6,89 ± 0,11
	Estufa a 40°C	11,87 ± 0,09	11,58 ± 0,67	4,95 ± 0,12	4,60 ± 0,08
	Estufa a 75°C	—	—	4,44 ± 0,03	4,00 ± 0,11

Média geral Temp. ambiente 25°C: 9,90

Média geral Estufa 40°C: 7,54

Média geral Estufa 75°C: 3,81

* médias de triplicata ± d.p.

5.2 – Tipos de pigmentos encontrados nas amostras

Após os tratamentos de secagem das sementes colhidas nos diferentes estádios de maturação e a extração dos pigmentos por solventes orgânicos, estes foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), como descrito nos itens 4.1.2, 4.2.2 e 4.2.3.2, respectivamente, obtendo-se os cromatogramas correspondentes. Um primeiro ensaio foi realizado com uma amostra representativa de cada estágio de maturação, para verificar se as condições cromatográficas eram adequadas e que tipos de pigmentos poderiam ser encontrados nas amostras.

Na Figura 15 é apresentado um cromatograma representativo de um extrato de sementes de soja contendo a maioria dos pigmentos. O cromatograma ilustra a complexidade dos extratos, devido à diversidade dos compostos existentes, mas também demonstra a boa separação dos picos. Independente do estágio de maturação, os pigmentos mais frequentemente encontrados e em maior abundância foram: luteína, clorofila a, clorofila b, feofitina a e feofitina b, por ordem decrescente. Os pigmentos menos frequentes e em menor abundância foram identificados como: epímeros de clorofila a' e b', de feofitina a' e b', clorofilídeos a e b, feoforbídeos a e b. Alguns outros picos menores, que não foram identificados, parecem ser xantofilas, por comparação com dados na literatura. Não foi observada a presença de beta-caroteno em nenhuma amostra de soja, fato também observado por Monma *et al.* (1994). Segundo esses autores, a explicação seria a rápida degradação do beta-caroteno e a retenção de xantofilas e clorofilas na maturação da soja. De modo geral, ao longo da maturação, menos tipos e menores quantidades de clorofilas e seus derivados coloridos foram detectados. Em estádios avançados de maturação (R_8), praticamente apenas a luteína foi detectada em concentrações cada vez menores.

Figura 15 - Cromatograma representativo de um extrato de soja (IAC-17, colhida no estágio R₆, seca em estufa a 40°C)

Apesar da diversidade de pigmentos investigados, todos os derivados da clorofila foram bem separados, exceto os epímeros clorofila a', clorofila b', feofitina a' e feofitina b', que eluíram imediatamente após os seus respectivos parentes: clorofila a, clorofila b, feofitina a e feofitina b, devido à similaridade dos pesos moleculares e das suas polaridades.

As diversas substâncias encontradas nas amostras foram identificadas tentativamente, tendo como base os tempos de retenção descritos por Mangos & Berger (1997). Na Tabela 7 apresenta-se uma comparação dos tempos de retenção dos diversos pigmentos reportados por Mangos & Berger com aqueles obtidos nestes experimentos. Os resultados apresentados neste trabalho se referem aos valores médios de tempos de retenção para todas as amostras analisadas nas duas safras.

Tabela 7 – Tempos de retenção dos pigmentos encontrados

Pigmentos	Tempos de retenção (minutos) $\pm$ DP				
	Safrá				
	Mangos & Berger (1997)	1999	n	2001	n
Clorofilídeo b	4,91	7,68 $\pm$ 0,58	9	7,71 $\pm$ 0,67	12
Clorofilídeo a	9,12	9,76 $\pm$ 0,47	9	9,82 $\pm$ 0,89	12
Feoforbídeo b	13,50	12,56 $\pm$ 0,36	18	12,64 $\pm$ 0,38	17
Feoforbídeo a	16,07	13,63 $\pm$ 0,22	21	13,65 $\pm$ 0,14	27
Luteína	23,22	19,99 $\pm$ 0,21	60	20,51 $\pm$ 0,26	213
Clorofila b	25,02	21,75 $\pm$ 0,14	56	22,43 $\pm$ 0,26	205
Clorofila b'	25,45	22,46 $\pm$ 0,18	18	22,82 $\pm$ 0,25	96
Clorofila a	27,07	23,38 $\pm$ 0,12	48	24,17 $\pm$ 0,43	192
Clorofila a'	27,92	23,93 $\pm$ 0,12	18	24,66 $\pm$ 0,51	78
Feofitina b	32,54	27,50 $\pm$ 0,12	36	27,71 $\pm$ 0,48	184
Feofitina b'	32,66	27,97 $\pm$ 0,17	18	28,17 $\pm$ 0,38	93
Feofitina a	32,95	28,85 $\pm$ 0,21	42	28,98 $\pm$ 0,59	199
Feofitina a'	32,97	29,11 $\pm$ 0,17	24	29,39 $\pm$ 0,32	111

n= número de ocorrências

Os pigmentos encontrados nestes experimentos foram os mesmos daqueles encontrados por Mangos & Berger (1997) e tiveram a mesma ordem de eluição, porém os tempos de retenção foram ligeiramente diferentes, provavelmente pelas diferenças de equipamento e condições cromatográficas utilizadas.

A confirmação da identidade desses compostos foi realizada através da comparação das características espectrais de absorção no visível e de massa de cada pico identificado, com as características dos padrões.

No entanto, a identificação e quantificação de todos esses pigmentos e seus produtos derivados formados durante a maturação da soja foram dificultadas pelo fato de somente dois dos pigmentos (clorofila a e b) serem comercialmente disponíveis. Apresenta-se a seguir as características dos padrões de clorofila a, clorofila b, feofitina a, feofitina b, luteína e beta-caroteno. Os pigmentos defitiliados (clorofilídeos e feoforbídeos) foram encontrados apenas em concentrações mínimas (traços) e

portanto, não houve preocupação em quantificá-los, apenas em compará-los com dados da literatura.

5.3 – Curvas de calibração e características espectrais dos padrões

Os padrões obtidos segundo item 4.2.3.3, descrito em materiais e métodos, foram utilizados para a quantificação dos pigmentos existentes nas amostras. Na Tabela 8 estão apresentadas as regressões lineares obtidas das curvas de calibração para clorofila a, clorofila b, feofitina a e feofitina b. As concentrações de cada padrão nas soluções utilizadas para a construção das curvas foram adequadas aos valores encontrados nas amostras. Foi aplicada a análise de variância (ANOVA) para cada curva de calibração. A linearidade de todas as curvas padrão para as diversas faixas de concentração foi estatisticamente significativa, como pode ser observado na Tabela 8. Os valores dos coeficientes de correlação $R^2_{\text{regressão}}$ foram superiores a 80% e os valores de $F_{\text{ajuste}} (1,16, 95\%)$ foram todos significativamente maiores do que o $F_{\text{tabelado}} = 4,49$, demonstrando que todas as regressões apresentaram um bom ajuste.

Tabela 8 – Linearidade e limite de detecção dos padrões

Pigmento	Faixa (mg/mL)	$y = ax + b$	$R^2_{\text{regressão}}$	$F_{\text{ajuste}(1,16,95\%)}$	Limite de detecção (μg)
Clorofila a	0,0025-0,1	$y = 3,8836\text{E-}8 x - 0,0029$ $\pm 0,0000 \quad \pm 0,00018$	0,9866	1327,043	1,2
Clorofila b	0,0025-0,1	$y = 1,0705\text{E-}8 x + 0,0021$ $\pm 0,0000 \quad \pm 0,00158$	0,9915	1807,476	1,3
Feofitina a	0,002-0,1	$y = 2,4954\text{E-}8 x + 0,0021$ $\pm 0,0000 \quad \pm 0,0010$	0,9943	2988,842	1,4
Feofitina b	0,002-0,1	$y = 8,8559\text{E-}8 x + 0,00041$ $\pm 0,0000 \quad \pm 0,00018$	0,9949	1192,649	1,4

n=18 para cada pigmento

y=concentração (mg/ml)

a, b – coeficientes de regressão significativos ($p < 0,05$)

x= área do pico

A seguir são apresentadas algumas características espectrais (de absorção e de massa) de cada padrão: clorofila a, clorofila b, feofitina a e feofitina b, que permitiram a correta identificação dos pigmentos nas amostras. Para cada substância encontrada nas amostras, fez-se a identificação e quantificação por comparação com essas características.

5.3.1 –Clorofila a

A curva padrão, o espectro de absorção (Vis) e o espectro de massa, específicos da clorofila a (Sigma), são observados nas Figuras 16, 17 e 18, respectivamente.

Figura 16 – Curva de calibração obtida para clorofila a

Figura 17 – Espectro de absorção visível obtido para clorofila a

Figura 18 – Espectro de massa obtido para clorofila a

5.3.2 – Clorofila b

A curva padrão, o espectro de absorção e o espectro de massa, específicos da clorofila b (Sigma), são observados nas figuras 19, 20 e 21, respectivamente.

Figura 19 – Curva de calibração obtida para clorofila b

Figura 20 – Espectro de absorção visível obtido para clorofila b

Figura 21 – Espectro de massa obtido para clorofila b

5.3.3 – Feofitina a

A curva padrão, o espectro de absorção e o espectro de massa, específicos da feofitina a (sintetizada a partir do padrão autêntico de clorofila a da Sigma), são observados nas figuras 22, 23 e 24, respectivamente.

Figura 22 – Curva de calibração obtida para feofitina a

Figura 23 – Espectro de absorção visível obtido para feofitina a

Figura 24 – Espectro de massa obtido para feofitina a

5.3.4 – Feofitina b

A curva padrão, o espectro de absorção e o espectro de massa, específicos da feofitina b (sintetizada a partir do padrão autêntico de clorofila b da Sigma), são observados nas figuras 25, 26 e 27, respectivamente.

Figura 25 – Curva de calibração obtida para feofitina b

Figura 26 – Espectro de absorção obtido para feofitina b

Figura 27 – Espectro de massa obtido para feofitina b

5.3.5 – Carotenóides (luteína e beta-caroteno)

Espectros de absorção dos padrões de luteína – Sigma (Figura 28) e de beta caroteno - Sigma (Figura 29).

Figura 28 – Espectro de absorção obtido para luteína

Figura 29 – Espectro de absorção obtido para beta-caroteno

5.4 – Alterações nos pigmentos durante a maturação no campo (experimento I)

Para cada estágio de maturação (entre R_6 e R_8) foram feitas as análises nas sementes de soja recém-colhidas para investigar as alterações dos pigmentos durante a maturação no campo. Nestas amostras foram detectadas apenas clorofilas a e b e seus epímeros, os derivados provenientes de feofitinação e xantofilas. Ao contrário do esperado, foi encontrado apenas um teor muito reduzido de feofitinas em qualquer um dos estádios de maturação: de 10 a 34 vezes menor do que os teores de clorofila. Os pigmentos defetilados (clorofilídeos e feoforbídeos) não foram encontrados. A partir dos cromatogramas obtidos, com os espectros de absorção respectivos a cada composto e após comparação com as curvas padrão correspondentes, foram quantificados os seguintes pigmentos: clorofila a, clorofila b, feofitina a e feofitina b. Os resultados das análises estão apresentados nas Figuras 30 e 31.

Figura 30 – Teores de clorofila (ppm) e umidade (%) durante a maturação no campo

Figura 31 – Teores de feofitina (ppm) e umidade (%) durante a maturação no campo

Segundo Schwartz & Lorenzo (1990), a proporção de clorofila a:b normalmente encontrada na natureza é de aproximadamente 3 para 1 em folhas verdes. Johnson-Flanagan & Thiagarajah (1990) encontraram uma proporção de 2,5 para 1 em sementes de canola e relataram que a clorofila a é menos estável do que a clorofila b, levando a uma diminuição da relação clorofila a:b de até 2 para 1, com o amadurecimento dos grãos de canola.

No presente experimento, tanto a clorofila a quanto a clorofila b foram degradadas durante a fase de maturação das sementes no campo (Figura 30). Observou-se também que a clorofila a teve uma degradação mais acentuada do que a clorofila b, como era de se esperar, reduzindo o seu teor em 92% entre o início da maturação (R₆) com 377 ppm e a maturação completa (R₈) com 29 ppm, enquanto que a clorofila b teve uma redução de 70% neste mesmo período, ou seja a taxa de degradação da clorofila a foi 22% maior do que a da clorofila b. Este fenômeno também pode ser observado através da relação clorofila a:b, que apresentou um decréscimo de 2,6 : 1 no estágio R₆ para 1,8:1 na maturação fisiológica (estádio R₇),

valores próximos daqueles descritos por Johnson-Flanagan & Thiagarajah (1990) em estudos realizados durante a maturação de sementes de canola.

Na Figura 31 observa-se que os teores de feofitina decresceram gradualmente com o avanço da maturação, porém é importante ressaltar que as concentrações de feofitina (que variaram entre 15,3 e 4,2 ppm) foram significativamente menores do que as de clorofila (que variaram entre 527 e 43 ppm), representando menos de 10% dos valores de clorofila total.

Era de se esperar que a degradação da clorofila fosse acompanhada de síntese de feofitina, aumentando os seus teores numa proporção inversa, ou então, que houvesse, paralelamente, formação de outros derivados provenientes de degradação por via enzimática (clorofilídeos e feoforbídeos). Porém, o reduzido acúmulo de feofitina e a sua degradação durante a maturação, simultânea à degradação da clorofila, sugere que a síntese de feofitina é acompanhada de uma rápida degradação, provavelmente por via enzimática, e não se consegue observar o seu acúmulo.

Os resultados obtidos neste trabalho são comparáveis aos reportados por Johnson-Flanagan & Thiagarajah (1990) e por Cenkowski *et al.* (1993), que estudaram o amadurecimento de sementes de canola. Estes autores observaram teores de feofitina e outros derivados defitilados significativamente menores (cerca de 80 vezes) do que os de clorofila. No óleo de canola correspondente, foi encontrado predominantemente feofitina. Esses resultados são diferentes daqueles encontrados em estudos de cinética em espinafre (Teng & Chen, 1999), azeitona (Mínguez-Mosquera *et al.*, 1994), feijão verde (Cano *et al.*, 1998; Monreal *et al.*, 1999) e salsa (Yamauchi & Watada, 1993), em que grande parte da clorofila foi preferencialmente convertida em feofitina e uma menor porcentagem foi convertida em derivados defitilados, sugerindo diferentes vias de degradação da clorofila.

Outra possibilidade seria a degradação da clorofila para outras substâncias, que não a feofitina (já que a síntese desta é mínima). De R₆ até R₆-R₇(III) houve uma perda significativa de clorofila a e b, sendo que nesse mesmo intervalo de tempo, não houve aumento dos teores de feofitina. Ao contrário, a feofitina se manteve praticamente constante até R₆-R₇(II). Entre R₆-R₇(II) e (III) foi observada uma perda de aproximadamente 50% da feofitina total. Nesse período os teores de umidade ainda estavam altos, o que fez pensar em uma degradação por via enzimática. Porém, a ausência de catabólitos defitilados (clorofilídeos e feoforbídeos) indica que não houve ação da enzima clorofilase. Outros autores (Heaton & Marangoni, 1996 e Takamyia *et al.*, 2000) têm relatado a possibilidade de outras enzimas, além da clorofilase, estarem atuando sobre a clorofila. Enzimas tais como magnésio-dequelatase e oxigenases poderiam atuar diretamente na clorofila ou nos derivados, sendo que as oxigenases clivam o anel tetrapirrólico, formando compostos incolores fluorescentes, e estes compostos fluorescentes são convertidos em compostos incolores não fluorescentes (Figura 7). Segundo Takamyia *et al.* (2000), em sementes de canola, as clorofilases, *in vivo*, têm atividade latente, o que poderia explicar a ausência de derivados defitilados nessas amostras. Os resultados deste trabalho fortalecem a hipótese destes autores acima citados, de que a degradação da clorofila ocorre por múltiplas vias enzimáticas, simultaneamente, não se restringindo apenas à clorofilase, assim como de que a velocidade de degradação dos metabólitos formados é mais alta do que a velocidade de síntese dos mesmos, e que estes desaparecem rapidamente, sem deixar rastros, o que dificulta o estudo de cinética. Mais estudos são necessários sobre a atividade enzimática e o aparecimento dos derivados incolores fluorescentes para comprovar estas hipóteses.

Com relação ao conteúdo de clorofila sob o ponto de vista de qualidade dos grãos, ressalta-se que a colheita realizada no estágio de maturação comercial não é

uma garantia de um conteúdo de clorofila e de umidade reduzidos. Teores de umidade superiores a 13% exigem que os grãos sejam secos para viabilizar o seu armazenamento antes do processamento.

5.5 – Alterações nos pigmentos durante a secagem à temperatura ambiente (25°C)

A degradação da clorofila em sementes de soja da variedade IAC-17 foi monitorada durante 10 dias de secagem lenta à temperatura ambiente (25°C), que se refere ao experimento III. Neste conjunto de amostras foram detectados os mesmos pigmentos encontrados nas amostras durante a maturação no campo, isto é, clorofila, feofitina e xantofilas. Na Tabela 9 apresentamos os teores de clorofila e feofitina totais, bem como as relações entre clorofila a e b e feofitina a e b.

O mecanismo de degradação da clorofila durante a secagem lenta a 25°C parece ser o mesmo daquele ocorrido durante a maturação no campo, uma vez que foram encontradas apenas quantidades muito reduzidas de feofitina, mas nenhum outro derivado da degradação da clorofila.

A soja colhida em estágio de maturação prematuro (R₆) contém um elevado teor de clorofila (527ppm) e a secagem destas sementes a 25°C, por 10 dias, promoveu a degradação da clorofila até 53 ppm, índice considerado inadequado para a produção de óleo (Mounts *et al.*, 1990; Cenkowski & Jayas, 1993). Em estádios intermediários entre R₆ e a maturação fisiológica (R₇), a secagem lenta promoveu uma degradação praticamente total da clorofila, restando apenas quantidades residuais. Conclui-se que é possível colher as sementes mesmo dias antes da maturação fisiológica e garantir a degradação da clorofila com uma secagem lenta a 25°C.

Os teores de feofitina, ao final da secagem das sementes colhidas em todos os estádios de maturação, foram reduzidos, inferiores a 8 ppm.

Tabela 9 – Teores de clorofila e feofitina e relação a/b em sementes de soja IAC-17, colhidas em seis estádios de maturação, durante a secagem à temperatura ambiente (25°C)

Estádios de maturação	Tempo de secagem (dias) a temp. ambiente (25°C)	Teor de pigmentos (ppm)			
		Clorofila		Feofitina	
		Total	a/b	Total	a/b
R ₆	Recém-colhidas	527	2,51	15,3	1,70
	1	364	2,50	25,6	1,78
	2	281	2,47	38,9	1,68
	3	219	2,77	43,7	2,19
	4	156	3,20	43,1	2,50
	5	117	2,25	28,2	2,03
	6	90	2,30	24,3	2,07
	7	82	2,42	20,8	2,58
	8	77	2,60	15,8	2,29
	9	67	3,20	13,6	2,48
	10	53	2,78	7,6	1,62
R ₆ -R ₇ (I)	Recém-colhidas	352	2,20	15	2,12
	1	289	3,20	21,4	1,80
	2	233	2,90	29,8	1,80
	3	202	3,04	36,4	1,80
	4	164	3,43	26,9	1,60
	5	125	2,80	22,4	1,54
	6	96	2,30	16,1	1,33
	7	48	3,80	13,7	1,40
	8	29	2,20	12,2	1,30
	9	21	2,0	9,8	1,27
	10	18	2,0	6,0	1,22
R ₆ -R ₇ (II)	Recém-colhidas	250	2,30	13,7	2,11
	1	153	2,06	17,7	2,00
	2	136	2,67	19,2	2,10
	3	103	2,32	21,9	1,90
	4	81	2,24	15,8	1,11
	5	54	2,37	11,6	1,15
	6	38	3,20	10,4	1,31
	7	22	2,60	9,1	1,33
	8	16	2,20	7,6	1,71
	9	10	2,33	6,6	1,44
	10	8	3,00	3,1	2,10
R ₆ -R ₇ (III)	Recém-colhidas	185	3,10	7,5	2,26
	1	144	3,20	11,6	2,31
	2	95	2,90	13,8	2,54
	3	77	2,60	12,3	1,93
	4	54	1,84	11,3	2,05
	5	44	1,90	9,1	1,46
	6	28	1,30	6,5	1,70
	7	21	1,30	5,2	1,90
	8	13	1,60	4,6	1,90
	9	8	1,70	4,3	1,70
	10	4	3,00	3,5	1,92
R ₇	Recém-colhidas	84	1,80	6,9	1,46
	1	64	1,50	10,9	1,70
	2	51	1,30	14,9	1,90
	3	41	1,10	13,2	1,90
	4	33	1,50	11,5	1,70
	5	26	1,90	8,9	1,70
	6	21	1,60	7,2	1,20
	7	16	1,30	6,2	1,10
	8	11	1,20	4,2	2,00
	9	5	1,50	3,8	1,70
	10	3	3,00	3,3	1,75

Valores representam a média de análises realizadas em triplicata

Com relação à razão da clorofila a/b a da feofitina a/b, observamos uma tendência de redução desses valores em função do avanço de maturação e do tempo de secagem, o que vem a comprovar que tanto a clorofila a como a feofitina a são degradadas mais rapidamente do que as clorofila b e feofitina b.

Nas Figuras 32 e 33 pode-se observar as alterações nos teores de clorofila durante os 10 dias de secagem lenta à temperatura ambiente.

Figura 32 – Teores de clorofila a durante a secagem à temperatura ambiente (25°C)

Figura 33 – Teores de clorofila b durante a secagem à temperatura ambiente (25°C)

Comparando-se a perda de clorofila ocorrida no campo (Figura 30) com a ocorrida durante a secagem lenta a 25°C (Figuras 32 e 33), o mecanismo de degradação das clorofilas a e b, independente do estágio de maturação, parece ser o mesmo, pois a taxa de desaparecimento das clorofilas é similar. Nos primeiros cinco dias de secagem a degradação quase que se completa, permanecendo apenas teores residuais no final da secagem. Neste período, a taxa de degradação foi bastante alta e houve aproximadamente 70% de redução nos teores de clorofila a e b. A degradação da clorofila durante a secagem a 25°C mimetiza de certa forma o processo de amadurecimento da semente na planta.

A soja colhida em R₇, apresentou um teor de umidade de 31,5%, inadequado para a estocagem, além de apresentar um alto teor de clorofila total (84 ppm), índice também inadequado para a produção de óleo. Portanto, nessas condições é necessário um tratamento de secagem que permita atingir níveis de umidade e teores de clorofila adequados. Foi comprovado (Tabela 9 e Figuras 32 e 33) que se essa amostra colhida em R₇ for submetida a secagem lenta a 25°C por 10 dias, ela atingirá um teor de umidade da ordem de 8% e um teor de clorofila por volta de 4 ppm, atendendo aos requisitos de qualidade, tanto do ponto de vista microbiológico, como do conteúdo de clorofila.

Nas Figuras 34 e 35 são apresentadas as alterações nos teores de feofitina durante os 10 dias de secagem lenta à temperatura ambiente (25°C).

Figura 34 – Teores de feofitina a durante a secagem à temperatura ambiente (25°C)

Figura 35 – Teores de feofitina b durante secagem à temperatura ambiente (25°C)

O perfil de variação das feofitinas a e b durante a secagem à temperatura ambiente (25°C) foi diferente daquele observado durante a maturação no campo. Na soja colhida entre os estádios R₆ e R₆-R₇(II), durante os quatro primeiros dias de

secagem, ocorreu um pequeno aumento nos teores de feofitina, da ordem de 2 a 3 vezes maior ao da sua concentração inicial. Esta tendência não foi tão evidente nos estádios seguintes (R_6 - R_7 (III) e R_7), apresentando um suave declínio até o décimo dia de secagem. Vale observar que, nos estádios mais avançados de maturação, os teores de clorofila também eram bem menores. Nos dias restantes da secagem, observou-se uma degradação da feofitina total até atingir níveis residuais de 7,6 ppm, para sementes colhidas no estágio R_6 , e de 3,3 ppm, referente ao estágio R_7 .

A síntese de feofitina observada nas colheitas prematuras, de R_6 até R_6 - R_7 (II), não prosseguiu ao longo de toda a secagem, provavelmente, devido à falta de substrato (clorofila), pois, exatamente nos primeiros cinco dias de secagem, a clorofila decresceu rapidamente. Outra observação é que os teores de feofitina, na realidade, correspondem à síntese, subtraída da degradação. Se a feofitina fosse uma substância estável, não haveria degradação e observar-se-ia apenas uma curva ascendente. Porém, os resultados mostraram que a feofitina é instável, portanto a sua síntese observada é aparente.

Comparando-se o comportamento da feofitina nas amostras secas no campo com as secas à temperatura ambiente, observa-se que a secagem a temperatura ambiente (25°C) acelera a remoção de umidade de uma forma mais pronunciada do que a que acontece no campo. De alguma forma isto deve favorecer a degradação da clorofila por feofitinização. Enquanto no campo a relação entre clorofila e feofitina foi sempre inferior a 10%, na secagem à temperatura ambiente (25°C) observou-se até 28% de feofitina em relação à clorofila, ilustrando a tendência à feofitinização, ou então, uma menor velocidade de transformação da feofitina para outros produtos de degradação.

5.6 – Alterações nos pigmentos após as secagens a 25° e 40°C

No experimento II, as sementes colhidas nos diversos estádios de maturação foram submetidas à secagem lenta a temperatura ambiente (25°C) durante 10 dias e à secagem rápida em estufa a 40°C por 5 dias e os pigmentos foram analisados após os tratamentos de secagem.

No ano 1999 foram estudadas as variedades IAS-5 e IAC-17 e, em 2001, as variedades IAC-17 e IAC-22. Nas duas safras o comportamento dos pigmentos frente às secagens e aos estádios de maturação foi similar. Nas Figuras 36 e 37 podem ser observados os teores de clorofila e feofitina quando as sementes (IAS-5 e IAC-17) foram secas à temperatura de 25°C e em estufa a 40°C, no ano de 1999.

Figura 36 – Degradação da clorofila em sementes de soja IAS-5, colhidas em diferentes estádios de maturação no ano 1999 e submetidas a duas condições de secagem

Figura 37 – Degradação da clorofila em sementes de soja IAC-17, colhidas em diferentes estádios de maturação no ano 1999 e submetidas a duas condições de secagem

Na secagem a temperatura ambiente (25°C) houve degradação quase que completa da clorofila e feofitina, mesmo colhendo as sementes de soja a partir do estágio R₆-R₇(I). Portanto, a secagem lenta reduziu o conteúdo de umidade e os teores de clorofila abaixo de 13% e 22 ppm, respectivamente, atendendo às especificações da "Canadian Grain Commission" para comercialização de sementes de canola.

Ao contrário, quando as sementes foram submetidas à secagem em estufa a 40°C, observou-se elevados teores de clorofila e um acúmulo de feofitina, embora ambas tenham decrescido em função do avanço da maturação. Os grãos colhidos nos estádios antecedentes à maturação fisiológica e secos a 40°C mantiveram teores de clorofila muito elevados, totalmente inadequados para a comercialização dos grãos. Uma outra grande diferença entre a secagem lenta e a secagem acelerada a 40°C consistiu no aparecimento de uma elevada quantidade de feofitina (Figura 36 e 37). Enquanto que na temperatura ambiente (25°C) a clorofila era degradada sem o acúmulo de feofitina, na secagem rápida houve o aparecimento de feofitina que correspondeu a valores entre 60 e 90% do teores de clorofila.

A feofitina é uma substância com potencial prooxidante em óleos mais alto que o da clorofila, motivo de preocupação de alguns pesquisadores em relação à elevada concentração destes pigmentos em óleos de canola ou de soja (Usuki *et al.*, 1984^{a,b}; Endo *et al.*, 1984). Nesse sentido, Daun & Thorsteinson (1989) propuseram que o teor de clorofila total deveria ser expresso em teor de feofitina, considerando que a maior parte da clorofila se convertia em feofitina. Pelos presentes resultados, parece que essa proposta não é adequada no caso em estudo, já que apenas uma mínima parte da clorofila foi convertida em feofitina. Os reduzidos teores de feofitina encontrados nas sementes de soja, quando amadurecidas no campo, não seriam a maior preocupação em relação ao problema da atividade prooxidante no óleo.

O conjunto destes resultados permite sugerir que houve uma mudança no mecanismo de degradação da clorofila. Enquanto na secagem à temperatura ambiente (25°C) a clorofila degradou sem haver acúmulo significativo de feofitina ou formação de outros intermediários conhecidos, na secagem a 40°C a via de degradação da clorofila foi preferencialmente por feofitinação. Outra diferença observada foi que apenas a 40°C foram encontrados os derivados defetilados (clorofilídeos e feoforbídeos) em quantidades mínimas (Tabela 10). A presença destes derivados defetilados indica que ocorreu degradação da clorofila também pela via enzimática. Uma explicação para o fato de não encontrar esses metabólitos a 25°C ou durante a maturação no campo, pode estar relacionada com a informação da literatura de que a clorofilase atua preferencialmente em temperaturas mais elevadas (40° - 60°C) e que, *in vivo*, sua atividade é latente (Johnson-Flanagan & Thiagarajah, 1990; Johnson-Flanagan & McLachlan, 1990; Johnson-Flanagan & Spencer, 1996; Takamyia *et al.*, 2000).

Tabela 10 – Teores de clorofila e derivados, em sementes de soja IAS-5 e IAC-17, colhidas no ano de 1999, em cinco estádios de maturação e secas a 25° e 40°C

Variedade	Secagem	Estádio de maturação	Teores de pigmentos (ppm) em b. s.							
			Clorofila		Feofitina		Clorofídeo		Feoforbídeo	
			total	a/b	total	a/b	a	b	a	b
IAS-5	T ambiente 25°C	R ₆	47	3,3	6,2	1,7	nd	nd	nd	nd
		R ₆ -R ₇ (I)	32,8	2,3	5,6	1,7	nd	nd	nd	nd
		R ₆ -R ₇ (II)	17	1,8	4,1	1,4	nd	nd	nd	nd
		R ₇	4	3,0	3	2	nd	nd	nd	nd
		R ₈	3	2,0	-	-	nd	nd	nd	nd
	Estufa 40°C	R ₆	299	2,9	245	3,2	traços	traços	traços	traços
		R ₆ -R ₇ (I)	227	2,7	132	1,7	nd	nd	traços	traços
		R ₆ -R ₇ (II)	119	2,1	106	2,4	nd	nd	traços	traços
		R ₇	18	2,6	13	2,2	nd	nd	nd	nd
		R ₈	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd
IAC-17	T ambiente 25°C	R ₆	34,8	4,1	5,6	1,4	nd	nd	nd	nd
		R ₆ -R ₇ (I)	22,1	3,3	5	1,3	nd	nd	nd	nd
		R ₆ -R ₇ (II)	8,4	2,5	3	2	nd	nd	nd	nd
		R ₇	5,3	1,3	4	3	nd	nd	nd	nd
		R ₈	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd
	Estufa 40°C	R ₆	272	3,1	198	3,6	traços	traços	traços	traços
		R ₆ -R ₇ (I)	167	3,1	131	2,7	nd	nd	traços	traços
		R ₆ -R ₇ (II)	113	1,89	87	2,0	nd	nd	traços	traços
		R ₇	32	1,7	25	1,7	nd	nd	nd	nd
		R ₈	11	2,7	7	2,5	nd	nd	nd	nd

nd – não detectado

Na secagem a temperatura ambiente (25°C), a ausência de derivados defitilados e de feofitinas indicou que, nestas condições de secagem, a degradação da clorofila não ocorre nem por via enzimática envolvendo as clorofilases, e nem por via química, levando à feofitinização. De maneira semelhante à maturação no campo, na secagem a 25°C, o mecanismo de degradação parece depender da ação de outras enzimas como as oxigenases, que atuam degradando rapidamente a clorofila e seus derivados, com formação de compostos incolores. As condições na secagem a temperatura ambiente (25°C) reduzem lentamente o teor de umidade, permitindo que a ação dessas enzimas leve à degradação quase que completa dos pigmentos existentes.

Já a 40°C, a atividade da enzima clorofilase é máxima, favorecendo a degradação da clorofila por via enzimática. Nesta temperatura a degradação ocorreu por ambas as vias, química, evidenciada pelo acúmulo de feofitinas, e enzimática, evidenciada pelo acúmulo de clorofilídeos e feoforbídeos. O acúmulo destes pigmentos verdes nesses grãos indica que as enzimas oxigenases não atuaram nesta temperatura.

5.7 – Alterações nos pigmentos após a secagem a 75°C

No experimento II, as sementes colhidas nos diversos estádios de maturação foram também submetidas à secagem rápida em estufa a 75°C, por 2,5 dias, para investigar, de forma comparativa com as outras duas secagens (25° e 40°C), o efeito desta temperatura na degradação da clorofila. Assim como nas outras temperaturas, os pigmentos foram analisados após o tratamento de secagem.

Nas Figuras 38 e 39 apresenta-se comparativamente os teores de clorofila e feofitina das sementes secas nas três condições estudadas no ano de 2001.

IAC-17

Figura 38 – Degradação da clorofila em sementes de soja IAC-17, colhidas em diferentes estádios de maturação no ano 2001 e submetidas a três condições de secagem

De forma semelhante à que ocorreu a 40°C, após a secagem a 75°C, observamos altos teores de clorofila, embora decrescentes em função do estágio de maturação. Apenas nas sementes colhidas no estágio de maturação comercial (R₈) não houve clorofila detectável. Nos demais estádios, os teores de clorofila encontrados foram altos e inadequados para a comercialização dos grãos.

IAC-22

Figura 39 – Degradação da clorofila em sementes de soja IAC-22, colhidas em diferentes estádios de maturação no ano 2001 e submetidas a três condições de secagem

Quanto aos teores de feofitina, foi observado um certo acúmulo, também decrescente com o avanço da maturação, embora esses teores tenham sido menores do que os observados a 40°C.

Nas Tabelas 11 e 12 são apresentados os cálculos da relação de clorofila (a/b) nestes experimentos comparativos dos efeitos de secagem, que nos levaram a uma interpretação semelhante à feita anteriormente. Parece haver uma degradação mais rápida das clorofila a e feofitina a do que a das clorofila b e feofitina b, reduzindo assim os índices a/b com o avanço do desenvolvimento dos grãos e com o aumento da temperatura de secagem.

Tabela 11 – Teores de clorofila e derivados, em sementes de soja IAC-17, colhidas no ano de 2001, em seis estádios de maturação e secas a 25°, 40° e 75°C

Variedade	Secagem	Estádio de maturação	Teores de pigmentos (ppm) em b. s.									
			Clorofila		Feofitina		Clorofilídeo		Feoforbídeo			
			total	a/b	total	a/b	a	b	a	b		
IAC-17	T _{ambiente} 25°C	R ₆	53	2,8		7,6	1,6	nd	nd	nd	nd	
		R ₆ -R ₇ (I)	18	2,0		6,0	1,2	nd	nd	nd	nd	
		R ₆ -R ₇ (II)	8	3,0		3,1	2,0	nd	nd	nd	nd	
		R ₆ -R ₇ (III)	4	3,0		3,5	1,9	nd	nd	nd	nd	
		R ₇	3	2,0		3,3	1,8	nd	nd	nd	nd	
		R ₈	3	2,0		3	2,0	nd	nd	nd	nd	
		Estufa 40°C	R ₆	347	3,2		313,1	2,9	traços	traços	traços	traços
			R ₆ -R ₇ (I)	196	2,4		164,6	1,9	traços	traços	traços	traços
	R ₆ -R ₇ (II)		139	1,9		109,7	4,0	traços	traços	traços	traços	
	R ₆ -R ₇ (III)		102	1,9		82	3,8	nd	nd	nd	nd	
	R ₇		27	2,0		18	2,6	nd	nd	nd	nd	
	R ₈		9	1,3		3,3	1,5	nd	nd	nd	nd	
	Estufa 75°C	R ₆	206	2,1		201	2,1	traços	traços	traços	traços	
		R ₆ -R ₇ (I)	159	1,5		156	1,5	nd	nd	nd	nd	
		R ₆ -R ₇ (II)	120	1,3		124	1,1	nd	nd	nd	nd	
		R ₆ -R ₇ (III)	77	1,6		69	1,6	nd	nd	nd	nd	
		R ₇	37	1,3		40	1,7	nd	nd	nd	nd	
		R ₈	-	-		2	1,0	nd	nd	nd	nd	

nd – não detectado

nd – não detectado

Tabela 12 – Teores de clorofila e derivados, em sementes de soja IAC-22, colhidas no ano de 2001, em seis estádios de maturação e secas a 25°, 40° e 75°C

Variedade	Secagem	Estádio de maturação	Teores de pigmentos (ppm) em b. s.							
			Clorofila		Feofitina		Clorofílideo		Feoforbídeo	
			total	a/b	total	a/b	a	b	a	b
IAC-22	T _{ambiente} 25°C	R ₆	70	2,7	10,5	2,0	nd	nd	nd	nd
		R ₆ -R ₇ (I)	34	2,1	9,1	2,0	nd	nd	nd	nd
		R ₆ -R ₇ (II)	22	2,1	5,4	1,7	nd	nd	nd	nd
		R ₆ -R ₇ (III)	8,5	2,4	2,9	1,9	nd	nd	nd	nd
		R ₇	3	2,0	2	1,0	nd	nd	nd	nd
		R ₈	3	2,0	1,1	2,7	nd	nd	nd	nd
	Estufa 40°C	R ₆	311	2,0	277	2,8	traços	traços	traços	traços
		R ₆ -R ₇ (I)	232	3,0	203	4,3	traços	traços	traços	traços
		R ₆ -R ₇ (II)	104	1,4	79	2,6	traços	traços	traços	traços
		R ₆ -R ₇ (III)	39	2,0	34	2,8	nd	nd	nd	nd
		R ₇	20	2,3	19	2,8	nd	nd	nd	nd
		R ₈	4	-	2	1	nd	nd	nd	nd
	Estufa 75°C	R ₆	227	2,1	57,6	2,9	traços	traços	traços	traços
		R ₆ -R ₇ (I)	163	1,7	40,4	3,3	nd	nd	nd	nd
		R ₆ -R ₇ (II)	129	1,9	19,4	2,0	nd	nd	nd	nd
		R ₆ -R ₇ (III)	96	2,6	10,0	2,6	nd	nd	nd	nd
		R ₇	43	5,1	6,5	2,8	nd	nd	nd	nd
		R ₈	3	-	2,4	1,7	nd	nd	nd	nd

nd – não detectado

Em relação aos derivados defitilados (clorofilídeos e feoforbídeos), estes foram encontrados apenas no estágio R₆, em quantidades mínimas (Tabelas 11 e 12).

A ausência dos derivados defitilados levou à hipótese de que a 75°C, a rápida perda de umidade inativou todas as enzimas, inclusive a clorofilase, que é a mais resistente termicamente. Esta desidratação, possivelmente, também promoveu a desnaturação protéica, levando ao aumento de acidez do meio, o que poderia favorecer a degradação química por feofitinação, evidenciada pelo acúmulo de feofitinas. Por outro lado, os menores teores de clorofila e feofitina encontrados após a secagem a 75°C, do que os encontrados a 40°C, possivelmente se devem a reações de degradação inespecíficas, favorecidas pela alta temperatura.

Quanto à adequação da colheita e das condições de secagem visando à produção de grãos que atendem aos requisitos para a produção de óleo de soja, observamos que, se forem utilizadas temperaturas elevadas de secagem (40° ou 75°C), em estádios precoces de maturação, ocorre retenção de clorofila. Para estas condições de secagem, apenas a colheita realizada no estágio de maturação (R₈) pode resultar em grãos com reduzidos teores de clorofila.

Por outro lado, se for utilizada a secagem lenta, é possível colher a soja mesmo dias antes da maturação fisiológica (R₇), pois estas condições permitem a degradação completa da clorofila.

6 – CONCLUSÕES

A partir do monitoramento das alterações dos pigmentos verdes durante a maturação de sementes de soja secas em diferentes condições, foi possível sugerir as vias de degradação da clorofila.

- ✓ No campo houve decréscimo gradual dos teores de clorofila, em função do avanço da maturação, atingindo níveis reduzidos. Não houve acúmulo de feofitinas e nem de outros derivados coloridos. A partir dos resultados obtidos e com base em dados da literatura, provavelmente o mecanismo ocorre primordialmente por um sistema enzimático, envolvendo as enzimas oxigenases, que atuam degradando o pigmento verde para compostos incolores. O mecanismo parece ser o mesmo, independente do estágio de maturação.
- ✓ Após a colheita, a degradação da clorofila é altamente dependente da temperatura de secagem.
- ✓ Na secagem lenta à temperatura ambiente (25°C), a clorofila também foi totalmente degradada e não houve acúmulo, nem de feofitinas, nem de derivados defitilados. Nestas condições, o mecanismo de degradação parece ser semelhante ao observado durante a maturação no campo.
- ✓ Na secagem rápida em estufa a 40°C, houve acúmulo de clorofilas e feofitinas e o aparecimento de pequenas quantidades de derivados defitilados. O mecanismo de degradação da clorofila parece ocorrer por duas vias: enzimática, mediada por

clorofilases, formando clorofilídeos e feoforbídeos; e química, evidenciada pelo acúmulo de feofitinas.

- ✓ Na secagem rápida em estufa a 75°C, também ocorreu a manutenção da cor verde nos grãos. A rápida perda de umidade provavelmente inativou todas as enzimas, inclusive as clorofilases, que são as mais resistentes termicamente. Nesta temperatura o mecanismo de degradação parece ter ocorrido por via química, evidenciada pelo acúmulo de feofitinas.

- ✓ Quanto à adequação da colheita e das condições de secagem visando à obtenção de grãos que atendem aos requisitos para a produção de óleo de soja, observamos que, se for utilizada secagem lenta, próxima à temperatura ambiente (25°C), é possível colher a soja mesmo dias antes da maturação fisiológica (R₇), pois a clorofila é completamente degradada. Por outro lado, se forem realizadas colheitas em estádios precoces de maturação e forem utilizadas temperaturas elevadas de secagem (40°C ou superiores), ocorre retenção de clorofila.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ÓLEOS VEGETAIS (ABIOVE). Informativo Abiove. Disponível em: <http://www.abiove.com.br/inform.html>. Acesso em: 2 Mar. 2001.
- ABRAHAM, V.; DeMAN, J.D. Hydrogenation of canola oil as affected by chlorophyll. **JAOCS**, Champaign, v.63, n.9, p.1185-1188, 1986.
- ADAMS, C.A.; FJERSTAD, M.C.; RINNE, R.W. Characteristics of soybean seed maturation: necessity for slow dehydration. **Crop Sci.**, Madison, vol.23, march-april, p.265-267, 1983.
- AMIR-SHAPIRA, D.; GOLDSCHMIDT, E.E.; ALTMAN, A. Chlorophyll catabolism in senescing plant tissues: *in vivo* breakdown intermediates suggest different degradative pathways for *Citrus* fruit and parsley leaves. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.84, p.1901-1905, 1987.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC), 1995. **Official methods of analysis of AOAC**. 16ed. v. 1, cap.3, p.26-28.
- BOEKEL, M.A.J.S. Anniversary review: kinetic modelling in food science: a case study on chlorophyll degradation in olives. **J. Sci. Food and Agric.**, Bognor Regis, v.80, p.3-9, 2000.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Abastecimento. **PORTARIA n.162, de 23 de novembro de 1983**. Publicado em 29 Nov 1983.
- BRASIL SECEX. Ministério de Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Secretaria de Comércio Exterior. **Balança comercial do Brasil**, dezembro, 1998-2001.

- BREEMEN, R.B.; CANJURA, F.L.; SCHWARTZ, S.J. Identification of chlorophyll derivatives by mass spectrometry. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.39, p.1452-1456, 1991.
- CANO, M.P.; MONREAL, M.; ANCOS, B.; ALIQUE, R. Effects of oxygen levels on pigment concentrations in cold-stored green beans (*Phaseolus vulgaris* L. Cv. Perona). **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.46, p.4164-4170, 1998.
- CARUSO, R. **Soja - uma caminhada sem fim**. Fundação Cargill: Campinas, 1997, 95p.
- CENKOWSKI, S.; SOKHANSANJ, S.; SOSULSKI, F.W. The effect of drying temperature on green color and chlorophyll content of canola seed. **Can. Inst. Food Sci. Technol. J.**, Ottawa, v.22 ,n.4, p.383-386, 1989a.
- CENKOWSKI, S., SOKHANSANJ, S., SOSULSKI, F.W. Effect of harvest date and swathage on moisture content and chlorophyll content of canola seed. **Can. J. Plant Sci.**, Ottawa, v.69, n.7, p.925-928, 1989b.
- CENKOWSKI, S., JAYAS, D.S. Potencial of in-field and low-temperature drying for reducing chlorophyll contents in canola (*Brassica napus* L). **J. Sci. Food Agric.**, Bognor Regis, v.63, p.377-383, 1993.
- CERQUEIRA, N.P., POPINIGIS, F. Qualidade da semente. In: MIYASAKA, S.; MEDINA, J.C. **A soja no Brasil**. São Paulo: IAC, 1981. 1061p.
- CHAIT, B.T., AGOSTA, W.C., FIELD, F.H. Fission fragment ionization (^{252}Cf) mass spectrometry. Positive and negative spectra and decomposition for seven compounds. **Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.**, Amsterdam, v.39, p.339-366, 1981.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB) **Previsão da safra de verão 99/2000** Disponível em::<http://www.faeq.com.br/previsa.htm> Acesso em: 2 Mar. 2000.

COSTA, J.A., MARQUEZAN, E. **Característica dos estádios de desenvolvimento da soja**. Campinas: Fundação Cargill, 1982. 30p.

DAHLÉN, J.A.H. Chlorophyll content monitoring of swedish rapeseed and its significance in oil quality. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.50, n.8, p.312-327, 1973.

DOUGHERTY, R.C., STRAIN, H.H., SVEC, W.A., UPHAMS, R.A., ANDKATZ, J.J. Structure of chlorophyll c. **J. Am. Chem. Soc.**, Columbus, v.88, p.5037, 1966.

DAUN, J.K., THORSTEINSON, C.T. Determination of chlorophyll pigments in crude and degummed canola oils by HPLC and spectrophotometry. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.66, n.8, p.1124-1128, 1989.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISAS AGROPECUÁRIAS (EMBRAPA). Centro Nacional de Pesquisa de Soja. **Recomendações técnicas para cultura de soja no Paraná, 1990/91**. Londrina: EMBRAPA, 100p. (Boletim técnico, n.27).

ENDO, Y., USUKI, R., KANEDA, T. The photooxidative alteration of chlorophylls in methyl linoleate and prooxidant activity of their decomposition products. **Agric. Biol. Chem.**, Tokyo, v.48, n.4, p.985-989, 1984.

ENDO, Y., THORTEINSON, C.T., DAUN, J.K. Characterization of chlorophyll pigments present in canola seed, meal and oil. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.69, n.6, p.564-568, 1992.

ERICKSON, D.R. **Practical handbook of soybean processing and utilization**. Champaing: AOCS Press, 1986, 324p.

- FEHR, W.R., CAVINESS, C.E., BURMOOD, D.T., PENNINGTON, J.S. Stage of development description for soybeans (*Glycine Max* (L.) Merrill. **Crop Sci.**, Madison, v.11, p.929-931, 1971.
- FEHR, W.R.; CAVINESS, C.E. **Stages of soybean development**. Ames, Iowa State University of Science and Technology, 1977. 11p.
- GOLBITZ, P. Soyfoods: state of the industry and market. In: SOYFOODS 2000, Orlando, 2000. Abstract. Florida: Feb. 16-18.
- GOMES, M.S.O. Influência das condições de maturação e de secagem de sementes de soja na retenção da clorofila e estudo de uma metodologia rápida para estimativa do teor de clorofila através de análise de cor. São Paulo, 1998. 101p. (Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).
- GROSS, J. **Pigments in vegetables chlorophylls and carotenoids**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1991. 351p.
- HEATON, J.W., YADA, R.Y., MARANGONI, A.G. Discoloration of coleslaw is caused by chlorophyll degradation. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.44, n.2, p.395-402, 1996.
- HEATON, J.W., MARANGONI, A.G. Chlorophyll degradation in processed foods and senescent plant tissues. **Trends Food Sci. Technol.**, Amsterdam, v.7, n.1, p.8-15, 1996.
- HOLT, A.S. Further evidence of the relation between 2-desvinyl-2-formyl-chlorophyll-d. **Can. J. Bot.**, Ottawa, 1961, v.39, p.237.
- JACKSON, A.H. Structure, properties and distribution of chlorophylls. In: GOODWIN, T.W., ed. **Chemistry and biochemistry of plant pigments**. 2.ed. London: New York: Academic Press, 1976. v.2, 522p.

- JOHNSON-FLANAGAN, A.M., THIAGARAJAH, M.R. Degreening in canola (*Brassica napus*, c.v. Westar) embryos under optimum conditions. **J. Plant Physiol.**, Jena, v.136, p.180-186, 1990.
- JOHNSON-FLANAGAN, A.M.; McLACHLAN, G. The role of chlorophyllase in degreening canola (*Brassica napus*) seeds and its activation by sublethal freezing. **Physiol. Plant.**, Copenhagen, v.80, p.460-466, 1990.
- JOHNSON-FLANAGAN, A.M., SPENCER, M.S. Chlorophyllase and peroxidase activity during degreening of maturing canola (*Brassica napus*) and mustard (*Brassica juncea*) seed. **Physiol. Plant.**, Copenhagen, v.97, p.353-359, 1996.
- JOINT FAO/WHO EXPERT CONSULTATION PROTEIN QUALITY EVALUATION, Bethesda, 1989. Protein quality evaluation. Rome: FAO, 1990. (FAO food and nutrition papers, 51).
- KHACHIK, F., BEECHER, G.R., WHITTAKER, N.F. Separation, identification and quantification of major carotenoid and chlorophyll constituents in extracts of several green vegetables liquid chromatography. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.34, p.603-616, 1986.
- KOZUKUE, N., TSUCHIDA, H., FRIEDMAN, M. Tracer studies on the incorporation of [2-¹⁴C]-DL-mevalonate into chlorophylls a and b, α -solanine of potato sprouts. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.49, p.92-97, 2001.
- LEVADOUX, W.L., KALMOKOFF, M.L., PICKARD, M.D., GROOFWASSINK, J.W.D. Pigment removal from canola oil using chlorophyllase. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.64, n.1, p.139-144, 1987.
- LIU, K. Immature soybeans: direct use for food. **INFORM**, Champaign, v.7, n.11, p.1217-1223, 1996.

- LIU, K. **Soybeans: chemistry, technology and utilisation**. New York: Chapman & Hall, 1997, p.6-19.
- LIU, K. Expanding soybean food utilization. **Food Technol.**, Chicago, v.54, n.7, p. 46-58, 2000.
- LÓPEZ-AYERRA, B., MURCIA, M.A., GARCIA-CARMONA, F. Lipid peroxidation and chlorophyll levels in spinach during refrigerated storage and after industrial processing. **Food Chem.**, Amsterdam, v.61, n.1/2, p.113-118, 1998.
- MACCHIONE, E.L.A. Espectrômetro de massa por tempo de voo para análise de macromoléculas. São Paulo, 1998. 126p. (Tese de Doutorado - Instituto de Física - USP).
- MacFARLANE, R.D., TORGERSON, D.F. Californium – 252 plasma desorption mass spectrometry. **Science**, Washington, v.191, p.920-925, 1974.
- MACHADO, E.C. Disponibilidade de água como fator de crescimento da planta. In: MIYASAKA, S., MEDINA, J.C. **A soja no Brasil**. São Paulo: IAC, 1981. 1062p.
- MANGOS, T.J., BERGER, R.G. Determination of major chlorophyll degradation products. **Z. Lebensm. -Unters. -Forsch. A.**, Berlin, v.204, p.345-350, 1997.
- MARCOS FILHO, J. **Produção de sementes de soja**. Campinas, Fundação Cargill, 1986. 86p.
- MESSINA, M. Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.70, p.439S-450S, 1999.
- MÍNGUEZ-MOSQUERA, M.I., GARRIDO-FERNANDEZ, J., GANDUL-ROJAS, B. Pigment changes in olives during fermentation and brine storage. **J. Agric. Food Chem.**, v.37, p.8-11, 1989.

- MÍNGUEZ-MOSQUERA, M.I., GANDUL-ROJAS, B., GARRIDO-FERNANDEZ, J., GALLARDO-GUERRERO, L. Pigments present in virgin oil. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.67, n.3, p.192-196, 1990.
- MÍNGUEZ-MOSQUERA, M.I., GANDUL-ROJAS, B., MÍNGUEZ-MOSQUERA, J. Mechanism and kinetics of the degradation of chlorophylls during the processing of green table olives. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.42, p.1089-1095, 1994.
- MÍNGUEZ-MOSQUERA, M.I., GALLARDO-GUERRERO, L. Disappearance of chlorophylls and carotenoids during the ripening of the olive. **J. Sci. Food Agric.**, Bognor Regis, v.69, p.1-6, 1995.
- MIYASAKA, S.; MEDINA, J.C. **A soja no Brasil**. São Paulo: IAC, 1981. cap.3, p.145-157.
- MONMA, M.; TERAOKA, J.; ITO, M.; SAITO, M.; CHIKUNI, K. Carotenoid components in soybean seeds varying with seed color and maturation stage. **Biosci. Biotech. Biochem.**, v.58, n.5, p.926-930, 1994.
- MONREAL, M., ANCOS, B., CANO, M.P. Influence of critical storage temperatures on degradative pathways of pigments in green beans (*Phaseolus vulgaris* cvs. Perona and Boby). **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, n.47, p.19-24, 1999.
- MOUNTS, T.L., SNYDER, J.M., HINSCH, R.T., BONGERS, A.J., CLASS, A.R. Quality of soybeans in export. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.67, n.11, p.743-746, 1990.
- NWUFO, M.I. Effects of water stress on the post harvest quality of two leafy vegetables, *Telfairia occidentalis* and *Pterocarpus soyauxii* during storage. **J. Sci. Food Agric.**, Bognor Regis, v.64, p.265-269, 1994.
- PORRA, R., THOMPSON, W.A., KRIEDEMANN, P.E. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b

extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.975, p.384-94, 1989.

PRITCHARD, J.R. Oilseed quality requirements for processing. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.60, n.2, p.174-184, 1983.

PSZCZOLA, D.E. Putting soy and other nutraceuticals under the microscope. **Food Tech.**, Chicago, v.53, n.9, p.112-116, 1999.

RÜDIGER, W., SCHOCH, S. Chlorophylls. In: GOODWIN, T.W. **Plant pigments**. New York: Academic Press, 1988. cap.1, p.1-53.

SCHWARTZ, S.J., WOO, S.L., VON ELBE, H.J. High performance liquid chromatography of chlorophylls and their derivatives in fresh and processed spinach. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.29, p.533-535, 1981.

SCHWARTZ, S.J., LORENZO, T.V. Chlorophylls in foods. **Food Sci. Nutr.**, v.29, n.1, p.1-17, 1990.

SNYDER, L.R.; KIRKLAND, L.L. **Introduction to modern liquid chromatography**. 2ed. New York: Wiley, 1979. 863p.

SUZUKI, Y., TANABE, K., SHIOI, Y. Determination of chemical oxidation products of chlorophyll and porphyrin by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v.839, p.85-91, 1999.

TAKAMYIA, K., TSUCHIYA, T., OHTA, H. Degradation pathway(s) of chlorophyll: what has gene cloning revealed? **Trends Plant Sci.**, v.5, n.10, p.426-431, 2000.

TAUTORUS, C.L., LOW, N.H. Chemical aspects of chlorophyll breakdown products and their relevance to canola oil stability. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.70, n.9, p.843-847, 1993.

- TECKRONI, D.M., EGLI, D.B., WHITE, G.M. Seed production and technology. In: WILCOX, J.R. **Soybeans: improvement, production and uses**. 2.ed. Madison: ASA, 1987. cap.8, p.295-353.
- TENG, S.S., CHEN, B.H. Formation of pyrochlorophylls and their derivatives in spinach leaves during heating. **Food Chem.**, Amsterdam, n.65, p.367-373, 1999.
- UNITED STATES. Food and Drug Administration (FDA). **Food labeling: health claims; soy protein and coronary heart disease**. Food and Drug Administration, 21 CFR Part 101, Oct. 26, 1999.
- USUKI, R., SUZUKI, T., ENDO, Y., KANEDA, T.K. Residual amounts of chlorophylls and pheophytins in refined edible oils. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.61, n.4, p.785-788, 1984a.
- USUKI, R., ENDO, Y., KANEDA, T. Prooxidant activities of chlorophylls and pheophytins on the photooxidation of edible oils. **J. Agric. Biol. Chem.**, v.48, n.4, p.991-994, 1984b.
- WARD, K., SCARTH, R., DAUN, J., McVETTY, P.B.E. Effects of genotype and environment on seed chlorophyll degradation during ripening in four cultivars of oilseed rape (*Brassica napus*). **Can. J. Plant Sci.**, Ottawa, v.72, n.7, p.643-649, 1992.
- WARD, K., SCARTH, R., DAUN, J., VESSEY, J.K. Chlorophyll degradation in summer rape and summer turnip rape during seed ripening. **Can. J. Plant Sci.**, Ottawa, v.75, p.413-420, 1995.
- WEEMAES, C.A., OOMS, V., VAN LOEY, A.M., HENDRICKX, M.E. Kinetics of chlorophyll degradation and color loss in heated broccoli juice. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, n.47, p.2404-2409, 1999.

YAMAUCHI, N., WATADA, A.E. Pigment changes in parsley leaves during storage in controlled of ethylene containing atmosphere. **J. Food Sci.**, Chicago, v.58, n.3, p.616-618, 1993.

ZISSIS, K.D., DUNKERLEY, S., BRERETON, G. Chemometric techniques exploring complex chromatograms: application of diode array detection high performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry to chlorophyll a allomers. **Analyst**, Letchworth, v.124, p.971-979, 1999.