

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO SUL DE
MINAS GERAIS - IFSULDEMINAS**

Dayla Badann Bueno

**EFEITO DA GERMINAÇÃO DE GRÃOS DE SOJA NO POTENCIAL DE
QUALIDADE DO EXTRATO AQUOSO**

Machado/MG

2017

Dayla Badann Bueno

**EFEITO DA GERMINAÇÃO DE GRÃOS DE SOJA NO POTENCIAL DE
QUALIDADE DO EXTRATO AQUOSO**

Dissertação apresentada ao IFSULDEMINAS,
como parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, para a obtenção do
título de Mestre.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª Olga Luisa Tavano
Co-orientador: Prof. Dr. Sinézio Inácio da
Silva Junior

**Machado/MG
2017**

B941e Bueno, Dayla Badann.
Efeito da germinação de grãos de soja no potencial de qualidade do extrato aquoso / Dayla Badann Bueno. -- Machado : [s.n.], 2017.
65 p. : il.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Olga Luisa Tavano

Dissertação (Mestrado) – Instituto Federal de Educação, Ciência e tecnologia do Sul de Minas Gerais – Campus Machado
Inclui bibliografia

1. Soja. 2. Sementes. 3. Germinação I. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais - Campus Machado. II. Título.

CDD: 633.34

Dayla Badann Bueno

**EFEITO DA GERMINAÇÃO DE GRÃOS DE SOJA NO POTENCIAL DE
QUALIDADE DO EXTRATO AQUOSO**

Dissertação apresentada ao IFSULDEMINAS,
como parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, para a obtenção do
título de Mestre

APROVADA em 10 de Agosto de 2017

Prof^a. Dr^a. Gislene Regina Fernandes
UNIFAL/Mg

Prof^a. Dr^a. Hudsara A. de Almeida Paula
UNIFAL/Mg

Prof^a. Dr^a. Olga Luisa Tavano

UNIFAL/Mg

“Não recebi nada do que PEDI,
mas RECEBI tudo o que precisava” Ao PAI TODO
PODEROSO.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço todas as dificuldades pelas quais passei na vida.

Elas foram grandes adversárias, mas que tornaram minhas vitórias muito mais saborosas.

Obrigado, Senhor meu Deus, por não me abandonar e fazer parte da minha vida! Obrigado, ainda mais, por cuidar de todas as pessoas que cruzaram, cruzam e ainda cruzarão o meu caminho e por lhes mostrar que nas tribulações elas estarão sempre em Seu colo!

Nesta fase em especial, agradeço ao Senhor por cuidar das pessoas que me ensinaram, ajudaram e apoiaram, para que eu pudesse vencer mais esta etapa.

Muito obrigada aos colegas de trabalho, Aline B. S. Chiarotto; João A. Neto; Taila M. Cardoso; aos orientadores Olga L. Tavano e Sinézio I. da Silva Junior; a todos os professores que auxiliaram na construção do conhecimento, seja como instrutor, avaliador ou capacitador. Agradeço também a Irma A. Badann, Aleksandra Badann P. Oliveira, João Badann, Claiton M. Vital e Ivete Oliveira Lima por não me abandonarem, mesmo nos piores momentos.

Agradeço também aos profissionais que gerenciam o IFSULDEMINAS, a UNIFAL e a FAPEMIG, pelo apoio financeiro, estrutural e intelectual.

Enfim, agradeço ao Senhor por cuidar de todos que, direta ou indiretamente, passaram pelo meu caminho e me ensinaram a ser uma pessoa melhor, em todos os sentidos.

Ah, Senhor!Agradeço também por olhar por aqueles que porventura eu tenha esquecido de citar nessas pequenas linhas.

Provações te buscaram. Dificuldades te agitam. Tudo parece noite ao redor de teus passos. Não te detenhas, no entanto, a fim de medir as sombras. Prossegue trabalhando e não te afastes da paciência. Por nada te desesperes. Dá tempo a Deus para que Deus te acenda nova luz.

Francisco Cândido Xavier

RESUMO

A soja apresenta componentes de elevada qualidade nutricional, considerada um alimento funcional devido à presença de compostos bioativos com potencial benéfico à saúde. É utilizada no desenvolvimento de novos produtos, principalmente a partir do extrato aquoso, porém possui compostos considerados antinutricionais, como os inibidores de proteases que dificultam sua utilização. O processo de germinação pode alterar o perfil de componentes dos grãos de soja, assim objetivou-se verificar o efeito da germinação nos grãos de soja por um período total de 200h e seus reflexos no extrato aquoso. Os grãos de soja foram germinados em ciclos claro/escuro de 12/12h, e a cada período de 24h amostras foram coletadas e extratos aquosos foram elaborados para análise dos compostos. As amostras foram avaliadas nos seguintes aspectos: teor de proteínas, inibição da atividade de tripsina, digestibilidade proteica *in vitro*, teor de compostos fenólicos, flavonóides e potencial antioxidante. Os teores de proteínas apresentaram aumento com o processo de germinação. Considerando-se todo o material proteico solúvel das amostras, a digestibilidade proteica *in vitro* apresentou redução nos valores para os tempos iniciais da germinação, mas a partir do tempo 104h a digestibilidade é apontada como superior ao tempo 0h. Para a atividade de inibição de tripsina, embora não se tenha conseguido resultados de uma redução crescente e significativa, todos os tempos apresentaram redução na atividade de inibição de tripsina. Os teores de compostos fenólicos totais e flavonóides totais tiveram seus teores aumentados durante o período de germinação. O potencial antioxidante também apresentou melhora durante o período de germinação. O rendimento nas extrações dos compostos analisados demonstrou eficiência, com altos teores obtidos na primeira extração. O processo de germinação mostrou-se capaz de promover alterações na composição química dos grãos e esses reflexos foram observados nos extratos aquosos. Os resultados apresentam base para estudos futuros, objetivando o melhoramento e inovação de produtos alimentares obtidos a partir de extrato aquoso de soja germinada.

Palavras Chaves: Soja, Germinação, Extrato Aquoso, Antioxidantes, Proteínas.

ABSTRACT

The soybean has components with high nutritional quality and it is considered a functional food, by the presence of bioactive compounds with potential benefits to the health. It is used in the development of new products, mainly from the aqueous extract, however it has anti-nutritional compounds, such as inhibitors of proteases that hamper its use. The germination process can alter the profile of components of the soybean grains, in this way, this study aimed to verify the effect of germination in the soybean grains for a total period of 200-hours and their consequences on the aqueous extract. The soybean grains were germinated in light / dark cycles of 12 / 12-hours. In periods of 24-hours, samples were collected and aqueous extracts were elaborated for analysis of the compounds. The samples were evaluated in the following aspects: Protein content, inhibition of trypsin activity, *in vitro* protein digestibility, phenolic compounds content, flavonoids and antioxidant potential. The protein contents increased with the germination process. Considering all the soluble protein material of the samples, the protein digestibility *in vitro* presented reduction in the values for the initial times of the germination, but from the time 104h the digestibility was superior than the time 0-hour. Related to the trypsin inhibition activity, the results did not show increasing and significant reduction, all the periods showed a reduction in trypsin inhibition activity. The contents of total phenolic compounds and total flavonoids had their contents increased during the germination period. The antioxidant potential also improved during the germination period. It was possible to infer an increase in the content of the analysed compounds, the yield in the extractions of the analysed compounds demonstrated efficiency, with high contents obtained in the first extraction. The germination process was able to promote changes in the chemical composition of the grains and these consequences were observed in the aqueous extracts. The results can be a base for future studies, aiming the improvement and innovation of food products obtained from aqueous soybean extract germinated.

Keywords: Soybean, Germination, Aqueous Extract, Antioxidant, Proteins.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Grãos de Soja (var. BRS 257) nos diferentes tempos de germinação (0, 8, 104 e 200 horas).	31
Figura 2 Extratos Aquosos obtidos a partir dos grãos germinados de soja (var. BRS 257) após 0, 8, 32, 56, 80, 104 e 200 horas de germinação.	31
Figura 3 Percentual de extração de proteínas nos extratos aquosos dos grãos de soja (var. BRS 257) em diferentes tempos de germinação.	33
Figura 4 Rendimento das extrações para fenólicos totais nos extratos aquosos dos grãos de soja (var BRS 257) em diferentes tempos de germinação.	41
Figura 5 Rendimento das extrações de fenólicos totais para o extrato etanólico a partir de grãos de soja (var. BRS 257) em diferentes tempos de germinação.	41
Figura 6 Rendimento das extrações de flavonóides totais para o extrato aquoso a partir de grãos de soja (var. BRS 257) em diferentes tempos de germinação.....	44
Figura 7 Rendimento das extrações de flavonóides totais para o extrato etanólico a partir de grãos de soja (var. BRS 257) em diferentes tempos de germinação.....	44
Figura 8 Atividade antioxidante de grãos de soja (var BRS 257) em diferentes tempos de germinação, com uso de reagente ABTS ⁺	48
Figura 9 Rendimento das extrações para determinação do potencial antioxidante, para o extrato etanólico, pelo método ABTS ⁺	49
Figura 10 Rendimento das extrações para determinação do potencial antioxidante, para o extrato etanólico, pelo método DPPH.	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Teor de Umidade e Sólidos Totais dos grãos de soja (var. BRS 257) em diferentes tempos de germinação.	30
Tabela 2 Teores proteicos dos extratos aquosos obtidos a partir dos grãos de soja (var. BRS 257) germinados nos diferentes tempos de germinação.	33
Tabela 3 Porcentagem de α -Amino Grupos (%), dos extratos aquosos obtidos a partir dos grãos de soja (var. BRS 257), germinados nos diferentes tempos.	35
Tabela 4 Inibidores de Tripsina nos diferentes tempos de germinação, para o extrato aquoso obtido a partir dos grãos de soja (var. BRS 257).	37
Tabela 5 Teor de Fenólicos Totais nos extratos aquosos e etanólicos a partir de grãos de soja (var BRS 257) em diferentes tempos de germinação.	39
Tabela 6 Teor de Flavonoides Totais nos extratos aquosos e etanólicos a partir de grãos de soja (var. BRS 257) em diferentes tempos de germinação.	42
Tabela 7 Atividade antioxidante de grãos de soja (var BRS 257) em diferentes tempos de germinação, com uso de reagente ABTS.	47
Tabela 8 Atividade antioxidante de grãos de soja (var BRS 257) em diferentes tempos de germinação, com uso de reagente DPPH.	49
Tabela 9 Índice de atividade antioxidante de fenólicos e flavonoides dos extratos aquosos e etanólicos de grãos de soja (var BRS 257) em diferentes tempos de germinação.	51
Tabela 10 Correlações entre os componentes fenólicos e atividades antioxidantes para os extratos aquosos e etanólicos de soja BRS 257.	52

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	12
2.1 Objetivos Gerais.....	12
2.2 Objetivos Específicos.....	13
3 REFERENCIAL TEÓRICO.	13
3.1 A Soja.....	13
3.2 O Extrato Hidrossolúvel.....	16
3.3 Inibidores de Proteases.....	17
3.4 Digestibilidade Proteica in vitro.....	18
3.5 Compostos Fenólicos	19
3.6 Flavonoides	19
3.7 Antioxidantes	21
3.8 A Germinação	22
4 MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 Material	25
4.2 Métodos.....	25
4.2.1 Germinação dos Grãos de Soja.	25
4.2.2 Determinação de Umidade e Sólidos Totais	26
4.2.3 Obtenção dos extratos Aquosos e Etanólicos.....	26
4.2.4 Determinação de Proteína	26
4.2.5 Determinação da Atividade de Inibição de Tripsina	27
4.2.6 Determinação da Digestibilidade Proteica in vitro.....	27
4.2.7 Determinação de Fenólicos Totais	27
4.2.8 Determinação de Flavonoides Totais	28
4.2.9 Determinação do Potencial Antioxidante, pela Captura do Radical ABTS ⁺ (2,2'-azinobis (3- etilbenzoatiazolina-6-ácido sulfônico)).....	28
4.2.10 Determinação do Potencial Antioxidante pela Redução do Radical Livre-DPPH (1,1- diphenyl-2-picrylhydrazyl).....	29
4.2.11 Análise Estatística	29
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1 Determinação de Umidade e Sólidos Totais.	29
5.2 Determinação de Proteínas, Atividade de Inibição de Tripsina e Digestibilidade Proteica in vitro dos Extratos Aquosos.....	32

5.3 Determinação de Fenólicos Totais.....	39
5.4 Determinação de Flavonoides Totais.....	42
5.5 Determinação do Potencial Antioxidante.....	46
6 CONCLUSÃO.....	53
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

1 INTRODUÇÃO

O consumo de soja e de seus derivados vem se intensificando nos últimos anos, segundo o boletim indicador do agronegócio e da indústria de alimentos emitido periodicamente pelo Departamento do Agronegócio da Federação das Indústrias de São Paulo (Fiesp-Deagro). A respeito da Safra Mundial de Soja, para a safra 2017/2018, o consumo mundial da oleaginosa deve ser recorde (FIESP, 2017).

É considerada alimento funcional em função de suas características físico-químicas que englobam compostos bioativos tais como as isoflavonas, compostos fenólicos, inibidores de proteases, saponina (D'ARCE, 2006) bem como pelo seu potencial antioxidante e anticancerígeno (EMPSON, LABUZA, GRAF, 1991).

O organismo humano está exposto constantemente a ação dos radicais livres responsáveis pela oxidação das moléculas. Presume-se que a ingestão de compostos antioxidantes execute importante papel na preservação desse processo (FRITZ et al., 2003).

Dentre os compostos bioativos conhecidos presentes na soja estão os compostos fenólicos, os flavonóides, as isoflavonas (ora conhecidas como fitoestrogênicos, isto é, estruturas similares ao hormônio estrógeno). O uso potencial de compostos bioativos naturalmente presentes nos alimentos na prevenção de doenças tem atraído tanto a comunidade científica quanto a indústria de alimentos, alavancando o desenvolvimento dos alimentos conhecidos como “funcionais” (BARBOSA et al., 2006).

De acordo com a portaria nº 398 de 1999 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, alimento funcional é

todo aquele alimento ou ingrediente que, além das funções nutricionais básicas, quando consumido na dieta usual, produz efeitos metabólicos e/ou fisiológicos benéficos à saúde, devendo ser seguro para o consumo, sem supervisão médica (BRASIL, p. 3, 1999; DUARTE, p. 10, 2006).

Com o intuito de agregar maior valor nutricional à alimentação humana, diversos produtos derivados de soja têm sido ofertados, como exemplo a proteína de soja e também o extrato hidrossolúvel, rico em proteínas e compostos bioativos com potencial benéfico para a saúde, bem como todo produto de origem vegetal que não possua lactose, apresentando baixo teor de gorduras e carboidratos. O extrato é base para processamento de tofu (“queijo”), “iogurtes”, sorvetes e bebidas naturais e/ou adicionadas de frutas (MUNHOZ et al, 2010; SERRAZANETTI et al, 2013).

Apesar de seu alto valor nutricional, a soja e seus derivados não possuem sabor fortemente apreciado pelos consumidores em função das alterações sensoriais de sabor e aroma característicos da ação da enzima lipoxigenase, além de possuírem alguns fatores antinutricionais que interferem na absorção de outros compostos de interesse nutricional (SATHE, SALUNKE, 1984).

Diante disso, pesquisas e novos processos de beneficiamento têm sido desenvolvidos objetivando melhorar a aceitação sensorial da soja e de seus derivados, bem como a redução dos antinutrientes. Entre os exemplos, encontra-se a seleção genética da cultivar BRS-257, na qual ocorre a retirada da lipoxigenase e também o emprego de processos térmicos diferenciados com a finalidade de diminuir a temperatura ao mínimo possível para preservar os nutrientes e inativar compostos nutricionalmente indesejáveis (BELÉIA et al, 1990; BENASSI, VARÉA, PRUDENCIO, 2012; GU et al, 2017). Ou ainda, promover a germinação do grão, na qual o processo tem demonstrado reduzir os fatores antinutricionais, aumentar a disponibilidade dos compostos bioativos e fibras, melhorar a relação da qualidade das proteínas e também sua digestibilidade (LABOURIAU, 1983).

O processo de germinação promove mudanças bioquímicas no grão de soja, no qual as sementes saem do estágio de latência quando são ofertadas condições para o seu crescimento e desenvolvimento, como água, temperatura e nutrientes (SANGRONIS, MACHADO, 2007). Essas mudanças proporcionam a elevação do valor nutritivo em virtude da melhoria da digestibilidade proteica (RIBEIRO, 2006) e degradação ou formação de novos compostos, em formas de melhor utilização tanto para a planta quando para o consumo humano, além desse processo promover um aumento do potencial antioxidante (VERNAZA et al, 2012).

Diante das expectativas positivas apontadas em diversas pesquisas com respeito a resultados de melhorias em função do processo de germinação de grãos de soja, alterações em sua composição e reflexos na qualidade do extrato aquoso, esse estudo objetivou verificar e quantificar alguns parâmetros de interesse científico na área a título de contribuição.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Este estudo tem como seu objetivo geral verificar a relação entre o desenvolvimento do processo de germinação de grãos de soja e as alterações em sua composição e reflexos

destas modificações na qualidade de um produto elaborado a partir destes grãos, o extrato aquoso de soja.

2.2 Objetivos Específicos

- Elaborar extratos aquosos de soja a partir de grãos germinados em diferentes tempos: 0h, 8h, 32h, 56h, 80h, 104h e 200h;
- Verificar as modificações nas composições químicas dos extratos aquosos ao longo do processo de germinação, através das determinações de proteínas, atividade de inibição de tripsina, digestibilidade proteica, teor de fenólicos totais e flavonoides, e atividade antioxidante;
- Estabelecer as relações entre as modificações no processo de germinação dos grãos como reflexos no extrato aquoso;
- Verificar a possibilidade de melhoria do extrato aquoso através da inclusão de etapa de germinação dos grãos nas melhores condições acima verificadas.

3 REFERENCIAL TEÓRICO.

3.1 A Soja

Entre os produtos agrícolas que alimentam a população mundial, a soja vem apresentando extraordinária expansão e ocupando uma posição de destaque. A plantação, crescimento e colheita de soja apresenta alta produtividade, variabilidade genética e uma fácil adaptação em quase todas as regiões do mundo. No Brasil, o cultivo teve início em 1908, pelos japoneses no estado de São Paulo, e ampliada por todo o país através do crescimento econômico acelerado da época. Em 1970 a agricultura passou por diversas transformações, dentre as quais a mecanização da lavoura, e o Brasil alcançou o *ranking* de 2º maior produtor mundial de soja, mantendo-se nessa posição até os dias atuais na safra de 2017 (FIESP, 2017). Além da variabilidade entre as cultivares, a soja tem como diferencial o alto valor nutricional e funcional, o que permite sua utilização em inúmeros processos industriais (ROSSI, ROSSI, 2010).

Por ser considerada alimento funcional de acordo com Brasil, (2008), ou seja, apresentar benefícios à saúde além de nutrir, o consumo de soja criou considerável expectativa na comunidade dietética e nutricional, isto porque esta leguminosa apresenta alto valor nutricional com sua rica composição que inclui óleo, vitaminas e alguns sais minerais

como cálcio e ferro, contendo mais de 34% de proteína, além de ser fonte de antioxidantes como as isoflavonas (SOUCI, FACHMANN, KRAUT, 1994).

As proteínas da soja representam aproximadamente 40% da composição do grão (BAVIA et al, 2012), constituídas por aminoácidos essenciais, enzimas biologicamente ativas, inibidores de proteases, globulinas, enzimas β -amilase e lipoxigenase, hemaglutinina e glicina. Essas proteínas têm propriedades funcionais tecnológicas como capacidade de formar géis e emulsões, solubilidade facilitada no organismo e redução dos níveis de colesterol devido à alta proporção de arginina/lisina, que pode levar à redução da secreção de insulina e glucagon, inibindo a lipogênese (HERMAN, 2005; MANION, CORREDIG, 2006). Podem ser classificadas de acordo com sua função biológica na planta, como as que possuem atividade celular fazendo parte das rotas metabólicas ou de reserva, funcionando como fonte de nitrogênio e carbono para o seu desenvolvimento. Podem ainda ser divididas por sua solubilidade em albuminas que são as frações solúveis em água e as globulinas que são solúveis em soluções fracamente salinas (LIU, 1999).

Representando 20% da composição dos grãos de soja (BAVIA et al, 2012), os lipídeos são constituídos por ácidos graxos saturados (15%) e ácidos graxos insaturados (85%), destacando-se o ácido linoleico e linolênico, considerados essenciais (MORAIS, SILVA, 1996).

Os carboidratos, compondo 30% da composição total do grão (BAVIA et al, 2012), são representados pelas frações solúveis (sacarose, rafinose e estaquiase) e pelas frações insolúveis (celulose, hemicelulose e pectina) – estas correspondem às fibras que integram 5% da composição do grão (BAVIA et al, 2012; LIU, 1999).

Além dos macronutrientes, a soja contém micronutrientes que representam aproximadamente 5% da composição do grão (BAVIA et al, 2012), considerados benéficos à saúde (como os compostos fenólicos), sendo considerados fitoestrógenos por apresentarem estrutura semelhante aos hormônios estrogênicos, podendo atuar de forma semelhante atenuando os sintomas da menopausa. Estudos relatam que o consumo de produtos à base de soja reduziu a concentração sérica de colesterol e triglicerídeos, auxiliando na prevenção de doenças crônico-degenerativas, alguns tipos de cânceres e osteoporose (HELFERICH, 1996; BOWLES, DEMIATE, 2006; PAULETTO, FOGAÇA, 2012).

Embora comprovadamente um alimento que garante bom teor de nutrientes e compostos benéficos, a soja e seus derivados não possuem alta aceitabilidade devido aos seus sabores pouco apreciados sensorialmente, oriundos da ação da enzima lipoxigenase (BORDINGNON, MANDARINO, 1994). Outro fator que torna limitante o consumo desse

grão na alimentação são os compostos que eles possuem para sua própria defesa, como os fenólicos e flavonóides, bem como os fatores antinutricionais, que podem interferir no aproveitamento de suas proteínas e demais nutrientes (LIENER, 1981). Entretanto, não é interessante que esses compostos, como os fenólicos, por exemplo, sejam totalmente retirados devido às suas propriedades benéficas à saúde (MA et al, 2015).

Os inibidores de proteases, um dos fatores antinutricionais presentes na soja, são compostos proteicos que se complexam com a tripsina, quimotripsina e carboxipeptidase (enzimas proteolíticas pancreáticas), impedindo a atuação das mesmas, prejudicando a digestão das proteínas e a absorção dos aminoácidos (XAVIER FILHO, CAMPOS, 1989; SILVA, SILVA, 2000), além de causarem hipertrofia de pâncreas – já que o mesmo funciona ininterruptamente. Esses inibidores atuam sobre todas as enzimas proteolíticas, porém a mais afetada é a tripsina, que podem ser do tipo Bowman-Birk (BBI) e Kunitz (KTI). Os inibidores de Kunitz apresentam 181 aminoácidos específicos para a tripsina, já os de Bowman-Birk apresentam 71 aminoácidos específicos com sítios de ligações independentes para inibir a ação da tripsina e quimotripsina (CARVALHO, 2006; LIENER, 1994).

Para melhorar a qualidade da soja e torná-la aceitável, há necessidade de remover ou inativar esses fatores indesejáveis. A modificação genética dos grãos é uma alternativa viável para essa finalidade, porém envolve longa demanda de tempo sobre a natureza química e bioquímica desses compostos, além das consequências agrônômicas como rendimento, solo, e resistência a pragas. A moagem, hidratação, cozimento, branqueamento, fermentação e germinação seriam outras formas de reduzir esses compostos indesejáveis (BELÉIA, IDA, LETHI, 1990; SATHE, SALUNKHE, 1984; DA SILVA, CARRÃO-PANIZZI, PRUDÊNCIO, 2009; BENASSI, VARÉA, PRUDENCIO, 2012).

A cultivar de soja BRS 257, selecionada geneticamente, apresenta características especiais quanto à reação a doenças, sendo resistente a uma parte considerável de pragas e fungos como o cancro da haste e o mosaico; não apresenta a enzima lipoxigenase, que é responsável pelo sabor desagradável; e apresenta composição centesimal semelhante a outras cultivares, sendo assim a escolha para o desenvolvimento desse estudo (EMBRAPA, 2013).

Observa-se então que a melhoria da qualidade nutricional da soja, pode ser feita de diversas maneiras, conjugadas ou isoladas: a germinação do grão é um processo biológico no qual ocorrem diversas mudanças, proporcionando aumento no valor nutritivo, a melhoria na digestibilidade proteica, a redução de fatores antinutricionais e o aumento da biodisponibilidade de vitaminas e minerais. Com isso, associar grãos selecionados geneticamente, como a cultivar BRS 257, através do processo de germinação, pode

proporcionar uma melhora significativa na qualidade e na aceitação dos produtos elaborados a partir desse grão.

3.2 O Extrato Hidrossolúvel

O extrato hidrossolúvel de soja, ou o popularmente conhecido “leite” de soja, vem ganhando destaque principalmente pela sua qualidade nutricional e no consumo por pessoas que buscam uma alimentação saudável e prática que possuem restrições alimentares. É um produto obtido da emulsão aquosa resultante da hidratação dos grãos limpos de soja, seguido de processamento tecnológico adequado, adicionando ou não ingredientes opcionais, podendo ser submetido à desidratação, parcial ou total (BRASIL, 1978). Segundo o *National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases* (U.S.), cerca de 75% da população mundial é intolerante à lactose e, no entanto, ao considerar apenas a quantidade de proteínas, essa substituição seria perfeita, porém, o teor de cálcio no extrato é deficiente, sendo o leite de vaca a principal fonte desse mineral (LIMA, CARDOSO; 2012).

Visando tornar o extrato de soja cada vez mais atrativo aos consumidores, novas tecnologias têm sido empregadas para melhorar as suas características sensoriais e nutricionais (MARIN, 2014; ULIANA, VENTURINI FILHO, 2010). Segundo a Embrapa (2013), cada 100mL do extrato de soja é composto por aproximadamente 2,5% de carboidratos, 3,4% de proteínas, 2,3% de lipídeos, 40mg de cálcio, 105mg de potássio, 1,2mg de ferro, 40mg de vitamina B1 e 120mg de vitamina B2.

O extrato de soja pode apresentar-se de diversas formas: tradicional, aromatizado, suplementado com vitaminas e minerais como o cálcio (que é deficiente na soja, mas podendo ser adicionado ao produto através dos processos de industrialização). A adição de vitaminas e minerais melhora o seu valor nutricional, e a adição de sabores melhora sua aceitação no paladar dos consumidores (HE, CHEN; 2013), além de ser matéria prima para o processamento de outros produtos como o tofu, sorvetes, produtos fermentados, doces e outros.

Tradicionalmente, seu processamento abrange as etapas de maceração, seguida de drenagem, moagem com adição de água e filtração para separar o líquido do subproduto conhecido como *okara*— a substância obtida pode ser utilizada de várias formas: líquida, desidratada, parcialmente desidratada ou destinada à matéria prima para elaboração de outros produtos (BRANCO et al. 2007).

Inovações mais recentes têm se concentrado em produzir o extrato aquoso funcional, que é considerado o extrato aquoso de soja que contém maior teor de compostos bioativos que podem ajudar a melhorar a saúde ou reduzir risco de doenças. A soja, matéria prima para o extrato aquoso, contém muitos compostos benéficos para a saúde, assim como outros que interferem no aproveitamento desses compostos benéficos, de forma que a modificação dos métodos de processamento dos grãos pode ser uma maneira eficaz de melhorar o teor dos componentes bioativos que promovem a saúde e/ou reduzir compostos indesejáveis, como forma de apoiar o desenvolvimento funcional de produtos derivados da soja (JIANG, CAI, XU, 2013).

O aquecimento, durante o processamento da soja, destrói consideravelmente a maioria dos fatores antinutricionais do extrato aquoso e melhora a digestibilidade das proteínas. Contudo, compostos como o ácido fítico, que interferem na disponibilidade de cálcio, não são reduzidos efetivamente. Ao mesmo tempo, o aquecimento excessivo pode causar danos aos aminoácidos e perda do valor nutricional (JIANG, CAI, XU, 2013).

3.3 Inibidores de Proteases

São chamados inibidores de proteases substâncias de natureza proteica que interferem na ação de enzimas que hidrolisam as ligações peptídicas no trato digestório, resultando em redução da digestão proteica (PAULA, 2006). Encontrados nos alimentos de origem vegetal com maior frequência, sua função é proteger a planta contra predação de insetos. Os que mais se destacam são os inibidores de enzimas proteolíticas (tripsina e quimotripsina) e aminolítica (α -amilase) (RAMÍREZ-CÁRDENAS; LEONEL; COSTA, 2008).

Os inibidores de proteases presentes na soja podem ser diferenciados por seu peso molecular: os inibidores de alto peso molecular apresentam duas pontes dissulfeto, 181 resíduos de aminoácidos e especificidade para a tripsina; já os inibidores de baixo peso molecular apresentam alta proporção de ligações dissulfeto, 71 resíduos de aminoácidos e capacidade para inibir tripsina e quimotripsina em sítios de ligações independentes, Kunitz e Bowman-Birk, respectivamente (SACCO, 2001). Os inibidores de Bowman-Birk são mais estáveis termicamente às variações de pH do que os do tipo Kunitz, tornando sua inativação mais difícil, porém cerca de 80% da inibição de atividade de proteases é causada pela ação do inibidor de tripsina Kunitz (MONTEIRO et al., 2004).

Dentre os efeitos nocivos dos inibidores de proteases no homem, o mais preocupante refere-se as alterações pancreáticas relacionadas diretamente com os inibidores de tripsina, já que esses bloqueiam a ação da tripsina resultando em aumento excessivo da concentração plasmática de colecistoquinina, e desta forma o pâncreas é continuamente estimulado a liberar mais enzima, provocando hipertrofia pancreática (PAULA, 2006).

Tratamentos térmicos são eficientes na redução ou inativação dos inibidores de proteases, porém podem gerar perdas de nutrientes, principalmente de vitaminas e aminoácidos, com isso busca-se alternativas para reduzir esses inibidores e diminuir as perdas de compostos importantes (RAMÍREZ-CÁRDENAS; LEONEL; COSTA, 2008).

3.4 Digestibilidade Proteica *in vitro*

A digestão das proteínas inicia-se pela boca, onde o alimento (por ação mecânica da mastigação) é quebrado, misturado à saliva e deglutido. No estômago o suco gástrico, contendo ácido clorídrico, desnatura as proteínas tornando-as mais susceptíveis à hidrólise por proteases, e a pepsina quebra as ligações peptídicas reduzindo o tamanho da proteína. No intestino delgado, o suco pancreático promove a hidrólise dos peptídeos liberando aminoácidos livres para serem absorvidos pelo organismo. As frações não digeridas passam a funcionar como fibras ou são degradadas por microrganismos presentes no intestino grosso (COUTINHO, MENDES, ROGERO, 2007).

A hidrólise dessas proteínas é expressa em porcentagem, sendo o valor nutricional determinado por sua digestibilidade, isto é, conteúdo de aminoácidos essenciais e a disponibilidade dos mesmos. A digestibilidade proteica é influenciada por fatores como: presença de compostos fenólicos, inibidores de proteína, e tipo de tratamento térmico empregado (CARBONATO et al., 2000).

Buscando entender os mecanismos da digestibilidade proteica, estudos envolvendo a digestibilidade *in vivo* utilizam animais, normalmente ratos ou camundongos, selecionados em grupos com semelhança de peso, gênero, idade e tipo de dieta, com o objetivo de simular o processo digestivo que ocorre nos humanos.

Em contrapartida, estudos envolvendo a digestibilidade *in vitro*, visam simular as condições existentes no trato digestivo humano ao utilizar associações enzimáticas para determinar a taxa de hidrólise (KUBOTA et al., 2010; MARUATONA, DUODU, MINNAAR, 2010).

3.5 Compostos Fenólicos

Os metabólitos secundários produzidos pelas plantas para sua defesa em condições de estresse são chamados de compostos fenólicos. São formados a partir dos aminoácidos fenilalanina e tirosina, e contém em sua estrutura química anéis aromáticos com um ou mais grupos hidroxilas substituintes. São conhecidos como fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas, sendo os responsáveis nos alimentos por contribuir com o amargor, adstringência, cor, sabor e odor (NACZK, SHAHIDI, 2004).

Amplamente conhecidos por seu potencial antioxidante, capazes de reduzir danos oxidativos nas células causados pelos radicais livres em desequilíbrio, os compostos fenólicos atuam na fase terminal da reação em cadeia, doando hidrogênios ou elétrons aos radicais livres, convertendo-os em produtos mais estáveis (MADHAVI, DESHPANDE, SALUNHE, 1995). Além da atividade antioxidante, os compostos fenólicos podem atuar como quelantes metálicos, impedindo sua ação catalisadora e decompondo produtos primários da oxidação (NACZK, SHAHIDI, 2004).

O teor de compostos fenólicos na soja é variável: ao utilizar diferentes solventes Xu e Chang (2007), encontraram na soja preta uma variação de 3,73 a 6,18mg equivalente em ácido gálico (EAG) /g, enquanto a soja amarela apresentou teores entre 2,27 e 2,62mg EAG/g. Xu e Chang (2008) avaliaram a perda desses compostos durante o processamento e verificaram que em ervilhas, grão de bico e lentilha, o cozimento gerava uma perda de 40-68% dos compostos fenólicos. Martinez et al (2011) determinou em seus estudos para a cultivar de soja *M. Soyrr* um teor de 1,689mg/g de compostos fenólicos.

3.6 Flavonoides

Os flavonoides são compostos fenólicos formados a partir dos aminoácidos aromáticos fenilalanina e tirosina e o ânion malonato, classificados pelo nível de oxidação e o grau de substituição do anel central, representados expressivamente pelas flavononas, flavonas, isoflavonas, flavonóis e antocianidinas. Por apresentarem cores atrativas, as antocianidinas sinalizam visualmente para a polinização dos insetos, já os flavonóis conferem adstringência, representando o sistema de defesa das plantas. Os flavonoides agem como catalisadores na fotossíntese ou como reguladores do ferro na fosforilação (PIETTA, 2000). Xu e Chang

(2007), ao utilizarem diversos solventes, encontraram teores de flavonoides na soja preta de 0,72 a 2,57mg de equivalentes de catequina (EC) /g e de 0,25 a 0,50mg EC/g na soja amarela.

Os flavonoides têm como habilidade de destaque sequestrar os radicais livres que, quando gerados em excesso, podem ocasionar danos às biomoléculas, desencadeando várias doenças – uma delas o desenvolvimento de aterosclerose e doenças coronarianas (CLARKSON, ANTHONY, HUGHES, 1995). A ação antioxidante dos flavonoides ocorre pela doação de elétrons das hidroxilas livres presentes no núcleo com a formação de um radical menos reativo, e posteriormente envolve a quebra da mesma ligação da hidroxila (MALASEV, KUNTIC, 2007).

Como sequestrantes, os flavonoides atuam no estado inicial da cadeia, sequestrando as hidroxilas, e na fase terminal da reação em cadeia agem através da doação de átomos de hidrogênio para o radical peróxil. Como quelantes, interagem com os metais impedindo reações com o oxigênio (COOK, SAMMAN, 1996).

As isoflavonas são compostos fenólicos representados principalmente pela classe dos flavonoides, naturalmente encontrados em algumas plantas e conhecidas como “fitoestrogênios”. Suas estruturas são similares ao hormônio estrogênio, ligando-se aos receptores de estrogênio (PASCUAL-TERESA et al., 2006). Algumas isoflavonas (genistina, daidzina e glicitina) são encontradas apenas na soja, sendo consideradas antioxidantes naturais (FERRARI, DEMIATE, 2001). O teor de isoflavonas na soja é influenciado pelas características genéticas, além dos fatores ambientais e estes compostos também se relacionam com a adstringência presente no grão.

O consumo de produtos à base de soja tem aumentado nos últimos anos, sendo uma alternativa para auxiliar na reposição hormonal devido à sua atividade estrogênica e presença de poucos efeitos colaterais (KURZER, 2000). Acredita-se que as isoflavonas tenham uma ação potencial no auxílio à prevenção de algumas doenças crônicas (IZUMI et al., 1997), como câncer relacionado aos problemas hormonais (ADLERCREUTZ et al., 1991), osteoporose (KNIGHT, EDEN, 1996), disfunções cardiovasculares (CLARKSON, ANTHONY, HUGHES, 1995), câncer de cólon (WATANABE, KOESSEL, 1993), câncer de próstata (SEVERSON et al., 1989) e diminuição dos sintomas ligados à menopausa (ANDERSON et al., 1999; KURZER, 2000). Sagara et al. (2010) estudaram o uso de isoflavonas por indivíduos com câncer de próstata, obtendo resultados positivos em termos de prevenção e de tratamento.

Por encontrarem-se predominantemente conjugadas com açúcares, as isoflavonas tem sua absorção prejudicada, devido as formas glicosídicas (daidzina, glicitina e genistina)

possuírem alto peso molecular e serem altamente hidrofílicas. As agliconas (genisteína, gliciteína e daidzeína), que são as formas livres das moléculas de açúcar, são capazes de atravessar a membrana plasmática, com isso as formas glicosídicas precisam ser hidrolisadas para tornarem-se biodisponíveis (PASCUAL-TERESA, 2006). A conversão das demais formas de isoflavonas em agliconas é favorecida pelo processo de fermentação e, portanto, são encontradas em maior concentração nos alimentos fermentados derivados da soja (CARRÃO-PANIZZI et al., 2013; COWARD et al., 1998).

Uma outra forma que vem sendo muito estudada para aumentar o teor de isoflavonas na soja e seus derivados é o processo de germinação, onde os grãos são tratados e germinados em condições controladas e observa-se que o aumento de compostos benéficos e diminuição de antinutrientes é significativo (ZIELINSKI et al., 2000).

3.7 Antioxidantes

São considerados antioxidantes substâncias capazes de retardar, impedir ou eliminar danos oxidativos nas moléculas, controlando os níveis de radicais livres (HALLIWELL, GUTTERRIDGE, 2007).

Os radicais livres são moléculas instáveis, formadas durante a utilização do oxigênio pelo organismo, que podem iniciar uma reação em cadeia produzindo cada vez mais radicais livres. O papel do antioxidante é interagir e estabilizar as espécies reativas, doando elétrons ou transferindo hidrogênios para os radicais livres, sem comprometer a estabilidade de suas moléculas (BARBOSA et al., 2006).

Diversos são os mecanismos de ação dos antioxidantes, tais como a capacidade de impedir a formação de radicais livres através da inibição de reações em cadeia com o ferro e o cobre. São capazes de interceptar os radicais livres gerados pelo metabolismo celular, evitando formação de lesões e perda da integridade celular. Podem ainda bloquear a decomposição dos peróxidos e hidro peróxidos, convertendo-os na forma inativa por ação de agentes redutores (POMPELLA, 1997).

Os compostos fenólicos atuam como antioxidantes interagindo com os radicais livres, sendo consumidos durante a reação, porém a eficácia dessa reação depende da sua estrutura química e da concentração deste composto no alimento, cujo teor é altamente influenciado por: fatores genéticos; condições ambientais; grau de maturação; além do processamento do alimento – já que os compostos podem ser degradados ou lixiviados (MOREIRA, MANCINI-FILHO, 2004; NICOLI, ANESE, PARPINEL, 1999).

Diferentes metodologias são utilizadas para caracterizar a capacidade antioxidante de um alimento, entretanto não existe um método universal pelo qual os antioxidantes possam ser avaliados. Os métodos mais utilizados são os que reduzem ou sequestram os radicais livres DPPH (2,2 difenil-1-picrilhidrazil) e ABTS⁺ (2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)). O teste de redução do radical DPPH, que é um radical orgânico nitrogenado e estável, recebe elétrons do antioxidante presente na amostra evitando sua oxidação. Com isso o DPPH, que se comporta como um radical livre, perde sua estabilidade e fica impedido de causar danos às células. A capacidade antioxidante da amostra é verificada pela % de DPPH presente na amostra ao final da reação (TOMEI, SALVADOR, 2007).

O teste de captura do radical ABTS⁺, que se comporta como radical livre, doa elétrons para o antioxidante presente na amostra, com isso perde sua estabilidade e fica impedido de causar danos às células. A capacidade do antioxidante presente na amostra é analisada pela capacidade que este tem em decrescer a cor e receber elétrons do radical (KUSKOSKI et al., 2005).

O método para a avaliação do potencial antioxidante em amostras vegetais deve levar em consideração os compostos químicos presentes naturalmente, utilizar uma fonte de radical relevante biologicamente, ter um mecanismo químico definido, instrumentação disponível e adaptável para ensaios de antioxidantes lipofílicos e hidrofílicos (PRIOR, WU, SCHAICH, 2005).

3.8 A Germinação

A germinação de grãos é um processo simples, de baixo custo, e que resulta em um produto natural que reduz ou até mesmo inativa fatores ditos antinutricionais (como os inibidores de proteases), além de promover o aumento de proteínas, amido e a digestibilidade dos grãos (ROBLES-RAMÍREZ, RAMÓN, MORA-ESCOBEDO, 2011).

Na natureza, as sementes em germinação sobrevivem por esse processo causando mudanças na distribuição dos metabólitos secundários, mobilização de proteínas de reserva alterando a composição do amido e produzindo peptídeos de peso molecular intermediário, além de aumentar sua resposta defensiva através da biossíntese fenólica, que conseqüentemente aumenta o teor desses compostos durante o processo de germinação (RANDHIR, LIN, SHETTY, 2004).

O processo de germinação de sementes tem sido proposto para reduzir ou inativar os fatores antinutricionais e melhorar a qualidade da soja. Nesse processo observa-se a redução

dos fitatos, inibidores de tripsina, e aumento de compostos benéficos (LABOURIAU, 1983; ZIELINSKI et al., 2000). Pesquisas sugerem que o processo de germinação promove o aumento de compostos fenólicos com alto potencial antioxidante (GUAJARDO-FLORES, SERNA-SALDÍVAR GUTIERREZ-URIBE, 2013; LIU et al, 2011; PASKO et al, 2009; LÓPEZ-AMORÓS, HERNÁNDEZ, ESTRELLA, 2006).

Durante a germinação, polissacarídeos e proteínas armazenados nas sementes são quebrados em moléculas menores, para fornecer energia e sintetizar substratos para as fases iniciais da germinação dos grãos, resultando em um acúmulo de aminoácidos livres, carboidratos solúveis, além de minerais, vitaminas e fitoquímicos com potencial benéfico para a saúde (LAILA, MURTAZA, 2014). As mudanças no perfil dos compostos durante a germinação foram investigadas por análises convencionais direcionadas, mas pouco se conseguiu esclarecer sobre as alterações metabólicas (CHEN, CHANG, 2015). Com isso, análises de triagem metabólica não segmentada de todos os intervalos da germinação têm sido introduzidas utilizando tecnologias de análise de alto rendimento, como ressonância de espectrometria nuclear magnética e espectrometria de massa com análise estatística multivariada. Estudos recentes de análise metabólica em diferentes alimentos (como grama preta, feijão verde e trigo sarraceno, em diferentes condições de germinação), são estudados para que se entenda melhor essas mudanças metabólicas, porém para a soja ainda existem poucos estudos (GU et al, 2017).

A germinação de sementes é uma sequência de eventos fisiológicos que inicia quando a semente absorve água, influenciados por fatores internos como dormência, inibidores e promotores da germinação, e também por fatores externos como clima, solo, temperatura (cada um dos fatores pode atuar por si só ou em interação com os demais). Do ponto de vista fisiobioquímico, a germinação passa pelas etapas de reidratação, aumento da respiração, formação de enzimas, quebra, mobilização e transporte de reservas, assimilação metabólica, crescimento e diferenciação de tecidos (POPINIGIS, 1985, BEWLEY et al, 2001; NONOGAKIA, BASSELB, BEWLEY, 2010).

Na etapa de hidratação, a água penetra nos tecidos embrionários e de reserva, fazendo com que o grão assumo o tamanho que tinha antes do amadurecimento, e também ativa o metabolismo (BEWLEY, BLACK, 1985; LABORIAU, 1983; NONOGAKIA, BASSELB, BEWLEY, 2010).

Na etapa de mobilização ou digestão das reservas, após 2 ou 3 dias do início da germinação, as enzimas que estavam em estado latente quebram as macromoléculas de carboidratos, proteínas e lipídeos em monomoléculas para que o embrião possa absorver,

liberando moléculas de glicose, glicerol e aminoácidos, e estas vão para os ciclos de glicólise e Krebs. Nesta fase também ocorre a “síntese de novo”, onde a reorganização dos aminoácidos produz novas enzimas que aceleram o processo de autodigestão (BEWLEY, BLACK, 1985; FERREIRA, BORGHETTI, 2004; LAILA, MURTAZA, 2014).

Na etapa de assimilação de nutrientes e crescimento, após 4 ou 5 dias após o início da germinação, o amido quebrado é utilizado na respiração para a síntese de novas moléculas e estruturas celulares, bem como os aminoácidos e ácidos graxos. Após 5 a 7 dias do início da germinação a semente já é um broto com todos os nutrientes acumulados para seu crescimento (BEWLEY, BLACK, 1985; LABORIAU, 1983). Cada período de germinação propicia características diferenciadas e distintas na composição do grão, sendo necessário estabelecer uma relação dos benefícios com o tempo do processo.

Conhecendo-se essas etapas pode-se observar que a germinação dos grãos é uma alternativa na melhora da qualidade nutricional dos grãos, já que converte proteínas vegetais de baixa qualidade em proteínas de melhor disponibilidade, provoca alterações nos teores de vitaminas e compostos bioativos e melhora a digestibilidade, bem como promove a redução dos fatores antinutricionais como os inibidores de proteases (LIMA, 2006).

Quando sementes germinadas foram comparadas com sementes não germinadas, Khole et al (2014) relataram que houve melhora na digestão de proteínas *in vitro*, diminuição nos níveis de ácidos graxos saturados totais e triglicerídeos, melhora na qualidade nutricional, redução do teor de ácido fítico e maior biodisponibilidade de ferro.

Em estudos com sementes de quinoa e amaranto, Pasko et al (2009) observaram que as sementes germinadas apresentaram aumento nos teores de antioxidantes, como os compostos fenólicos e flavonoides, nos teores de oligoelementos e vitaminas quando comparadas com as sementes não germinadas, os valores de pico nas análises foram atingidos no sexto dia para a quinoa, e no quarto dia para o amaranto.

Em estudos sobre o processo de germinação em sementes de gergelim, observou-se que o teor de compostos fenólicos aumentava conforme a germinação progredia. Em estudos com feijões pretos, o teor de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante nos feijões germinados foram maiores a partir do terceiro dia de germinação (GUJARDO-FLORES et al 2013).

A germinação de grãos promove o aumentados níveis de compostos fenólicos e flavonoides, bem como sua atividade antioxidante por alterar a composição química do grão, com isso sementes germinadas comestíveis bem como seus derivados podem ser fontes valiosas de compostos benéficos e funcionais (PAJAK; et al, 2014).

4 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado nos laboratórios da Universidade Federal de Alfenas/UNIFAL-MG, especialmente representados pelos laboratórios de “Nutrição Experimental” e “Tecnologia de Alimentos”, vinculados à Faculdade de Nutrição da UNIFAL-MG; pelos laboratórios de “Bromatologia”, “Bioquímica” e Microbiologia dos Alimentos, vinculados à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNIFAL-MG; e o laboratório “Biogen”, vinculado ao Instituto de Ciências da Natureza da UNIFAL-MG.

4.1 Material

Para realização do estudo foi utilizada a soja convencional da variedade BRS-257, livre de lipoxigenase, doada pela empresa Sementes e Alimentos Paraná.

4.2 Métodos

4.2.1 Germinação dos Grãos de Soja.

O procedimento de germinação da soja foi realizado de acordo com o proposto por Dia et al (2012) e Brasil (2009), com modificações. Os grãos foram selecionados retirando-se sujidades, lavados em água corrente filtrada, e posteriormente foram imersos em solução de hipoclorito de sódio 0,07%, por 1 minuto. Após a drenagem e lavagem com água destilada, os grãos foram lavados com mais três alíquotas de água destilada esterilizada (auto clavada por 15min/115°C).

Após a higienização, os grãos foram submetidos ao processo de hidratação por 8h, primeiro passo do processo de germinação segundo Kumari e Chang (2016), sendo mantidos imersos em água destilada e esterilizada em quantidade equivalente ao dobro da altura dos grãos. Após este período de hidratação, os grãos foram drenados e uma alíquota foi coletada para análises posteriores – tempo 1(8h) do processo de germinação. Os grãos restantes foram dispersos em papéis Germitest de 28 x 38cm, umedecidos com água destilada e esterilizada, de forma a conter 25 grãos por folha. O papel foi então dobrado de modo a se formarem rolos que foram acondicionados em bandejas plásticas, cobertas com papel filme plástico de PVC e perfuradas de modo a manter a umidade e também a respiração dos grãos. As bandejas foram

acondicionadas em câmara de germinação a 25°C com controle de claro/escuro em ciclos de 12h/12h, por um período total de 200h (7 dias). Neste período de germinação os grãos foram hidratados por aspersão com água destilada e esterilizada, e a cada período de 24h de germinação amostras foram coletadas para as análises. Parte das amostras coletadas foram imediatamente encaminhadas para análise do teor de umidade, a parte restante sendo pesada e congelada (-18°C) em frascos próprios para posterior preparo de extratos para as demais análises.

4.2.2 Determinação de Umidade e Sólidos Totais

A determinação de umidade das amostras foi realizada por gravimetria, considerando-se o teor de voláteis totais a 105°C, em estufa com circulação de ar forçada, até o peso constante (AOAC, 1995). A concentração de sólidos totais das amostras foi calculada por diferença a partir da determinação gravimétrica de umidade (AOAC, 1995).

4.2.3 Obtenção dos extratos Aquosos e Etanólicos

A partir dos grãos não germinados e germinados, foram preparados os extratos aquosos segundo Ciabotti et al (2016) com modificações, utilizando-se água destilada e esterilizada e extratos etanólicos a partir de solução de etanol 80%, considerando-se a proporção de 1:20 (m/v). Os grãos foram triturados em ultraturrax, modelo ultra 80-Ultra Stirrer, por período total de 60 segundos. Após centrifugação à 7.000rpm por 15 minutos à 5°C, os precipitados foram submetidos a duas reextrações utilizando-se a proporção de 1:10 (m/v) para ambos os extratos. Após filtrações, os extratos brutos foram reunidos e utilizados para as demais análises.

4.2.4 Determinação de Proteína

O teor de proteínas do grão foi determinado pelo método de Kjeldahl (AOAC, 1995), utilizando-se o fator 5,71 para amostras de soja e 6,38 para a caseína, para conversão de nitrogênio em proteína. Para os extratos aquosos e etanólicos a determinação de proteínas foi realizada de acordo com o método proposto por Bradford (1976), utilizando-se curva analítica de soro de albumina como referência considerando-se a faixa de 0 a 25µg de proteína/ml.

4.2.5 Determinação da Atividade de Inibição de Tripsina

A determinação da atividade de inibição de tripsina das amostras foi realizada conforme o proposto por Kakade et al (1974). Utilizou-se BAPNA (Benzoil-DL-arginina-p-nitroanilada) como substrato e tripsina de pâncreas bovino (Type I, 10.000 BAEE unidades/mg de proteína, Sigma). Convencionou-se que 1 Unidade de Inibição de Tripsina (UIT) seria correspondente a cada aumento de 0,01 de absorvâncias a 410nm. Os resultados foram expressos em UIT/mg de proteína.

4.2.6 Determinação da Digestibilidade Proteica *in vitro*

A determinação da digestibilidade proteica *in vitro* das amostras foi realizada conforme o proposto por Akeson, Stahman (1964), utilizando-se processo de hidrólise sequencial por pepsina a 37°C sob agitação constante por 3h, seguida de hidrólise por utilização de pancreatina a 37°C, sob agitação por 24h para reação. A reação foi interrompida por adição de solução de TCA (ácido tricloroacético) 60% até concentração final de 12%. Os hidrolisados foram centrifugados a 7.000rpm/15min/5°C. Após a centrifugação, os sobrenadantes foram utilizados para determinação do grau de hidrólise, segundo método de Church et al (1983), utilizando-se reagente OPA (*o*-ftaldialdeído) para determinação dos α -amino grupos liberados na reação. Para tanto, 1000 μ l de solução de reagente OPA preparado diariamente, foi adicionado a um máximo de 130 μ l de amostra. Após exatos 2 minutos de reação procedeu-se a leitura em espectrofotômetro a 340nm. Uma curva analítica de L-Leucina foi utilizada como referência considerando-se a faixa de 0 a 120nMols de leucina e os resultados foram expressos em % de hidrólise, considerando-se o total de α -amino grupos presentes na massa inicial de proteínas da amostra. O total de α -amino grupos da amostra foi estimado considerando-se o peso molecular médio de aminoácidos (PM=113).

4.2.7 Determinação de Fenólicos Totais

Os teores de fenólicos totais das amostras foram determinados conforme o descrito por Pereira, Tavano (2014), com modificações, utilizando-se o reagente de Folin-Ciocalteu. Num máximo de 250 μ l de amostra (extratos aquosos e etanólicos preparados como o descrito em 4.2.3), foram adicionados 250 μ l de reagente Folin-Ciocalteu e 1000 μ l de água MiliQ. Após agitação os tubos foram incubados em temperatura ambiente por 6 minutos. Após o período

de incubação acrescentou-se 750µl de solução de carbonato de sódio 7%, agitou-se, e após incubação em temperatura ambiente por 2h realizou-se as leituras em espectrofotômetro a 750nm, contra branco da reação. Uma curva analítica de ácido gálico foi construída considerando-se as concentrações entre 0 a 16µg de ácido gálico e os resultados foram expressos em mg de equivalente de ácido gálico/g de amostra.

4.2.8 Determinação de Flavonoides Totais

Os teores de flavonoides totais das amostras foram determinados conforme o método proposto por Boateng et al (2008), com modificações. Em tubos de ensaio foram colocados 250µl de amostra, 75µl de reagente de Nitrato de sódio 5% e 1000µl de água MiliQ, os tubos foram agitados e deixados em temperatura ambiente por 5 minutos para incubação. Após o período de incubação, foi adicionado 75µl de cloridrato de alumínio, e os tubos foram deixados em temperatura ambiente por mais 5 minutos para reação. Após o período de reação, foi adicionado 500µl de hidróxido de sódio 1M e 750µl de água MiliQ. Os tubos foram agitados e procedeu-se a leitura em espectrofotômetro a 510nm. Uma curva analítica de catequina foi construída considerando-se as concentrações entre 0 a 45µg de catequina e os resultados foram expressos em mg de equivalente de catequina/g de amostra.

4.2.9 Determinação do Potencial Antioxidante, pela Captura do Radical ABTS⁺ (2,2'-azinobis (3-etilbenzoatiazolina-6-ácido sulfônico))

A determinação do potencial antioxidante das amostras foi realizada conforme o proposto por Ahn, Kim, Je (2014), com modificações. Uma solução de ABTS⁺ (2,2'-azinobis (3-etilbenzoatiazolina-6-ácido sulfônico)) foi preparada utilizando-se 0,096g de ABTS⁺ solubilizado em 25ml de água MiliQ. A esta solução foi adicionada 0,01655g de persulfato de potássio e esta solução foi mantida sob proteção da luz por 16h. Este reagente foi então diluído com água MiliQ até que sua leitura para absorvância a 734nm fosse aproximadamente 0,700. Para as análises adotou-se um máximo de 250µl de amostra (extratos aquosos e etanólicos, preparados como descrito em 4.2.3), adicionando-se 750µl da solução recém preparada de ABTS⁺. Após incubação de 60 minutos na ausência de luz, as leituras das absorvâncias foram realizadas em espectrofotômetro em 734nm. Para efeito de cálculos, foi utilizada uma curva analítica de Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-Carboxylic

Acid) na faixa de concentração de 0 a 7nMols de Trolox e os resultados foram expressos em μ mols de equivalente de Trolox/g de amostra.

4.2.10 Determinação do Potencial Antioxidante pela Redução do Radical Livre-DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)

A capacidade do potencial antioxidante das amostras foi determinada utilizando-se o método proposto por Brand-Williams, Curvelier, Berset (1995), com modificações de Pereira, Tavano (2014). A um máximo de 250 μ l dos extratos etanólico e aquoso, preparados como o descrito em 4.2.3, foi adicionado 1,0ml de solução de DPPH (2,2-Diphenyl-1-picryl-hidrazil) 0,06 mM, em etanol 80%. Após 10 minutos de reação as absorvâncias foram lidas em espectrofotômetro a 517nm. Uma curva analítica de Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-Carboxylic Acid) foi construída considerando-se a faixa de concentração de 0 a 7nMols de Trolox e os resultados foram expressos em μ mols de equivalente de Trolox/g de amostra.

4.2.11 Análise Estatística

Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão. As diferenças entre médias foram avaliadas por ANOVA e teste de Tukey, ao nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinação de Umidade e Sólidos Totais.

Segundo Kim et al. (2011) a germinação se inicia já no momento da absorção de água pelos grãos secos. Desta maneira, neste trabalho, adotou-se o primeiro ponto de germinação como sendo aquele correspondente a 8 horas de germinação, quando se encerrou o processo de embebição inicial dos grãos. Neste processo, como esperado, os grãos absorveram água em quantidades equivalentes a cerca de 4 vezes o peso original do grão, conforme pode ser observado pelos dados da Tabela 1, sendo que estes teores foram mantidos praticamente constantes por todos os dias da germinação. Nos tempos 80h e 200h, observa-se uma redução no teor de sólidos solúveis dos grãos, nesses tempos já se observa o surgimento do eixo embrionário, que demonstra estar refletindo modificações nos grãos ou o redirecionamento

dos compostos para outras partes do grão. Moreira, (2015), em seus estudos de quantificação de fluxos metabólicos realizados com as variedades de soja Conquista e Tieta, observou que durante o crescimento do eixo embrionário houve uma diminuição de massa seca, gerada pelo desdobramento dos tecidos de reserva e acúmulo de solutos nas células, caracterizando uma massa fresca maior nos cotilédones. Uma vez que se pretendia realizar ensaios que consideravam variações nos teores de componentes dos grãos e suas extrações no meio aquoso (durante o processo de produção do extrato aquoso), foi importante esta informação dos teores de umidade dos grãos, já que foi possível assim calcular-se o teor de sólidos dos grãos (Tabela 1), permitindo que os dados fossem expressos em base úmida e seca, para que se pudesse avaliar de fato a mudança nas concentrações dos componentes em si, sem que os dados sofressem a influência da diluição dos compostos sólidos ocasionada pela maior ou menor hidratação dos grãos.

Tabela 1. Teor de Umidade e Sólidos Totais dos grãos de soja (var. BRS 257) em diferentes tempos de germinação.

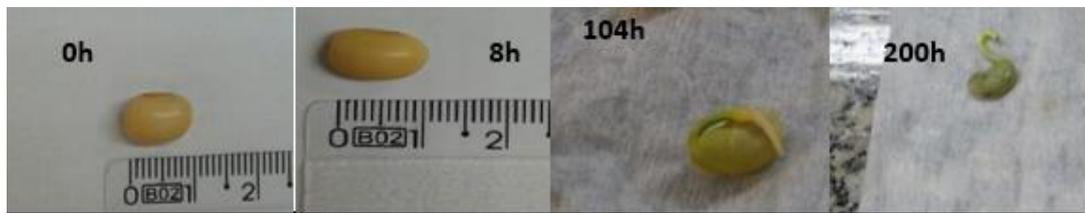
Tratamento	Tempo de Germinação (Horas)	Teor de Umidade (%)	Teor de Sólidos Totais (%)
1	0	10,40 ± 0,40	89,60
2	8	58,78 ± 1,15	41,22
3	32	57,95 ± 0,59	42,05
4	56	54,53 ± 0,75	45,47
5	80	59,34 ± 0,63	40,66
6	104	48,49 ± 0,59	51,51
7	200	64,72 ± 1,53	35,28

Fonte: Elaborado pela autora, 2017.

Resultados de umidade próximos aos aqui encontrados foram observados por Martinez et al. (2011) para a variedade de soja M. Soyrr, respectivamente 63,73% após a germinação e 6,71% antes da germinação.

Na figura 1 encontram-se as imagens dos grãos em diferentes tempos de germinação, onde se observa alterações de formato, tamanho, cor e surgimento de radícula após 104h de germinação.

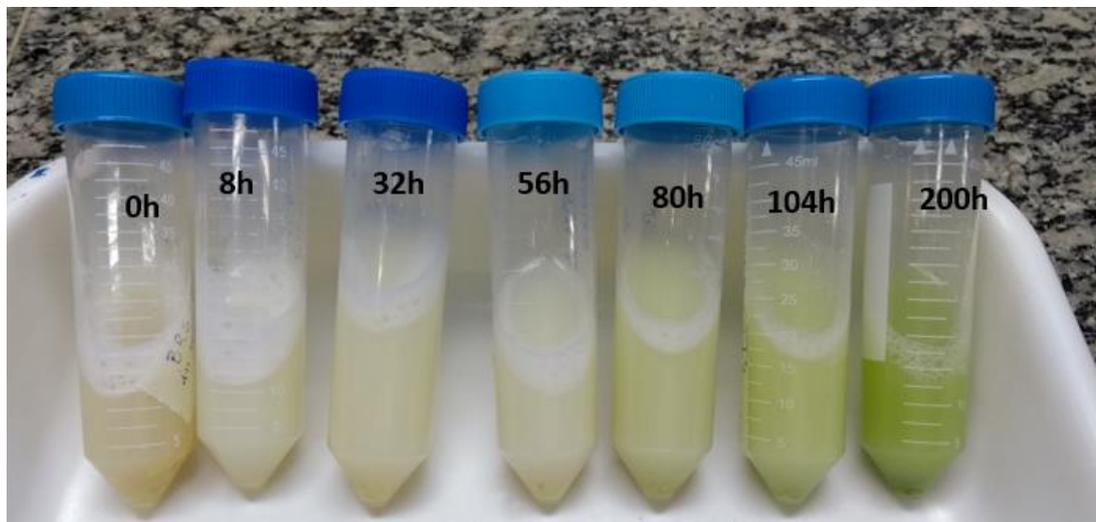
Figura 1. Grãos de Soja (var. BRS 257) nos diferentes tempos de germinação (0, 8, 104 e 200 horas).



Fonte: Elaborado pela autora, 2017.

Os componentes presentes inicialmente nos grãos podem sofrer modificações ou serem redistribuídos entre as diferentes partes, como seus cotilédones e radículas, ao longo do processo de germinação. Neste trabalho optou-se por utilizar o material completo para obtenção dos extratos aquosos (principal foco dos estudos aqui realizados). Como esperado, diferentes características dos extratos refletem as modificações sofridas pelos grãos, como por exemplo alteração de coloração, como pode ser observado na figura 2.

Figura 2. Extratos Aquosos obtidos a partir dos grãos germinados de soja (var. BRS 257) após 0, 8, 32, 56, 80, 104 e 200 horas de germinação.



Fonte: Elaborada pela autora, 2017. Extratos brutos, antes da centrifugação, obtidos após primeira extração realizada utilizando-se a proporção 1:20 (m/v).

Observa-se que a partir do tempo 56h de germinação é possível detectar o aumento da presença de clorofila nos grãos, reforçando o surgimento da coloração esverdeada, e alterações na composição química do grão, coincidente com a observação baseada no aspecto visual dos extratos aqui obtidos (Figura 2). A clorofila é uma substância de estrutura formada por complexos derivados da porfirina e magnésio como átomo central, e tem como principal

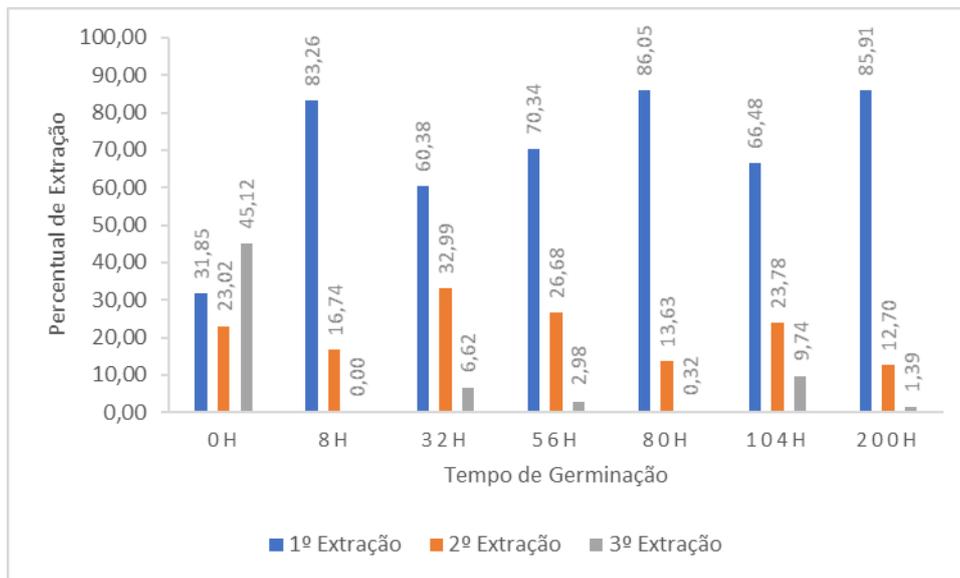
função absorver luz e converter em energia química durante a fotossíntese das plantas (SCHOEFS, 2002). As clorofilas *a* e *b* são as principais responsáveis pelo processo de fotossíntese, e ao receberem a chamada luz visível (390-760nm) as moléculas absorvem a energia que causa uma excitação dos elétrons da molécula, e essa energia de excitação é utilizada na fotossíntese (ROMANO, 2001). As clorofilas respondem à luz do meio adaptativamente, alterando sua morfologia e composição (ENGEL, POGGIANI, 1991).

Para que as alterações nas composições sofridas ao longo do processo de germinação sejam de fato testadas/verificadas aos extratos aquosos, é condição primordial que os componentes presentes nos grãos apresentem solubilidade em água. Além da solubilidade, também é importante que estes componentes sejam facilmente transferidos ao solvente, uma vez que a interação com outros compostos ou mesmo a estruturação da matriz dos grãos poderia influenciar em suas potenciais extratibilidades. Desta forma foi observado neste trabalho também o comportamento de solubilização dos diferentes compostos analisados, considerando-se três ciclos de extrações consecutivas, conforme será apresentada a seguir.

5.2 Determinação de Proteínas, Atividade de Inibição de Tripsina e Digestibilidade Proteica *in vitro* dos Extratos Aquosos.

A concentração de proteínas nos extratos aquosos após as três extrações, partindo-se dos grãos nos diferentes tempos de germinação, foi analisada. O total de proteínas extraídas e respectivos rendimentos de extrações foram apresentados na Figura 3 e Tabela 2.

Figura 3. Percentual de extração de proteínas nos extratos aquosos dos grãos de soja (var. BRS 257) em diferentes tempos de germinação.



Fonte: Elaborado pela autora, 2017. Percentuais relativos ao total de composto extraído nos três ciclos de extrações. Total de proteínas solúveis após as três extrações =100%.

A partir da observação da Figura 3, observa-se que já é possível um alto percentual de recuperação das proteínas já na primeira extração para os grãos germinados, alcançando-se teores entre 60,38 e 86,05 % do total de proteínas solúveis dos grãos (figura 3). Para os grãos não germinados (tempo 0h), as solubilizações foram menos efetivas para as primeiras extrações, sendo que ainda na terceira extração (segunda reextração) foram solubilizados cerca de 45% das proteínas solúveis em água.

A obtenção do extrato aquoso foi realizada sem nenhum tratamento prévio das amostras ou mesmo simulando-se a relação massa: volume habitualmente utilizada para obtenção de extratos aquosos comerciais de soja. Os perfis proteicos dos extratos aquosos estão expressos na Tabela 2.

Tabela 2. Teores proteicos dos extratos aquosos obtidos a partir dos grãos de soja (var. BRS 257) germinados nos diferentes tempos de germinação em $\mu\text{g/g}$ de amostra.

Tratamento	Tempo Germinação (Horas)	Proteína extraída/ g de grãos b.u.*	% de proteínas no extrato aquoso	% de extração proteica**	Proteína extraída/ g de grãos b.s.***
1	0	23,45 ^e ±0,29	0,07	6,10	26,17 ^e ±0,33
2	8	19,80 ^g ±0,33	0,09	17,19	48,02 ^{fe} ±0,79

3	32	35,41 ^a ±1,27	0,10	21,20	84,23 ^b ±3,03
4	56	23,42 ^{fc} ±0,11	0,09	17,01	51,51 ^{ed} ±0,24
5	80	28,33 ^{dc} ±0,79	0,10	21,41	69,68 ^c ±1,95
6	104	30,01 ^{cd} ±0,93	0,09	15,23	58,27 ^d ±1,81
7	200	32,04 ^b ±0,29	0,11	22,77	90,82 ^a ±0,82

Fonte: Elaborada pela autora, 2017. *b.u. = base úmida; ** percentual de proteínas extraídas em relação ao total originalmente presente nos grãos utilizados; ***b.s. = base seca. Valores expressos como média ± desvio padrão. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si ao nível de significância de 5%, pelo teste de Tukey.

Observa-se que os maiores teores de proteínas são determinados nos tempos 32 e 200h (Tabela 2). Embora a variação nos teores de proteínas extraídas ou presentes nos extratos aquosos não apresentem variação estatisticamente diferente entre os tempos de germinação dos grãos, ao observar os valores de % de proteínas solubilizadas em água em relação ao total de proteínas disponíveis nos grãos, é possível verificar que já para as primeiras horas do processo de germinação este percentual aumenta mais de 100% em relação aos grãos não germinados (Tabela 2). Entretanto, estes dados já indicam um maior potencial de geração de produtos proteicos na ocasião da utilização de matérias primas germinadas.

Para a cultivar de soja BRS 258, germinadas por 72h em diferentes temperaturas, e através destas amostras obtidas de farinhas, Paucar-Menacho et al, (2010) observaram um aumento de 31,9% no teor de proteínas solúveis, quando mantidas na mesma temperatura (25°C) (272.900 a 360.000µg/g de farinha), para 12 e 72h, respectivamente. Observaram ainda que para 42h de germinação, quando a temperatura foi elevada de 18 para 32°C, houve um aumento de 18,4% no teor de proteínas solúveis.

Estas alterações nos perfis de solubilidade das proteínas dos grãos podem ser reflexo das alterações sofridas pelo processo de germinação no conjunto das proteínas destes materiais. Cantelli et al, (2017), em seus estudos sobre germinação para a cultivar de soja BRS 216, relataram que as sementes germinadas apresentaram aumento no seu teor de proteína quando comparado com a semente não germinada (477.000 e 419.600µg/g de amostra), respectivamente. Gu et al (2017), em seus estudos com soja germinada por 4 dias, relatam que após o período de germinação houve aumento no teor de aminoácidos essenciais, identificados por cromatografia gasosa e por cromatografia líquida.

Reforçando estas possibilidades de alterações nos perfis de proteínas dos grãos, a observação dos dados gerados durante os ensaios de digestibilidade proteica dos extratos aquosos deve ser discutida. Ao se realizar os procedimentos para cômputo da digestibilidade *in vitro*, diferentes dados puderam ser destacados além daqueles gerados pela metodologia

tradicional. Por exemplo, ao observar os dados de α -amino grupos liberados no sobrenadante dos “brancos das amostras” (Tabela 3), ou seja, extratos aquosos apenas incubados com as soluções tampões nos mesmos tempos e temperaturas dos a serem hidrolisados, pode-se obter a informação daquele material disponível na amostra que apresente características que o permitam ficar em solução após a precipitação (TCA 12%). Neste caso, admite-se que aminoácidos livres e pequenos peptídeos seriam capazes de se solubilizarem nestas condições do meio. Para os brancos das amostras, percebe-se que a partir de 80h de germinação houve um aumento de α -amino grupos detectados em solução, representando aumento de materiais proteicos de baixo peso molecular ou mesmo aminoácidos livres disponibilizados pelo próprio processo de germinação. Vernanza et al (2012) também verificaram um aumento de 5% no teor de proteínas solúveis após 72h de germinação de grãos de soja BRS 133. Neste trabalho, em 80 horas de germinação propiciou-se o aumento de 14,7% (Tabela 3), e para os tempos superiores a 104h este aumento alcançou valores superiores a 49% de aumento de proteínas solúveis.

Tabela 3. Porcentagem de α -Amino Grupos (%), dos extratos aquosos obtidos a partir dos grãos de soja (var. BRS 257), germinados nos diferentes tempos.

Tratamento	Tempo de Germinação (horas)	% de α -Amino Grupos			
		Branco da amostra	Hidrolisado sem desconto do branco	% de Hidrólise	% em Relação à Caseína
1	0	37,63 ^d ± 0,69	95,17 ^c ± 1,02	57,54 ^a ±0,15	87,21
2	8	23,98 ^g ± 1,28	59,84 ^g ± 0,13	40,21 ^{gf} ±0,27	60,94
3	32	31,26 ^f ± 1,12	73,29 ^f ± 0,52	49,29 ^{cbd} ±0,91	74,70
4	56	34,10 ^e ± 0,59	78,44 ^e ± 0,40	44,80 ^{efd} ±1,00	67,90
5	80	43,18 ^c ± 0,65	88,11 ^d ± 2,97	50,49 ^{bcd} ±0,47	76,52
6	104	56,98 ^{ab} ± 0,46	102,17 ^{ab} ± 1,81	42,67 ^{fge} ±0,80	64,67
7	200	56,29 ^{ba} ± 0,60	99,54 ^{bac} ± 2,05	49,18 ^{dceb} ±0,17	74,54
	Caseína	-	-	65,98± 2,89	100

Fonte: Elaborada pela autora, 2017. Valores expressos como média ± desvio padrão. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si ao nível de significância de 5%, pelo teste de Tukey.

Este aumento nos teores de material proteico de menores pesos moleculares poderia ser entendido como um aumento na digestibilidade naturalmente ocasionado pelos efeitos da germinação. Embora os dados de digestibilidade proteica *in vitro* não demonstrem tal diferenciação entre os grãos não germinados e germinados (Tabela 3), chegando a apontar para uma redução nos percentuais de hidrólise obtidos após o processo de germinação sofrido pelos grãos, é importante ressaltar o que de fato se detecta com este ensaio. Neste caso, há na metodologia uma etapa em que se faz o desconto dos materiais solúveis naturalmente nas amostras, ou seja, de fato o que se determina é o potencial de hidrólise das proteínas grandes (em relação a peso molecular) e materiais proteicos que não permaneceriam em solução após precipitação com TCA (material representado pelo “branco da amostra”). Ou seja, a metodologia considera apenas a contagem de α -amino grupos gerados pela ação das enzimas digestivas. Contudo, esta forma de interpretação dos dados pode gerar equívocos na avaliação final da amostra: por exemplo, se a amostra passasse a ser composta de aminoácidos livres após a germinação, sua digestibilidade poderia ser interpretada como zero. Sendo assim, julgou-se importante considerar também a situação em caso de não se realizar os descontos dos “brancos das amostras”, levando-se em conta todo material solúvel gerado, seja pela ação das enzimas do ensaio, seja pela ação prévia das proteases presentes nos grãos em cada tempo de germinação.

Desta forma, pode-se observar que, diferentemente dos resultados da digestibilidade *in vitro* tradicionalmente calculados, que indicavam que para todos os tempos de germinação ocorria uma diminuição de digestibilidade em comparação aos grãos não germinados, observa-se que ao se considerar todo o material solúvel há uma redução nos valores para os tempos de germinação iniciais, mas a partir de 104h estes valores voltam a se equiparar com o tempo 0h, sendo que no próprio tempo 104h essa digestibilidade é apontada como superior a do tempo zero (Tabela 3). Estes dados podem estar refletindo uma demanda inicial dos grãos por materiais proteicos para formação de novas enzimas, com uso daqueles materiais de acesso mais facilitado como proteínas de maior digestibilidade e mesmo os aminoácidos já em estado livre, restando íntegras justamente aquelas proteínas mais resistentes à digestão.

Outra observação importante é que nos ensaios de digestibilidade *in vitro* o que se observa é somente o potencial de hidrólise das proteínas, sem se considerar seu potencial de absorção, como seria em ensaios *in vivo*. Considerando que aminoácidos livres e pequenos peptídeos apresentam maior potencial de absorção, poder-se-ia levantar a hipótese de que estes grãos germinados, uma vez que apresentam maiores teores de materiais proteicos de

menor peso molecular, poderiam ser interessantes e potencialmente promissores quanto à sua disponibilidade à absorção *in vivo* (CHEN, CHANG, 2015).

No processo de germinação de soja da cultivar M. Soyrr, por período de 48h, Martinez et al (2011) determinou valores de 32,53% em tempo 0h e 40,32%. Ao final da germinação (48h), esses valores diferiram estatisticamente entre si, indicando que houve 24% de melhora na digestibilidade proteica *in vitro*.

Em síntese, destaca-se que, considerando apenas o efeito da germinação, o melhor tempo para a máxima liberação de α -amino grupos (“branco da amostra”) é o tratamento 6 (104h). Nota-se que, após o tratamento 1 (0h), essa liberação diminui até o tratamento 3 (32h), aumentando a partir do tratamento 5 (80h), chegando ao valor máximo no tratamento 6 (104h), sendo o valor obtido no tratamento 7 (200h) não significativamente diferente daquele do tratamento 6. Esses dados indicam que nos primeiros tempos de germinação ocorreu hidrólise das moléculas de proteína em aminoácidos livres, que são formas mais facilmente utilizadas. Moreira (2015) observou alterações similares no teor de compostos proteicos, e relata que os aminoácidos degradados nos cotilédones (12 a 48h de germinação) são utilizados como fontes de carbono, nitrogênio e energia para a formação dos eixos embrionários (72 e 96h de germinação). Formados os eixos embrionários, a mobilização dos aminoácidos se dá no sentido de produção de proteínas neste órgão que será utilizado para o crescimento da planta.

Complementando-se as informações sobre alterações nos perfis proteicos dos grãos devido à germinação, determinou-se as atividades de inibição de tripsina das amostras. Os dados estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Inibidores de Tripsina nos diferentes tempos de germinação, para o extrato aquoso obtido a partir dos grãos de soja (var. BRS 257).

Tratamento	Tempo de Germinação (Horas)	Inibidor de Tripsina (UIT/mg de proteína)	
		Total	%
1	0	491,56 ^a ±5,07	100
2	8	344,28 ^{fg} ±31,32	70,03
3	32	434,39 ^{dcbe} ±18,48	88,37
4	56	438,44 ^{cbe} ±27,43	89,19
5	80	443,02 ^{badce} ±14,03	90,12
6	104	323,60 ^{gf} ±17,27	65,83
7	200	404,97 ^{edcb} ±8,27	82,38

Fonte: Elaborada pela autora, 2017. Valores expressos como média \pm desvio padrão. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si ao nível de significância de 5%, pelo teste de Tukey.

Como anteriormente discutido, estes inibidores são considerados antinutricionais e sua redução é desejável, não apenas por prejudicarem a digestibilidade proteica como também por serem associados à possibilidade de alterações no metabolismo e hiperestimulação pancreática. Embora não tenha sido possível detectar-se uma redução crescente e significativa no decorrer da germinação, conforme pode ser observado na Tabela 4, para todos os tempos de germinação os grãos apresentaram redução de suas unidades de inibição de tripsina em relação ao tempo 0h, com exceção do tempo 80h.

Ribeiro, Ida, Oliveira (1999), estudando a germinação nas variedades BR-13 e Paraná, observaram que durante o período de germinação houve acréscimo do inibidor de Tripsina para ambas as variedades, sendo que na variedade BR-13 esse acréscimo foi de 22% no tempo de 72h, e na variedade Paraná foi de 17% no mesmo período. Já nos estudos realizados por Martinez et al (2011), os autores relatam que após a germinação de 48h dos grãos de soja M. Soyrr não houve diferença estatística entre os valores determinados.

Neste estudo observa-se que a maior redução de atividade de inibidores de tripsina foi detectada nos grãos do tempo de 104h (Tabela 4), com cerca de 35 % de redução. Sabendo-se que os inibidores de proteases são de origem proteica e que sua principal função no vegetal é de proteção contra predação de insetos (PAULA, 2006), e que a mobilização dos aminoácidos após a formação dos eixos embrionários (aproximadamente entre 72 e 96h de germinação) é direcionada para a formação de proteínas para a sustentação da planta e que esses aminoácidos podem participar do transporte de elétrons via flavoproteínas (MOREIRA, 2015), pode-se supor que possam ter sido formado compostos diferentes, como por exemplo compostos fenólicos, ao invés de inibidores de proteases.

Para a farinha de soja obtida a partir de grãos germinados e não germinados em diferentes temperaturas para a cultivar BRS 258, Paucar-Menacho et al (2010) identificaram uma redução no inibidor de tripsina do tipo Bowman-Birk (BB) de 39,50% e 11% para germinados a 72h a 25°C e 21h a 20°C, respectivamente. Os mesmos autores relataram também que, ao aumentar a temperatura de 20 para 30°C, houve uma diminuição de 12,4% no inibidor Bowman-Birk (BB), e que em temperatura constante de 25°C nos períodos de 12 a 72h de germinação essa redução foi de 27%, indicando que o processo de germinação reduz a concentração dos inibidores de BB. Jiang, Cai, Xu (2013) também relataram lento aumento no inibidor de tripsina em extratos aquosos crus, obtidos de soja amarela, germinada por 72h.

5.3 Determinação de Fenólicos Totais.

Uma vez que o processo de germinação de grãos de soja é considerado um potencial promotor do aumento de componentes considerados benéficos para a saúde (LAILA, MURTAZA, 2014), e que muitos destes fitoquímicos podem ser solúveis em água, uma mudança na composição dos grãos quanto a estes componentes poderia propiciar que tais benefícios fossem estendidos para o extrato aquoso. Diante disso, o teor de fenólicos totais foi considerado neste estudo, objetivando apresentar seus reflexos no extrato aquoso, bem como produzir dados de rendimento de sua extração em soluções aquosas. Classicamente, ensaios de determinação de fenólicos totais em amostras de alimentos contam com preparo de extrato etanólico por ser considerado meio extrator de alta eficiência para tais componentes em função de suas solubilidades. Para efeito de comparação sobre o comportamento de extração do conjunto dos fenólicos dos grãos nos diferentes tempos de germinação, consideraram-se extrações paralelas em meio alcoólico (etanol 80%) e aquoso, conforme pode ser observado no conjunto de dados da Tabela 5.

Tabela 5. Teor de Fenólicos Totais nos extratos aquosos e etanólicos a partir de grãos de soja (var BRS 257) em diferentes tempos de germinação.

Tratamento	Tempo de Germinação (horas)	Fenólicos totais (mg em equivalente de ácido gálico/g de grãos)			
		Extrato Aquoso		Extrato Etanólico	
		Base Úmida	Base Seca	Base Úmida	Base Seca
1	0	1,82 ^b ± 0,01	2,03 ^g ± 0,01	1,32 ^a ± 0,04	1,47 ^e ± 0,05
2	8	1,16 ^g ± 0,02	2,80 ^f ± 0,04	0,63 ^{fg} ± 0,02	1,52 ^{fgd} ± 0,04
3	32	2,14 ^a ± 0,06	5,08 ^{ab} ± 0,01	0,96 ^{bcde} ± 0,06	2,28 ^{bc} ± 0,14
4	56	1,41 ^f ± 0,02	3,11 ^c ± 0,04	0,63 ^{gf} ± 0,01	1,39 ^{gfd} ± 0,03
5	80	1,66 ^{ecd} ± 0,03	4,08 ^c ± 0,06	0,92 ^{cbcd} ± 0,03	2,26 ^{cb} ± 0,08
6	104	1,80 ^{cae} ± 0,02	3,50 ^d ± 0,05	0,89 ^{ebcd} ± 0,02	1,73 ^{dfg} ± 0,03
7	200	1,75 ^{dae} ± 0,08	4,95 ^{ba} ± 0,22	0,92 ^{dbce} ± 0,03	2,62 ^a ± 0,08

Fonte: Elaborada pela autora, 2017. Valores expressos como média ± desvio padrão. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si ao nível de significância de 5%, pelo teste de Tukey.

Pela Tabela 5, pode-se observar que o teor de fenólicos totais dos extratos aquosos expresso em base úmida diminui com 8h de germinação, chegando a um máximo com 32h, decaindo com 56 e 80h, voltando a aumentar com 104 e 200h, chegando aos níveis do tempo

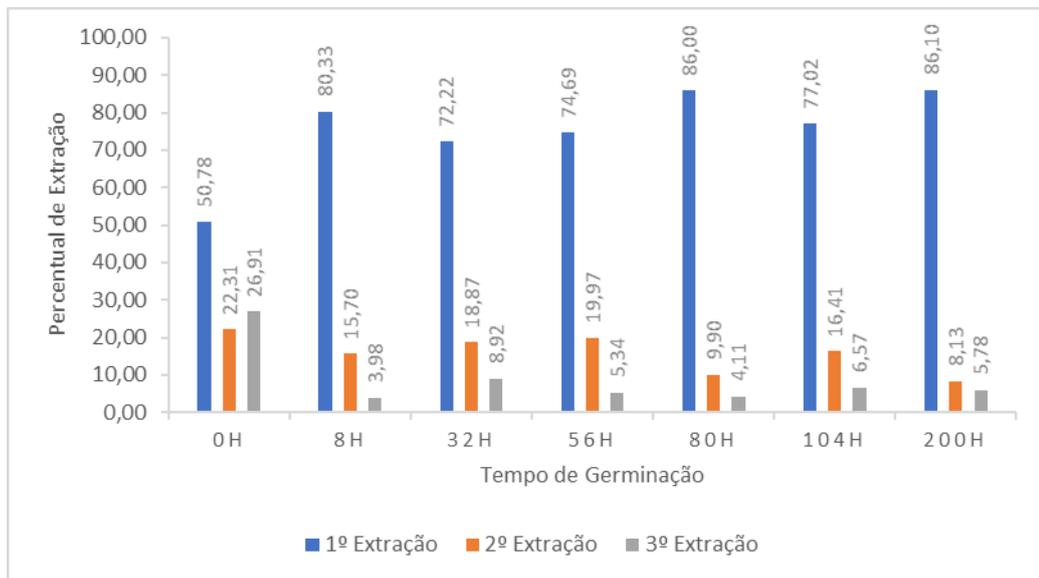
0h. Expressos em base seca, esses resultados mostram que a germinação provocou um aumento de fenólicos totais, chegando a um máximo com 32h, caindo na sequência, mas mantendo-se em níveis superiores ao tempo 0h e voltando ao nível máximo com 200h.

Considerando os extratos etanólicos, o teor de fenólicos expresso em base úmida, todos os tempos de germinação produziram resultados inferiores aos do tempo 0h. Sendo que, excetuando o tempo 0h, o maior teor de fenólicos totais associou-se ao tempo de 32h, sem diferença significativa com os demais tempos, exceto com o tempo de 8h que produziu o menor valor. Os resultados expressos em base seca indicam que o tratamento 3 de germinação (32h) associou-se à segunda maior quantidade de fenólicos totais, cuja quantidade oscilou nos tempos seguintes, chegando ao máximo com o tempo de 200h de germinação. Assim, também a partir dos extratos etanólicos, destaca-se o tempo de 32h de germinação.

Outra observação interessante é que, diferentemente do esperado, os teores de fenólicos extraídos em meio aquoso foram superiores aos solúveis em meio etanólico. Teoricamente, compostos fenólicos possuem estrutura que favorecem sua maior solubilidade em meio alcoólico, embora suas estruturas variáveis possam lhe conferir solubilidades variáveis em meios mais ou menos aquosos. Por exemplo, Martins, Lopes, Andrade (2013) declararam que compostos fenólicos de cadeia menor e mais ácidos solubilizaram-se no extrato aquoso, enquanto os de cadeia maior e menos ácidos no extrato etanólico. Uma vez que o conjunto de fenólicos dos grãos pode ser complexo, estes dados indicam que dentre os compostos presentes nestes grãos de soja, em todos os tempos de germinação, grande parte apresenta um alto potencial de transferência para os possíveis produtos a serem formulados na base de extrato aquoso de soja.

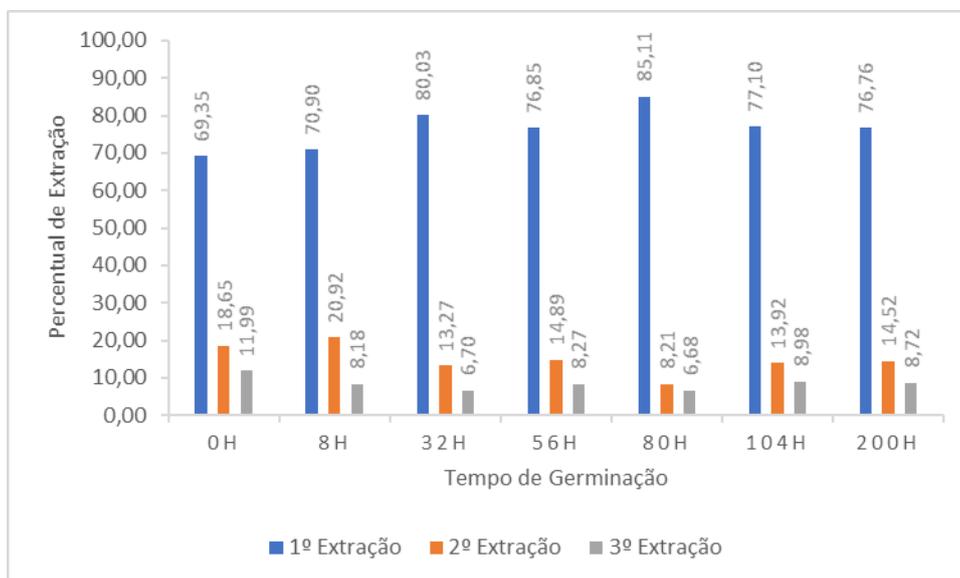
Os dados nas Figuras 4 e 5 demonstram a facilidade de solubilização dos fenólicos destes grãos de soja nos meios adotados, uma vez que logo nas primeiras extrações grande parte destes componentes já havia sido extraída.

Figura 4. Rendimento das extrações para fenólicos totais nos extratos aquosos dos grãos de soja (var BRS 257) em diferentes tempos de germinação.



Fonte: Elaborado pela autora, 2017. Percentuais relativos ao total de composto extraído nas três extrações.

Figura 5. Rendimento das extrações de fenólicos totais para o extrato etanólico a partir de grãos de soja (var. BRS 257) em diferentes tempos de germinação.



Fonte: Elaborado pela autora. Percentuais relativos ao total de composto extraído nas três extrações.

Martinez et al (2011), quando germinaram por 48h a cultivar de soja M. Soyrr, também observaram um aumento no teor de compostos fenólicos, apresentando 1,689mg/g antes da germinação e 2,793mg/g após a germinação.

Nos estudos realizados por Bolanho (2010), a concentração de fenólicos totais nos grãos de soja *in natura* da cultivar BRS 267 foi de 1,878mg em equivalente de ácido gálico (EAG) /g de amostra em base seca. O mesmo autor, ao comparar os teores de produtos

comerciais de soja, encontrou valores de 1,942 e 2,302mg de EAG/g de extrato hidrossolúvel de soja em pó. Estas faixas são próximas dos valores encontrados neste estudo, e, por se tratarem de extratos hidrossolúveis, reforçam a ideia de que estes compostos fenólicos presentes na soja são potencialmente solúveis em água.

Nos estudos de Kumari, Chang (2016) com grãos de soja da cultivar Prosoy germinados, relatou-se que o teor de compostos fenólicos aumentou em 78% após 7 dias de germinação. Nesse estudo, os autores relataram que no segundo dia de germinação detectaram menores teores e que o maior teor de fenólicos foi para o grão germinado por 7 dias, semelhante ao perfil observado neste estudo (Tabela 4).

De acordo Jiang, Cai, Xu (2013) o aumento nos teores de fenólicos extraídos pode ser reflexo tanto da formação de novos tipos de fenólicos quanto do aumento da liberação facilitada desses fenólicos dos vacúolos celulares. A germinação, uma vez que altera as características dos tecidos desses grãos, poderia colaborar para maior liberação destes componentes nos meios extratores. Em estudos realizados por Kumari, Chang (2016) os autores apontaram que a cocção aumentou em até 198% o potencial antioxidante analisado pelo método de DPPH para a cultivar Prosoy germinada. Este aumento poderia ser relacionado com essa maior facilidade de solubilização dos componentes com atividade antioxidante a partir dos tecidos pós tratamento térmico.

5.4 Determinação de Flavonoides Totais

Quando os teores de flavonoides são considerados (componentes do conjunto dos fenólicos totais mais associados à atividades antioxidantes em alimentos de origem vegetal) (PIETTA, 2000), novamente se observa um comportamento similar ao do conjunto dos fenólicos (Tabela 6 e Figuras 6 e 7).

Tabela 6. Teor de Flavonoides Totais nos extratos aquosos e etanólicos a partir de grãos de soja (var. BRS 257) em diferentes tempos de germinação.

Tratamento	Tempo de Germinação (Horas)	Flavonoides Totais (mg em equivalente de Catequina/g de amostra)			
		Extrato Aquoso		Extrato Etanólico	
		Base Úmida	Base Seca	Base Úmida	Base Seca
1	0	1,86 ^e ±0,05	2,08 ^g ±0,06	1,05 ^a ±0,03	1,17 ^g ±0,03
2	8	1,64 ^f ±0,05	3,99 ^e ±0,12	0,57 ^{fg} ±0,02	1,38 ^{ed} ±0,05

3	32	3,49 ^a ±0,15	8,31 ^a ±0,35	0,83 ^{cd} ±0,02	1,99 ^{bc} ±0,04
4	56	2,21 ^{cd} ±0,03	4,85 ^d ±0,08	0,54 ^{ef} ±0,01	1,18 ^{fg} ±0,01
5	80	2,16 ^{dc} ±0,04	5,32 ^c ±0,09	0,75 ^{cd} ±0,02	1,84 ^{cb} ±0,06
6	104	1,31 ^e ±0,04	2,55 ^f ±0,08	0,76 ^{de} ±0,01	1,48 ^{de} ±0,02
7	200	2,67 ^b ±0,04	7,55 ^b ±0,13	0,88 ^{dc} ±0,04	2,49 ^a ±0,11

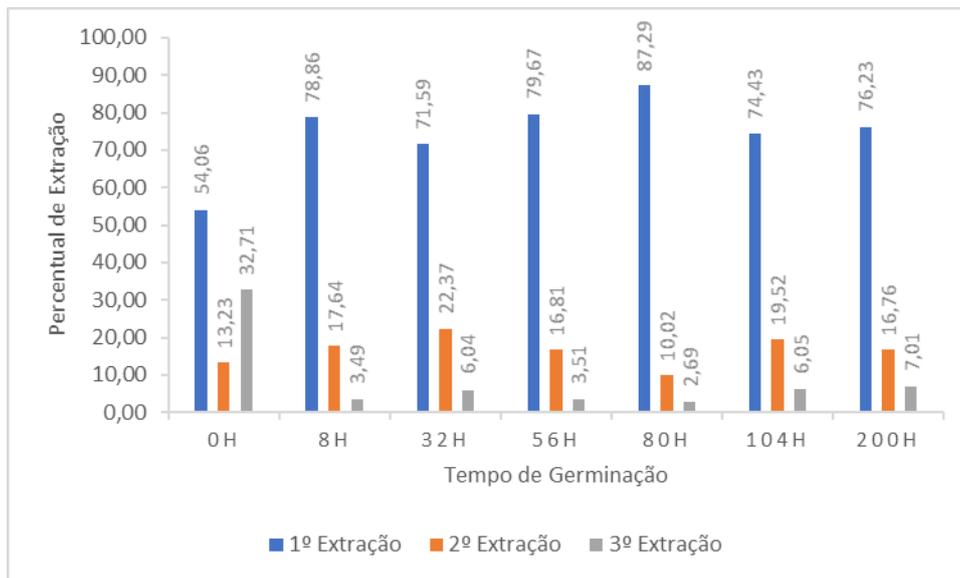
Fonte: Elaborada pela autora, 2017. Valores expressos como média ± desvio padrão. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si ao nível de significância de 5%, pelo teste de Tukey.

Quando se consideram os teores de flavonoides nos extratos aquosos expresso em base úmida, o tempo de 32h de germinação associa-se à máxima concentração. Apenas nos tempos de 8h e 104h as amostras apresentaram teores de flavonoides totais menores do que a concentração inicial. Expressando esses teores em base seca, também o tempo de 32h apresentou a maior quantidade de flavonoides, sendo que todos os tempos de germinação produziram concentrações de flavonoides superiores à inicial (tempo 0h).

Em relação aos extratos etanólicos, o teor de flavonoides expresso em base úmida indica que o grão sem germinar apresentou o maior nível de flavonoides, sendo o segundo maior valor alcançado no tempo de 32h de germinação. Expressando os resultados em base seca, é observada uma significativa oscilação nos valores ao longo do tempo de germinação, constatando-se que os menores valores foram observados no tempo 0h e 56h. Sendo a maior concentração alcançada no tempo 200h e a segunda maior nos tempos 32h e 80h.

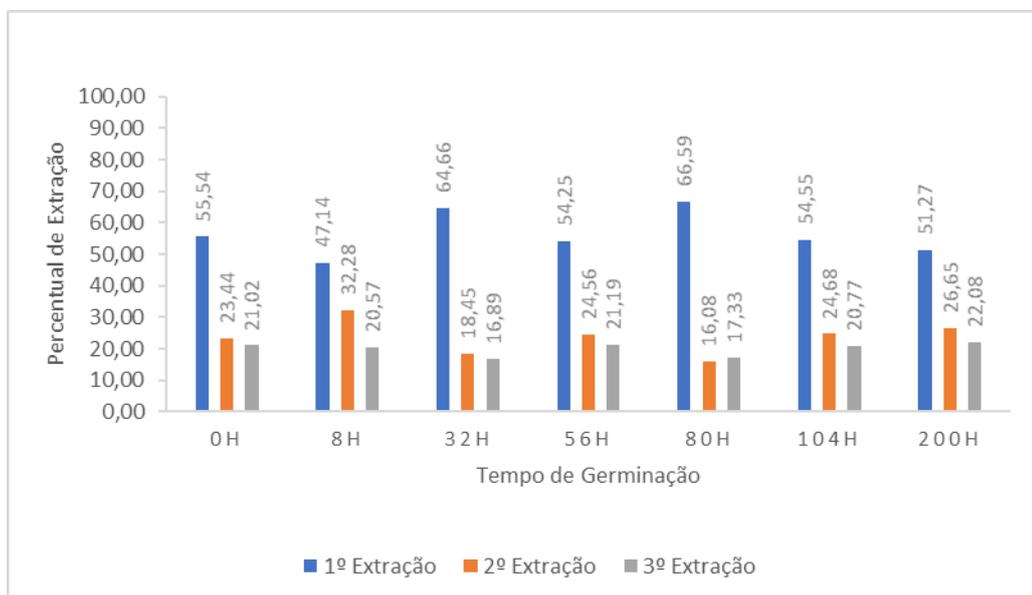
Foi possível verificar que os componentes flavonoides são potencialmente mais solúveis em meio aquoso do que em meio etanólico, e de forma mais expressiva do que a verificada para os compostos fenólicos totais. Este dado é interessante e positivo quando se considera a utilização destas matérias primas para a elaboração dos produtos comerciais a base de extratos aquosos dos grãos de soja. A análise das figuras 6 e 7 reforça ainda mais estes aspectos positivos, quando se alcança valores altos de extração já na primeira extração realizada.

Figura 6. Rendimento das extrações de flavonóides totais para o extrato aquoso a partir de grãos de soja (var. BRS 257) em diferentes tempos de germinação.



Fonte: Elaborado pela autora, 2017. Percentuais relativos ao total de composto extraído nas três extrações.

Figura 7. Rendimento das extrações de flavonóides totais para o extrato etanólico a partir de grãos de soja (var. BRS 257) em diferentes tempos de germinação.



Fonte: Elaborado pela autora, 2017. Percentuais relativos ao total de composto extraído nas três extrações.

Na comparação entre as figuras 6 e 7 observa-se que os dados indicam que podem estar sendo formados novos compostos de maior solubilidade em água, e que com maior facilidade de transferência para o meio aquoso do que para o meio etanólico, quando se verifica que ainda na terceira extração para os meios etanólicos se mantém a extração na faixa de 20% dos compostos totais extraídos (Figura 7), sendo que nos terceiros ciclos de extrações

em meios aquosos para os grãos germinados já praticamente não apresentaram compostos extraídos.

Nos estudos realizados por Bolanho (2010), a concentração de flavonóides totais nos grãos de soja *in natura* da cultivar BRS 267 foi de 0,943mg em equivalente de catequina (EQ)/g de amostra em base seca. O mesmo autor, ao comparar diferentes produtos oriundos da soja, incluindo o extrato hidrossolúvel de soja em pó adquirido no comércio local, encontrou valores de 0,555 a 0,714mg de EQ/g de amostra, o que indica uma grande concentração de compostos solúveis em água.

Ainda se considerando a possibilidade não só do aumento quantitativo dos componentes fenólicos, mas também sua maior disponibilidade para solubilizações, conforme discutido por Jiang, Cai, Xu (2013), na Figura 6 permite-se a observação da mudança no comportamento de solubilidade dos componentes flavonoides entre os grãos não germinados e germinados. No caso dos grãos não germinados observa-se uma menor taxa de solubilização na primeira extração (cerca de 54%) e que, ainda na terceira extração, seguiu-se solubilizando parte significativa dos flavonoides (32%), enquanto que para os grãos germinados praticamente já se haviam esgotados os compostos passíveis de extração no terceiro ciclo (Figura 6).

Uma das possibilidades de explicação para tais observações nestes perfis de solubilidade pode estar associada às observações realizadas por Gu et al (2017). Estes autores observaram ligeiro aumento de isoflavonas, uma das principais representantes do grupo dos flavonóides, durante o período de germinação, e indicam que seria coincidente com a alteração do perfil dos metabólitos secundários onde as isoflavonas são hidrolisadas enzimaticamente durante a germinação em angliconas de isoflavonas (genisteína, daidzeína), formas que são mais solúveis e facilmente absorvidas pelo organismo e podem estar positivamente relacionadas com a disponibilidade melhorada.

Nos estudos com a cultivar de soja Prosoy, realizados por Kumari, Chang (2016), houve aumento de 77%, no teor de flavonoides durante o período de germinação. Os autores reportaram esse aumento ao fato de obterem um aumento de 126% de daidzeína e 587% de genisteína.

Paucar-Menacho et al (2010), quando estudou farinhas germinadas obtidas da cultivar de soja BRS 258, identificou em suas amostras um teor de isoflavonas de 2,22mg/g de amostra para a farinha obtida de grãos não germinados. Destas, 0,23mg/g de amostra foram representados pelas frações de agliconas (daidzeína, glicitina e genisteína). Para as amostras germinadas, o teor de isoflavonas total variou de 2,33 para 2,95mg/g de amostra, indicando

um aumento no teor de isoflavonas. Relataram ainda que o maior aumento ocorreu quando a soja foi germinada por 63h a 30°C, chegando a 153,93%, e atribuem esse aumento à hidrólise dos glucosídeos durante o processo de imersão e germinação, que contribuiu para o aumento da genisteína em 205,84% na farinha obtida a partir de grãos germinados em relação à farinha obtida de grãos não germinados.

O teor de isoflavonas nos grãos de soja pode variar de acordo com a parte do grão analisada, segundo Quinhone-Junior, Ida (2014) quando estudaram o efeito da germinação na cultivar de soja BRS 284. Nas diferentes partes do grão (cotilédone e eixo embrionário), relataram que a glicidina não foi detectada nos cotilédones germinados e que até o período de 72h de germinação o teor de daidzeína e genisteína diminuíram 1,5 e 4,2 vezes, seguido de um aumento de 1,7 e 2,5 vezes entre 72 e 168h, respectivamente. Os autores sugerem que essa diminuição de daidzeína e genisteína pode estar associada a translocação destas isoflavonas dos cotilédones para o eixo embrionário. O teor total de isoflavonas nos cotilédones foram de 1,4 a 2,1 vezes maior após 72 e 168h de germinação, respectivamente. Para os eixos embrionários os autores determinaram uma diminuição de 1,6 vezes até o período de 120h de germinação, com aumento de 1,5 vezes até o período de 168h de germinação para a daidzeína.

Silva et al (2012), ao analisarem diferentes cultivares de soja (BRS 284, BRS 257, BRS 216 e BRS 267), em diferentes partes do grão, determinaram para a cultivar BRS 257 2,94mg de isoflavonas totais /g no grão inteiro, 18,67mg/g para o hipocótilo, 2,55mg/g para os cotilédones e 1,02mg/g para a casca. Os autores ressaltaram que esse maior conteúdo no hipocótilo, muitas vezes leva a indústria a utilizar apenas essa parte do grão para o processamento de produtos e que na casca não deveria conter isoflavonas, porém pelo fato do descasque mecânico não ser tão eficiente quanto o manual, partes do cotilédone e hipocótilos são transferidas para a casca. Os autores salientam ainda que essa transferência não é uma total desvantagem, já que as cascas são usadas como fonte de fibras. Para as formas glicosiladas, apresentaram na BRS 257 2,83mg/g para o grão inteiro, 18,37mg/g para o hipocótilo, 2,47mg/g para o cotilédone e 1,01mg/g para a casca. Para as formas agliconas, para a mesma cultivar, apresentam 0,11mg/g para o grão inteiro, 0,29mg/g para o hipocótilo, 0,08mg/g para cotilédone e 0,01mg/g para a casca.

5.5 Determinação do Potencial Antioxidante

Dentre os componentes fenólicos e flavonoides, há compostos que apresentam capacidades antioxidantes variáveis. A maior ou menor presença quantitativa destes

componentes nos extratos pode impactar no potencial antioxidante desses extratos, seja pela alteração da quantidade total, seja pela alteração da composição desse conjunto de componentes. A determinação de atividade antioxidante dos extratos foi realizada e seus resultados expressos nas tabelas 7 e 8.

Tabela 7. Atividade antioxidante de grãos de soja (var BRS 257) em diferentes tempos de germinação, com uso de reagente ABTS.

Tratamento	Tempo de Germinação (horas)	Atividade antioxidante (em μ mols de equivalente de trolox/g de grãos)			
		Extrato Aquoso		Extrato Etanólico	
		Base Úmida	Base Seca	Base Úmida	Base Seca
1	0	30,37 ^a \pm 0,51	33,89 ^{efd} \pm 0,46	22,04 ^a \pm 0,53	24,60 ^{fe} \pm 0,59
2	8	10,06 ^g \pm 0,13	24,39 ^g \pm 0,26	11,45 ^{fg} \pm 0,17	27,77 ^{efd} \pm 0,42
3	32	20,54 ^{cb} \pm 1,09	48,86 ^{acb} \pm 2,12	17,94 ^{bc} \pm 0,17	42,68 ^{acb} \pm 0,4
4	56	13,95 ^{de} \pm 0,4	30,69 ^{fe} \pm 0,73	10,81 ^{gf} \pm 0,39	23,78 ^{gfe} \pm 0,86
5	80	15,47 ^{cd} \pm 0,13	38,05 ^{de} \pm 0,27	17,02 ^{cbde} \pm 1,22	41,85 ^{cab} \pm 2,99
6	104	22,06 ^{bc} \pm 1,31	42,85 ^{cab} \pm 2,07	16,14 ^{dce} \pm 0,64	31,33 ^{de} \pm 1,25
7	200	15,82 ^{def} \pm 0,88	44,85 ^{bca} \pm 2,03	14,90 ^{ed} \pm 0,42	42,22 ^{bca} \pm 1,2

Fonte: Elaborada pela autora, 2017. Valores expressos como média \pm desvio padrão. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si ao nível de significância de 5%, pelo teste de Tukey.

Considerando a atividade antioxidante presente nos extratos aquosos expressa em base úmida, com o uso do ABTS para os diferentes tempos de germinação, vê-se pela Tabela 7 acima que o grão sem germinar apresentou a maior atividade antioxidante. Entretanto, quando se expressam os resultados em base seca, observa-se que a máxima atividade antioxidante se associa ao tempo de 32h de germinação, voltando aos níveis do tempo 0h nos tempos de 56 e 80h, e elevando-se novamente ao máximo nos tempos de 104 e 200h de germinação.

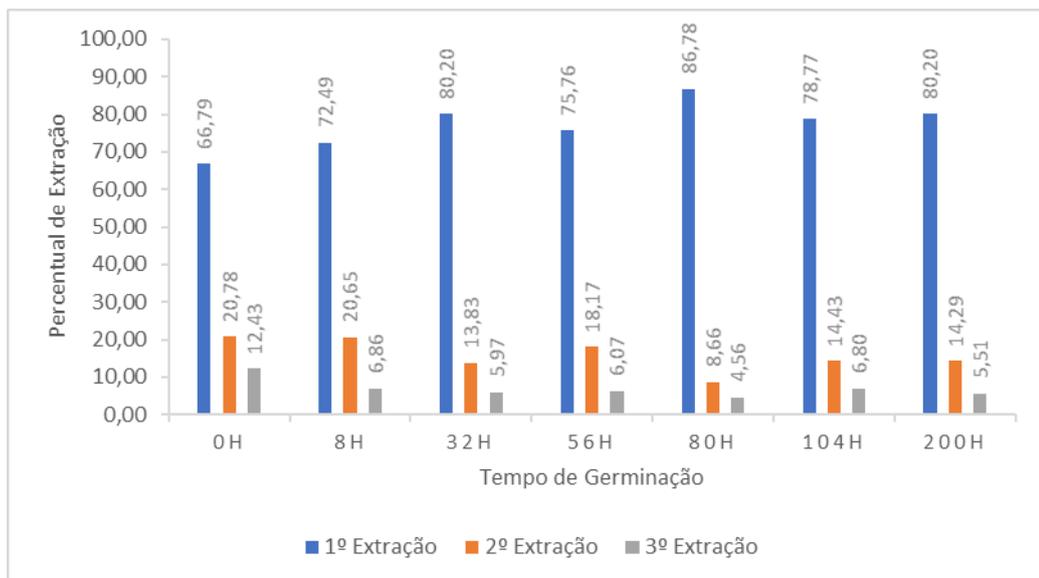
Tratando-se dos extratos etanólicos, observa-se pelos valores expressos em base úmida que a maior atividade antioxidante se associa ao grão sem germinar (tempo 0h), oscilando nos demais tempos, mas mantendo-se em níveis inferiores ao tempo 0h. Provavelmente isso é reflexo do menor teor de umidade da amostra relativa ao grão sem germinar, quando comparada com os grãos germinados, apresentando uma maior concentração de compostos antioxidantes por uma mesma unidade de massa. Expressando os resultados em base seca observa-se mudança deste perfil, com uma oscilação de valores ao longo do tempo de germinação, atingindo um nível máximo no tempo de 32h, decaindo no tempo de 56h ao nível do tempo 0h, aumentando na sequência – mas sem ultrapassar o nível máximo já atingido no

tempo de 32h. Esses resultados para os extratos etanólicos confirmam o observado para o extrato aquoso, ou seja, o máximo da atividade antioxidante nos extratos ocorreu com 32h de processo de germinação.

A água participa de todos os processos metabólicos estando presente em maior ou menor concentração, dependente do local e da reação que esteja ocorrendo, quando ocorre a quebra dos nutrientes de reserva há um acúmulo de solutos nos cotilédones e aumento de massa seca no eixo embrionário (MOREIRA, 2015). Partindo do princípio que os compostos com potencial antioxidante são majoritariamente representados pelos compostos fenólicos e estes fazem parte do sistema de defesa e crescimento das plantas e acumulam-se nos tecidos embrionários (NACZK, SHAHIDI, 2004; MOREIRA, 2015), levanta-se a hipótese de que a partir do tempo 32h, com o surgimento do eixo embrionário e aumento da massa seca nesse eixo, favorece o aumento dos compostos com potencial antioxidante.

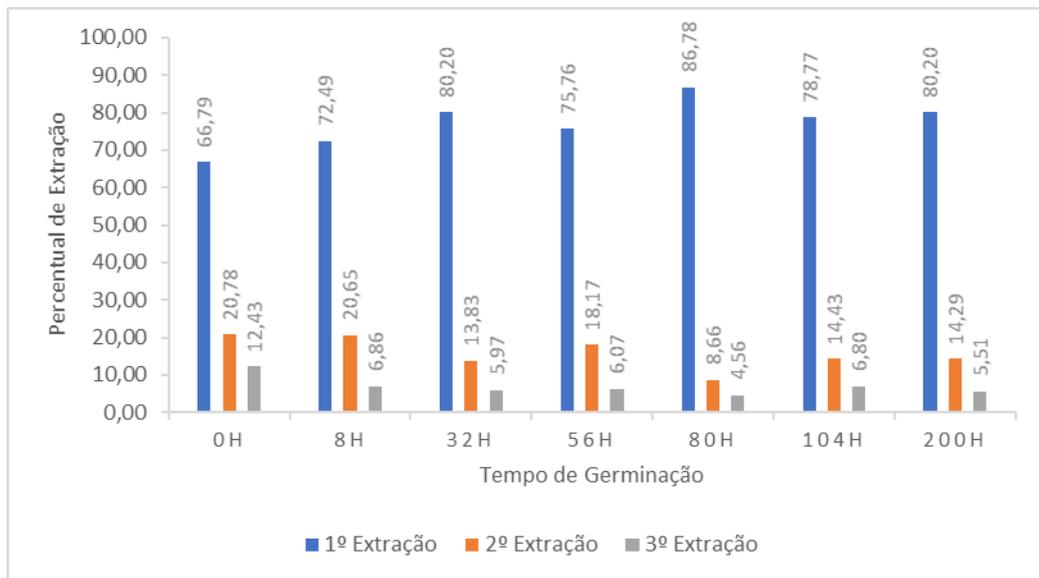
As figuras 8 e 9, indicam que os componentes responsáveis pela atividade antioxidante dos extratos são facilmente solubilizáveis em meios aquosos e etanólicos, sendo as maiores detecções alcançadas logo nas primeiras extrações para todos os tempos de germinação e meios extratores.

Figura 8. Atividade antioxidante de grãos de soja (var BRS 257) em diferentes tempos de germinação, com uso de reagente ABTS⁺.



Fonte: Elaborado pela autora, 2017. Percentuais relativos ao total de composto extraído nas três extrações.

Figura 9. Rendimento das extrações para determinação do potencial antioxidante, para o extrato etanólico, pelo método ABTS⁺



Fonte: Elaborado pela autora, 2017. Percentuais relativos ao total de composto extraído nas três extrações.

Quando os ensaios de atividade antioxidante foram realizados com uso de reagente DPPH, somente os extratos etanólicos foram possíveis de serem submetidos ao ensaio, ao contrário do ensaio que se utiliza de ABTS, já que no ensaio com uso de DPPH a proporção de amostra a ser utilizada na reação é cerca de 10 vezes superior, com suas características impactando muito mais no ensaio – ou seja, a turbidez da amostra de extrato aquoso foi um fator interferente na metodologia impedindo a passagem de luz no espectrofotômetro e impossibilitando uma leitura real. Acredita-se que os resultados para os potenciais investigados no extrato aquoso apresentariam comportamento similar aos determinados com o uso do ABTS⁺. Sendo assim, na Tabela 8 são apresentados os dados referentes apenas às atividades antioxidantes dos extratos etanólicos.

Tabela 8. Atividade antioxidante de grãos de soja (var BRS 257) em diferentes tempos de germinação, com uso de reagente DPPH.

Tratamento	Tempo de Germinação (horas)	Atividade antioxidante (em μmols de equivalente de trolox/g de grãos)	
		Extrato Etanólico	
		Base Úmida	Base Seca
1	0	$2,10^a \pm 0,01$	$2,34^f \pm 0,01$
2	8	$0,81^g \pm 0,03$	$1,97^g \pm 0,08$

3	32	1,20 ^{efd} ± 0,03	2,84 ^{dec} ± 0,07
4	56	1,16 ^{fed} ± 0,06	2,54 ^{ed} ± 0,13
5	80	1,73 ^{bc} ± 0,06	4,25 ^a ± 0,16
6	104	1,60 ^{cd} ± 0,03	3,11 ^{cd} ± 0,07
7	200	1,28 ^{def} ± 0,06	3,62 ^b ± 0,16

Fonte: Elaborada pela autora, 2017. Valores expressos como média ± desvio padrão. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si ao nível de significância de 5%, pelo teste de Tukey.

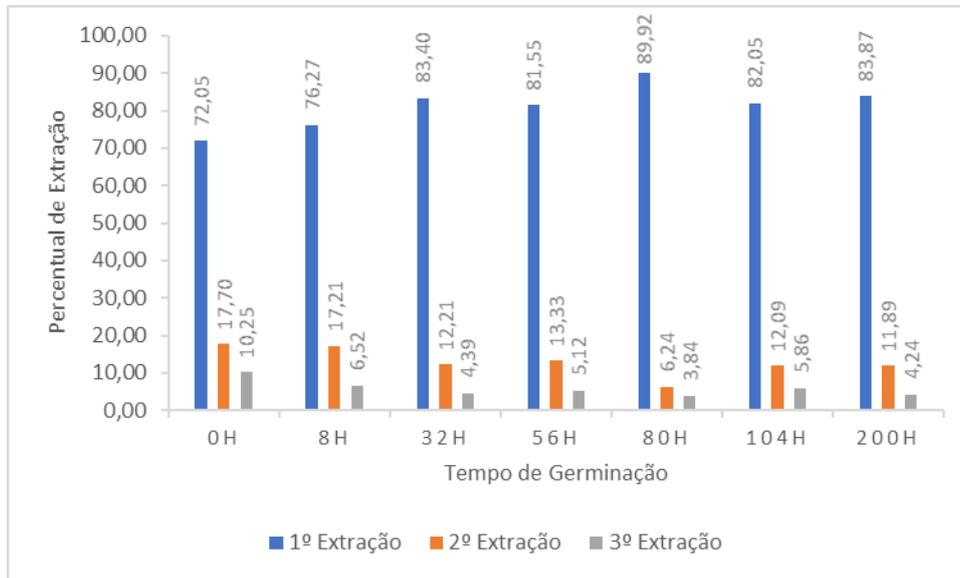
Em termos de atividade antioxidante com o uso do DPPH, para os extratos etanólicos com os dados expressos em base úmida o resultado relativo ao tempo 0h apresentou significativamente o maior nível de atividade antioxidante (Tabela 8), o que confirma o encontrado nos resultados dos extratos etanólicos utilizando-se o ABTS, influenciado pelo menor teor de umidade da amostra. Os resultados expressos em base seca indicam que, em relação ao tempo 0h, a atividade antioxidante diminui no tempo 8h e depois aumenta significativamente, alcançando um máximo com 80h de germinação. Esses resultados indicam o efeito da germinação no aumento da atividade antioxidante dos extratos, mas com o uso do DPPH foi encontrada atividade antioxidante máxima no tempo de 80h e não no tempo de 32h como o observado com o uso do ABTS.

Os ensaios com DPPH se mostram menos sensíveis do que o ensaio realizado com uso de ABTS, conforme se observa pelos valores apresentados nas Tabelas 7 e 8. Embora sejam inferiores aos valores da Tabela 7, ainda apresentam a mesma tendência de aumento para as amostras a partir do terceiro tempo de germinação.

Xu, Chang (2007), ao analisarem grãos de soja amarela e preta, encontraram teores de 1,96 e 13,39 μmol de equivalentes de Trolox/g de amostras em base seca, respectivamente. Bolanho (2010) apresentou resultados de 3,5 a 4,4 $\mu\text{mol/g}$ de amostra em base seca para os extratos aquosos em pó comerciais. Valores próximos aos aqui observados (Tabela 8).

Os perfis de extração expressos na figura 10 também reforçam que os componentes com atividade antioxidante das amostras são facilmente extraídos, com altos teores já obtidos na primeira extração.

Figura 10. Rendimento das extrações para determinação do potencial antioxidante, para o extrato etanólico, pelo método DPPH.



Fonte: Elaborado pela autora, 2017. Percentuais relativos ao total de composto extraído nas três extrações.

Para uma melhor visualização dos potenciais antioxidantes dos compostos encontrados nos extratos de soja nos diferentes tempos de germinação, foram expressos os índices PAOXI e FLAOXI, quando de fato se expressa o potencial antioxidante por massa de compostos fenólicos totais ou flavonoides (Tabela 9).

Tabela 9. Índice de atividade antioxidante de fenólicos e flavonoides dos extratos aquosos e etanólicos de grãos de soja (var BRS 257) em diferentes tempos de germinação em μmols em equivalente de Trolox/g de composto.

Tratamento	Tempo de Germinação (horas)	PAOXI*		FLAOXI**	
		Extrato Aquoso	Extrato Etanólico	Extrato Aquoso	Extrato Etanólico
1	0	16,69	16,70	16,29	20,99
2	8	8,71	18,17	6,11	20,09
3	32	9,62	18,69	5,88	21,61
4	56	9,87	17,16	6,33	20,02
5	80	9,33	18,50	7,15	22,69
6	104	12,24	18,13	16,80	21,24
7	200	9,06	16,20	5,94	16,93

Fonte: Elaborado pela autora, 2017. *PAOXI = Índice de atividade antioxidante de fenólicos (atividade antioxidante com uso de ABTS/Total de compostos fenólicos em 1 grama de grãos); FLAOXI = Índice de atividade antioxidante de flavonóides (atividade antioxidante com uso de ABTS/Total de compostos flavonóides em 1 grama de grãos).

De acordo com os índices expressos na Tabela 9, pode-se observar que, de maneira geral, os compostos presentes nos extratos aquosos dos grãos após sua germinação apresentavam um potencial antioxidante inferior ao dos grãos não germinados, com exceção apenas para o potencial do conjunto dos flavonoides presentes no extrato do tratamento 6 de germinação (104 h de germinação), que se apresentou levemente acima do índice dos extratos de grãos não germinados (16,80 contra 16,29, respectivamente). Outra observação interessante é com relação aos valores alcançados pelos extratos etanólicos, embora o foco deste trabalho seja o perfil dos extratos aquosos (material para possível elaboração de produto alimentício). Como observado na Tabela 9, os valores obtidos para os índices dos extratos etanólicos foram todos superiores aos encontrados para os extratos aquosos. Considerando-se o já anteriormente observado para os resultados de quantidades de componentes fenólicos e flavonoides nos extratos (Tabela 5 e 6), quando existia uma tendência para valores mais baixos de totais de componentes extraídos em solução aquosa, pode-se considerar estes dados dos índices expressos na Tabela 9, como indicativos de que aqueles compostos extraídos pelo meio etanólico são mesmo qualitativamente diferentes daqueles extraídos em meio aquoso, ou seja, embora o etanol tenha extraído menos compostos, este meio foi mais seletivo para os componentes que de fato apresentavam potencial antioxidante. Esta observação é reforçada pelos dados da Tabela 10, onde os dados de correlações entre os resultados apresentados foram reunidos.

Tabela 10. Correlações entre os componentes fenólicos e atividades antioxidantes para os extratos aquosos e etanólicos de soja BRS 257.

		r***	p****
Extrato aquoso	Fenólicos X Flavonóides b.u.*	0,560081	0,1910
	<u>Fenólicos X Flavonóides b.s.**</u>	<u>0,897698</u>	<u>0,0061</u>
	FenólicosX ABTS b.u.*	0,677497	0,0945
	<u>Fenólicos X ABTS b.s.**</u>	<u>0,792002</u>	<u>0,0338</u>
	Flavonóides X ABTS b.u.*	-0,03621	0,9386
	Flavonóides X ABTS b.s.**	0,563591	0,1876
Extrato Etanólico	<u>Fenólicos X Flavonóides b.u.*</u>	<u>0,966519</u>	<u>0,0004</u>
	<u>Fenólicos X Flavonóides b.s.**</u>	<u>0,978345</u>	<u>0,0001</u>

Fenólicos X ABTS b.u.*	0,97398	0,0002
Fenólicos X ABTS b.s.**	0,9661	0,0004
Flavonóides X ABTS b.u.*	0,918141	0,0035
Flavonóides X ABTS b.s.**	0,913487	0,004
Fenólicos X DPPH b.u.*	0,8494	0,0156
Fenólicos X DPPH b.s.**	0,757545	0,0486
Flavonóides X DPPH b.u.*	0,7395	0,0575
Flavonóides X DPPH b.s.**	0,65664	0,1091

Fonte: Elaborada pela autora, 2017. * b.u. = base úmida, ** b.s. = base seca, *** r= coeficiente de correlação, **** p= nível de significância (significativo se $p < 0,05$).

Os dados de correlações expressos na Tabela 10 demonstraram que os dados de extratos etanólicos são significativamente superiores aos dos extratos aquosos. Em verdade, quando os extratos aquosos de soja foram analisados, somente se pode estabelecer uma correlação quando a atividade antioxidante é considerada para a relação entre os dados de fenólicos totais e ABTS em base seca ($r=0,7920$ e $p=0,0338$). Para as demais, os valores de p foram superiores a 0,05.

Ressalta-se que o extrato aquoso tem um potencial de solubilização de outros componentes solúveis em água, como proteínas que podem de fato conter componentes fenólicos, aminoácidos de cadeia lateral aromática (que não apresentariam a mesma capacidade de ação antioxidante do que outros compostos fenólicos), e as próprias isoflavonas já citadas anteriormente.

6 CONCLUSÃO

Os resultados desse trabalho demonstraram que o processo de germinação da cultivar de soja BRS 257, que já é uma soja com característica melhorada para atender à indústria de alimentos por se tratar de uma cultivar livre de lipoxigenase, pode ser uma matéria prima em potencial para o desenvolvimento de novos produtos, e que esse processo foi refletido para o extrato aquoso em sua forma bruta (sem processamento prévio), haja vista que o processo de germinação claramente altera o perfil de componentes dos grãos.

As proteínas tiveram seus perfis de extrabilidade aumentado e os resultados indicam que houve uma pré-hidrólise dessas proteínas aumentando o número de ligações peptídicas rompidas, provavelmente colaborando para esse aumento de percentual de solubilização.

Compostos bioativos que antes não eram considerados e atualmente são, por apresentarem inúmeros benefícios para a saúde (como os compostos fenólicos, flavonóides e compostos com potenciais antioxidantes) também foram aumentados pelo processo de germinação, refletindo no extrato aquoso que apresentou aumento na concentração desses componentes.

Os resultados obtidos por esse trabalho, representam uma base para estudos futuros objetivando o melhoramento e inovação de produtos alimentares, obtidos a partir de extrato aquoso de soja germinada, podendo fixar o tempo de germinação para novos estudos em 32h.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLERCREUTZ, H; et al. Urinary excretion of lignans and isoflavonoid phytoestrogens in Japanese men and women consuming a traditional diet. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 54, p. 1093-1100, 1991.

AHN, C.B., KIM, J.G., JE, J.I. Purification and antioxidant properties of octapeptide from salmon byproduct protein hydrolysate by gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, v.147, p.78-83, 2014.

AKESON, W.R.; STAHPMAN, M.A.A. Pepsin-pancreatin digest index of protein quality evaluation. **Journal of Nutrition**, v.83, p.257-61, 1964.

ANDERSON, J.J.B.; et al. Health potential of soy isoflavones for menopausal women. **Public Health Nutrition**, v.2, p. 489-504, 1999.

BARBOSA, A. C. L. et al. Teores de isoflavonas e capacidade antioxidante da soja e produtos derivados. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 26, n. 4, p. 921-926, 2006.

BAVIA, A. C. F. et al. Chemical composition of tempeh from soybean cultivars specially developed for human consumption. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.32, n.3, p.613-620, jul. -Set. 2012.

BELÉIA, A.; IDA, E. I.; LETHI, T. T. Distribuição de fosforo e ácido fítico durante o processamento de extrato hidrossolúvel de soja. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v.33, n.4, p. 623-629, 1990.

BENASSI, V. T.; MANDARINO, J. M. G. Extrato de soja e produtos derivados. Centro Nacional de Pesquisa de Soja, **EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**, v. 7, Nov., 2003

BENASSI, V. T.; VARÉA, G. S.; PRUDENCIO, S. H. Tofus de diferentes cultivares de soja: Perfil sensorial e correlação com as medidas instrumentais e de composição química. **Alimentos e Nutrição**. Araraquara. v. 23, n. 4, p. 555-565, Out/Dez. 2012.

BEWLEY, J. D. J.; BLACK, M. Seeds: Physiology of development and germination. **New York: Plenum Press**. 367p. 1985

BOATENG, J. et al. Effect of processing on antioxidant contents in selected dry beans (*Phaseolus* spp. L.). **Food Science and Technology (LWT)**, v. 41, p. 1541-1547, 2008.

BOLANHO, B. C. **Compostos bioativos e potencial antioxidante em derivados de soja**. Dissertação-Universidade Estadual de Londrina. 86 f, 2010.

BORDINGNON, J. R.; MANDARINO, J. M. G. Soja: composição química, valor nutricional e sabor. Londrina: **Embrapa**, 1994.

BOWLES, S.; DEMIATE, I. M. Caracterização Físico-Química de *Okara* e Aplicação em Pães do Tipo Francês. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**. Campinas, v. 26, n. 3, p. 652-659, 2006.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRANCO, I. G; et al. Avaliação da Aceitabilidade Sensorial de uma Bebida à Base de Extrato Hidrossolúvel de Soja, Polpa de Morango e Sacarose. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 9, n. 1, Jan/Jun. 2007.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRASIL, Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretária de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: MAPA/ACS. P. 395-399, 2009.

BRASIL, **Resolução CNNPA nº 14 de 28 de Junho de 1978**. Disponível em: <www.anvisa.gov.br> Acesso em 05. Jun.2017.

BRASIL, Ministério da Saúde-Agência Nacional de Vigilância em Saúde-ANVISA- **Portaria nº 398, de 30 de abril de 1999**, Diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/1999/prt0398_30_04_1999.html> Acesso em: 06. Jun.2017

BRASIL, Ministério da Saúde; ANVISA-Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. **Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e/ou de Saúde. Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos-IX Lista de alegações de propriedade funcional aprovada, 2008**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>. Acesso em: 18 Jun. 2017.

CABRERA-OROZCO, A.; JIMÉNEZ-MARTÍNEZ, C.; DÁVILA-ORTIZ, G. Soybean: Nonnutritional factors and their biological functionality. In **H. A. El-Shemy (Ed.), Soybean-bio-active compounds** p. 387–410. Croatia: InTech, 2013

CANTELLI, K. C., et al. Brotos de linhagens genéticas de soja: avaliação das propriedades físico-químicas. **Brazilian Journal of Food Technology**, v, 20, e2016074, 2017.

CARBONATO, M. et al. Perspectives into factors limiting in vivo digestion of legume proteins: Antinutritional compounds or storage proteins? **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Easton, v. 48, p. 742-749, 2000.

CARRÃO-PANIZZI, M. C.; SIMÃO, A. S.; KIKUCHI, A. Efeitos de genótipos, ambientes e de tratamentos hidrotérmicos na concentração de isoflavonas agliconas em grãos de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 8, p. 897-902, 2003.

CARRÃO-PANIZZI, M. C.; MANDARINO, J. M. G. Soja: Potencial de Uso na Dieta Brasileira. Londrina: **Embrapa**, 1998.

CHEN, Y.; CHANG, S. K. C. Macronutrients, phytochemicals, and antioxidant activity of soybean sprout germinated with or without light exposure. **Journal of Food Science**, v. 80(6), p.1391–1398, 2015.

CHURCH, F. C. et al. Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. **Journal of Dairy Science**, n.66, p.1219-27, 1983.

CIABOTTI, S.; et al. Chemical composition, protein profile, and isoflavones content in soybean genotypes with different seed coat colors. **International Food Research Journal**, v. 23, p. 621-622, 2016.

CLARKSON, T. B.; ANTHONY, M. S.; HUGHES, C. L. Estrogenic soybean isoflavones and chronic disease Risks and benefits. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 6, p. 11-16, 1995.

COOK, N. C.; SAMMAN, S. Flavonoids chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 7, p. 66-76, 1996.

COUTINHO, V. F.; MENDES, R. R.; ROGERO, M. M. **Bioquímica de metabolismo de proteínas e aminoácidos**. In: SILVA, S. M. S.; MURA, J. D. P. Tratado de alimentação, nutrição e dietoterapia. São Paulo: Ed. Roca, cap. 1: p. 3-20, 2007.

COWARD, L.; SMITH, M.; KIRK, M.; BARNES, S. Chemical modification of isoflavones in soyfoods during cooking and processing. **Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 68, p. 1486S-91S, 1998.

DA SILVA, J. B.; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; PRUDÊNCIO, S. H. Chemical and physical composition of grain-type and Food-type soybean for Food processing. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 7, p. 777-784, 2009.

DIA, Vermont P., et al. Bowman-Birk and Kunitz Protease Inhibitors among Antinutrients and Bioactives Modified by Germination and Hydrolysis in Brazilian Soybean Cultivar BRS 133. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 60, p. 7886-7894, 2012.

DUARTE, Luiz J. V. **Alimentos Funcionais**. Porto Alegre, RS: Artes e Ofícios, 2006

EL-ADAWY, T. Nutritional composition and antinutritional factors of chickpeas (*Cicer arietinum* L.) undergoing different cooking methods and germination. **Plant Foods for Human Nutrition**, v, 57, p, 83-97, 2002.

EMBRAPA- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Embrapa soja. Avaliação tecnológica, sensorial e nutricional de extratos de soja para alimentação humana, **Projetos: Embrapa Agroindústria de Alimentos**, 2013. Disponível em: <www.embrapa.br>; Acesso em: 29. Abr. 2017.

EMPSON, K. L.; LABUZA, T. P.; GRAF, E. Phytic Acid as a Food Antioxidant. **Journal of Food Science**. v. 56, p. 560-563, ed. 2, 1991.

ENGEL, V.L.; POGGIANI, F. Estudo da concentração de clorofila nas folhas e seu espectro de absorção de luz em função do sombreamento em mudas de quatro espécies florestais nativas. **Revista Brasileira de Fisiologia**, Londrina, v.3, n. 1, p.39-45, 1991.

FERRARI, R.A.; DEMIATE, I.M. Soybean isoflavones – a short review. **Biological Health Science**, v. 7, p. 39-46, 2001.

FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Org) **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004.

FIESP-Federação das Indústrias de São Paulo, Safra Mundial de Soja. **Informativo-DEAGRO**, Ed. Jul/2017. Disponível em: <http://www.fiesp.com.br/indices-pesquisas-e-publicacoes/safra-mundial-de-soja/attachment/boletim_soja_julho2017/>. Acesso em: 26 Jul. 2017.

FRITZ, K. L. et al. The *in vivo* antioxidant activity of soybean isoflavones in human subjects. **Nutrition Research**, v. 23, n. 4, p. 479-487, 2003.

GRAF, E.; EATON, J. W. Antioxidant functions of phytic acid. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 8, p. 61-69, ed. 1, 1990.

GU, E. J. et al. Mass-based metabolomic analysis of soybean sprouts during germination. **Food Chemistry**, v. 217, p. 311-319, 2017.

GUAJARDO-FLORES, D.; SERNA-SALDÍVAR, S. O.; GUTIÉRREZ-URIBE, J. A. Evaluation of the antioxidant and antiproliferative activities of extracted saponins and flavonols from germinated black beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food Chemistry**, v. 141, p. 1497-1503, 2013.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4. Ed. Oxford: Clarendon Press, 2007.

HE, F.J.; CHEN, J.Q. Consumption of soybean, soy foods, soy isoflavones and breast cancer incidence: Differences between Chinese women and women in Western countries and possible mechanisms. **Food Science and Human Wellness**, v.2, p.146-161, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fshw.2013.08.002>>. Acesso em: 24. Jun. 2017.

HELPERICH, B. Dietary estrogens: A balance of risk and benefits. **International Food Technology**, v. 50, n. 9, p. 158, 1996.

- HERMAN, E. Soybean allergenicity and suppression of the immunodominant allergen. **Crop Science**. V. 45, p. 462-467, 2005.
- IZUMI, T.; et al. An efficient preparation of acetyl isoflavone glucoside. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 45, n.10, p. 1593-1595, 1997.
- JIANG, S.; CAI, W.; XU, B. Food quality improvement of soy milk made from short-time germinated soybeans. **FOODS**, v. 2, p. 198-212, 2013.
- KAKADE M.L., et al. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: a collaborative analysis of an improved procedure. **American Association of Cereal Chemistry**, v.51, p. 376-382, 1974.
- KHOLE, Swati; et al. Bioactive constituents of germinated fenugreek seeds with strong antioxidant potential. **Journal of Functional Foods**, v. 6, p. 270-279, 2014.
- KIM, E. H., et al. Analysis of phenolic compounds and isoflavones in soybean seeds (*Glycine max* (L.) Merrill) and sprouts grown under different conditions. **Eur Food Res Technol**. v. 222, p. 201-208, 2006.
- KIM, H. T. et al. Mobilization of storage proteins in soybean seed (*Glycine max* L.) during germination and seedling growth. **Bioch. Bioph Acta**. v. 1814, p. 1178-1187, 2011.
- KIM, S. L. et al. Introduction and nutritional evaluation of germinated soy germ. **Food Chemistry**. v. 136, p. 491-500, 2013.
- KNIGHT, D. C.; EDEN, J. A. A review of the clinical effects of phytoestrogens. **Obstetric Gynecology**, v. 87, p. 897-904, 1996.
- KUBOTA, M. et al.; Improvement in the *in vivo* digestibility of rice protein by alkali extraction is due to structural changes in prolamin/protein body-I particle. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 74, n. 3, p. 614-619, 2010.
- KUMARI, S.; CHANG, S. K. Effect of cooking on isoflavones, phenolic acids, and antioxidant activity in sprouts of Prosoy soybean (*Glycine max*). **Journal Food Science**. v. 81, n. 7, 2016.
- KURZER, M.S. Hormonal effects of soy isoflavones: studies in premenopausal and postmenopausal women. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 660-661, 2000.
- KUSKOSKI, E. M. et al. Aplicação de diversos métodos químicos para determinar atividade antioxidante em polpa de frutas. **Ciência e Tecnologia do Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 726-732, 2005.
- LABORIAU, L. G. **A Germinação das sementes**, Serie de Biologia, p. 171-1714, ed. 24, Editora: OEA, Washington, 1983.
- LAILA, O.; MURTAZA, I. Seed sprouting: A way to health promoting treasure. **International Journal of Current Research and Review**, v. 6(23), p. 70-74, 2014.
- LIENER, I.E. Implications of antinutritional components in soybean foods. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. Boca Raton, v.34, n.1, p.31-67, 1994.

- LIENER, I.E. The nutritional significance of the plant lectins. In: Ory, R.L. Antinutrients and natural toxicants in foods. **Westport: Food & Nutrition Press**. p.143-157. 1981.
- LIMA, A. L. de. Produção de brotos de Fabaceae para o consumo humano. 117 p. **Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos)** – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.
- LIMA, E.C.S.; CARDOSO, M.H. Bebida de Soja (*Glycine Max*) e Acerola (*Malpighia Punicifolia*) enriquecida com cálcio. **Alimentos e Nutrição**, v.23, p.549-553, 2012.
- LIN, P. Y.; LAI, H. M. Bioactive compounds in legumes and their germinated products. **Journal of Agricultural of Food Chemistry**, v, 54, p, 3807-3814, 2006.
- LIU, Bengo; et al. Nutritional evaluation and antioxidant activity of sesame sprouts. **Food Chemistry**, v. 129, p. 799-803, 2011.
- LIU, K. Current constraints in soybean Food utilization and efforts to overcome them. In: **World Soybean Research Conference**, 6., 1999, Chicago. Proceedings. Chicago, p. 409-418, 1999.
- LIU, K. Food Use of Whole Soybeans. In: Johnson. L.; White. P.; P.; Galloway, R. (eds). Soybeans: chemistry, production, processing, and utilization. **AOCS Press**, Urbana, 2008.
- LIU, K., Soybeans chemistry, technology and utilization. **Gaithersburg: Aspen Publisher**, p. 532, 1999.
- LÓPEZ-AMORÓS, M. L.; HERNÁNDEZ, T.; ESTRELLA, I. Effect of germination on legume phenolic compounds and their antioxidant activity. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n. 4, p. 277-283, 2006.
- MA, L. et al. Evaluation of the chemical quality traits of soybean seeds, as related to sensory attributes of soymilk. **Food Chemistry**, v. 173, p. 694-701, 2015.
- MADHAVI, D. L.; DESHPANDE, S. S.; SALUNKHE, D. K. Food Antioxidants: technological, toxicological and health perspectives. **New York: Marcel Dekker**, 1995.
- MALASEV, D.; KUNTIC, V. Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 72, n. 10, p. 921-939, 2007.
- MANION, B.; CORREDIG, M. Interactions between whey protein in isolate and soy protein fractions at oil-water interfaces: effects of heat and concentration of protein in the aqueous phase. **Journal of Food Science**. V. 71, p. 343-349, 2006.
- MARIN, M.; et al. Caracterização físico-química e sensorial de bebida proteica de soja. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamentos de Alimentos**, v.32, p.93-104, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5380/cep.v32i1.36930>>. Acesso em 08. Jul. 2017.
- MARTINEZ, A. P. C., et al. Alterações químicas em grãos de soja com a germinação. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 31 (1), 23-30, Campinas, Jan-Mar, 2011.

MARTINS, C. R.; LOPES, W. A.; ANDRADE, J. B. Solubilidade das substancias orgânicas. **Química Nova**, v. 38, n. 8, São Paulo, 2013.

MARUATONA, G. N.; Duodu, K. G.; MINNAAR, A. Physicochemical, nutritional and functional properties of marama bean flour. **Food Chemistry**, Barking, v. 121, p. 400-405, 2010.

MONTEIRO, M. R. P.; et al. Qualidade proteica de linhagens de soja com ausência do inibidor de tripsina Kunitz e das isoenzimas lipoxigenase. **Revista Nutrição**, v. 17, n. 195, p. 205, 2004.

MORAIS, A. A. C.; SILVA, A. L. **Soja: Suas aplicações**. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica, 259 p. 1996.

MOREIRA, A. V. B.; MANCINI-FILHO, J. Influence of spices phenolic compounds on lipoperoxidation and lipid profile of rats tissues. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 17, n. 4, p. 411-424, 2004.

MOREIRA, T. B. **Quantificação de fluxos metabólicos ao longo da germinação e crescimento inicial de *Glycine max* (L.) Merr. (Fabaceae)**, Dissertação (Mestrado), 89f- Universidade de Brasília, Instituto de Biologia, Departamento de Botânica, 2015.

MUNHOZ, C. L.; et al. Elaboração de sorvete de soja e de uma cobertura crocante a partir de *okara*. **Ambiência-Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais**. v. 6, n. 3, Set/Dez. 2010.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography**, v. 95, p. 1054, 2004.

NICOLI, M. C.; ANESE, M.; PARPINEL, M. Influence of processing on the antioxidant properties of fruit and vegetables. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 10, n. 3, p. 94-100, 1999.

NONOGAKIA, H.; BASSEL, G. W.; BEWLEY, J. D. Germination-Still a mystery. **Plant Science**. v. 179, p. 574-581, 2010.

OLIVEIRA, M. A.; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; MANDARINO, J. M. G.; LEITE, R. S. Produção de brotos de soja utilizando a cultivar BRS 216: Caracterização físico-química e teste de aceitabilidade. **Journal of Food Technology**, Campinas, v. 16, n. 1, p. 34-41, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1981-67232013005000009>>. Acesso em: 09. Jul.2017.

PAJAK, P.; et al. Phenolic profile and antioxidant activity in selected seeds and sprouts. **Food Chemistry**, v. 143, p. 300-306, 2014.

PASCUAL-TERESA, et al. Absorption of isoflavones in humans: effects of food matrix and processing. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 17, p. 257-264, 2006.

PASKO, Pawel; et al. Anthocyanins, total polyphenols and antioxidant activity in amaranth and quinoa seeds and sprouts during their growth. **Food Chemistry**, v. 115, p. 994-998, 2009.

- PAUCAR-MENACHO, L. M. et al. Effect of time and temperature on bioactives compounds in germinated Brazilian soybean cultivar BRS 258. **Food Research International**. v. 43, p. 1856-18-65, 2010.
- PAULA, J. do N. L. M. de. **O uso do inibidor de α -amilase de trigo 053 no controle de bruquídeos**. 2006. 87f. Dissertação. (Mestrado em Ciências) -Departamento de Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, Brasília, 2006.
- PAULETTO, B. F.; FOGAÇA, A. O. Avaliação da Composição Centesimal de Tofu e *Okara*. **Disciplinarum Scientia. Série: Ciências da Saúde**, Santa Maria, v. 13, n. 1, p. 85-95, 2012.
- PEREIRA, M.P.; TAVANO, O.L. Use of different spices as potential natural antioxidant additives on cooked beans (*Phaseolus vulgaris*). Increase of DPPH radical scavenging activity and total phenolic content. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 69, p. 337–343, 2014.
- PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1035, 2000.
- POMPELLA, A. Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation. **International Journal of Vitamin and Nutrition Research**, v.67, n. 5, p. 289-297, 1997.
- POPINIGIS, F. **Fisiologia de sementes**. 2º ed. Brasília, s. e. 289p. 1985.
- PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4290-4302, 2005.
- QUINHONE-JUNIOR, A.; IDA, E. L. Isoflavones of the soybean components and the effect of germination time in the cotyledons and embryonic axis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 62, p. 8452-8459, 2014.
- RAMÍREZ-CÁRDENAS, L., LEONEL, A. J., COSTA, N. M. B. Efeito do processamento doméstico sobre o teor de nutrientes e de fatores antinutricionais de diferentes cultivares de feijão comum. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, n. 28, v. 200, p. 13, 2008.
- RANDHIR, R.; LIN, Yt; SHETTY, K. Stimulation of phenolics, antioxidant and antimicrobial activities in dark germinated mung bean sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors. **Process Biochem**. v. 39, p. 637-647, 2004
- RIBEIRO, M. L. L.; IDA, E. I.; OLIVEIRA, M. C. N. de; Efeito da germinação de soja CV. BR-13 e Paraná sobre o ácido fítico, fósforo total e inibidores de Tripsina. **Pesq. Agropec. Bras**. Brasília, v, 34, n,1, p 31-36, Jan. 1999.
- RIBEIRO, M. L. L. **Teor de isoflavonas e atividade de β -glucosidase em grãos de soja germinada e de diferentes grupos de maturação. Purificação e caracterização bioquímica parcial da β -glucosidase**. Londrina, 2006.
- RIGO, A. A.; DAHMER, A. M.; STEFFENS, C.; STEFFENS, J. Characterization of soybean cultivars genetically improved for human consumption. **International Journal of Food Engineering**, Berkeley, v. 1, n. 1, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.18178/ijfe.1.1.1-7>>. Acesso em: 10. Jul. 2017.

ROBLES-RAMÍREZ, M. C.; RAMÓN, Gallegos E.; MORA-ESCOBEDO, R. Soybean and cancer disease. In: Maxwell. Ed. Soybeans: Cultivation, uses and nutrition. **Nova Publishers**. New York, p. 223-250, 2011.

ROMANO, M.R. **Análise de crescimento, produção de biomassa, fotossíntese, e biossíntese de aminoácidos em plantas transgênicas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) que expressam o gene *Lhcb1*2* de ervilha**. 66f. Dissertação (Mestrado em Ciências, área de concentração: Fisiologia e Bioquímica de plantas) - Esalq / USP. 2001.

ROSSI, E. A.; ROSSI, P. R. Bebidas funcionais a base de soja. In: VENTURINI FILHO, WALDEMAR G. Bebidas não alcoólicas: **Ciência e Tecnologia**. 1ª ed. p. 57-79, Bluncher. São Paulo, 2010.

SACCO, G. B.; **Obtenção de um leite de soja de soja de qualidade através do tratamento dos grãos em forno micro-ondas**. Tese. (Doutorado em Ciências e Tecnologia dos Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”. Universidade de Piracicaba, p. 9-15, 2001.

SAGARA, M. et al. Effects of dietary intake of soy protein and isoflavones on cardiovascular disease risk factors in high risk, middle aged men in Scotland. **J Am Coll Nutr**. 2010.

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

SATHE, S. K.; SALUNKHE, D. K. Technology of removal of unwanted components of dry beans. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. Boca Raton, v. 21, n. 1. p. 263-287, 1984.

SCHOEFS, B. Chlorophyll and carotenoid analysis in food products. Properties of the pigments and methods of analysis. **Trends in Food Science & Technology**, v. 13, p. 361-371, 2002.

SERRAZANETTI, D. I. et al. Fermented tofu: Enhancement of keeping quality and sensorial properties. **Food Control**, v. 34, n. 2, p. 336-346, 2013.

SEVERSON, R. K.; NOMURA, A.Y.M.; GROVE, J. S.; STEMMERMAN, G. N. A prospective study of demographics and prostate cancer among men of Japanese ancestry in Hawaii. **Cancer Research**, v. 49, p. 1857-1860, 1989.

SILVA, C. E. da. Teores de isoflavonas em grãos inteiros e nos componentes dos grãos de diferentes cultivares de soja (*Glycine max* (L.) Merrill). **Brazilian Journal of Food Technology**. v. 15, n. 2, p. 150-156, Campinas, 2012.

SILVA, M. R.; SILVA, M. A. A. P. D. Fatores antinutricionais: Inibidores de proteases e lectinas. **Revista de Nutrição**, v.13, n.1, p.3-9, 2000.

SOUCI, S.W.; FACHMANN, W.; KRAUT, H. Food Composition and Nutrition Tables. **Stuttgart: Medpharm Scientific Publishers**, 1994. 1182 p.

TOMEI, R. R.; SALVADOR, M. J. Metodologias analíticas atuais para avaliação da atividade antioxidante de produtos naturais. **XI Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e**

VII Encontro Latino Americano de Pós-Graduação- Universidade do Vale do Paraíba-UNIVAP, 2007.

ULIANA, M. R.; VENTURINI FILHO, W. G. Análise Energética de Bebida Mista de Extrato Hidrossolúvel de Soja e Suco de Amora. **Revista Energia na Agricultura**. Botucatu, v. 25, n. 3, p. 94-103, 2010.

VERNAZA, M. G., et al. Antioxidant and anti-inflammatory properties of germinated and hydrolyzed Brazilian soybean flours. **Food Chemistry**, v. 134, p. 2217-2225, 2012

VILLAS BOAS, E. V. B.; BARCELOS, M. F. P.; LIMA, M. A. C. Tempo de germinação e características físicas, químicas e sensoriais dos brotos de soja e de milho combinado nas formas isoladas e combinadas. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 26, n. 1; p. 148-156, 2002.

WATANABE, S.; KOESSEL, S. Colon cancer: an approach from molecular epidemiology. **Journal of Epidemiology**, v. 3, p. 47-61, 1993.

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

XU, B.; CHANG, S. K. C. A Comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 2, p. 159-166, 2007.

XU, B.; CHANG, S. K. C. Effect of soaking, boiling, and steaming on total phenolic content and antioxidant activities of cool season Food legumes. **Food Chemistry**, v. 110, n. 1, p. 1-13, 2008.

ZIELINSKI, H.; KOZLOWSKA, H. Antioxidant activity and total phenolics in selected cereal grains and their different morphological fractions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 388-393, 2000.