



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
ALIMENTOS

SOJA: COMPOSTOS FUNCIONAIS E CONTAMINANTES FÚNGICOS

BIBIANA DA SILVA

Prof.^a Dr.^a Eliana Badiale Furlong
Orientadora

RIO GRANDE, RS
2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
ALIMENTOS

SOJA: COMPOSTOS FUNCIONAIS E CONTAMINANTES FÚNGICOS

BIBIANA DA SILVA

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande, como requisito para obtenção do título de mestre.

Prof.^a Dr.^a Eliana Badiale Furlong
Orientadora

RIO GRANDE, RS
2016

Ficha catalográfica

S586s Silva, Bibiana da.
Soja: compostos funcionais e contaminantes fúngicos / Bibiana da Silva. – 2016.
101 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Rio Grande/RS, 2016.

Orientadora: Dr^a. Eliana Badiale Furlong.

1. Aflatoxinas 2. QuEChERS 3. Compostos fenólicos
4. Atividade fúngica 5. Soja I. Furlong, Eliana Badiale
II. Título.

CDU 663.34:664

APROVAÇÃO

Dissertação defendida por Bibiana da Silva e aprovada em 29 de fevereiro de 2016,
pela Comissão Examinadora constituída pelos professores:



Profa. Dra. Eliana Badiale Furlong – FURG



Profa. Dra. Jaqueline Garda Buffon – FURG



Profa. Dra. Giniani Carla Dors – UFPEL



Profa. Dra. Leonor Almeida de S. Soares – FURG

Dedico aos meus pais Marli e Alzino, por serem tão orgulhosos de mim!

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Marli e Alzino, pelo incentivo, apoio, e por todas as vezes que fizeram até o impossível pra me ajudar. Pelo socorro nas dificuldades, por me amarem exatamente como eu sou, e por serem a minha maior saudade. Vocês é que são meu orgulho e não o contrário.

A minha Vó Leda, por contar com todo o orgulho do mundo pra todos que estou estudando pra ser professora. O mais sincero e simples gesto de carinho!

Ao meu companheiro Neto, por ser tão maravilhosamente meu amigo, tão sensacional e tão sensitivo. Por me amparar sempre, me ouvir, ser meu maior incentivador e acreditar tanto em mim, a ponto de investir na distância. Por todas as vezes que veio de tão longe pra ficar comigo e por todas as outras que estive perto mesmo lá de longe. Por todas as planilhas que fez no Excel, todas as referências que conferiu. Por todas as vezes em que foi minha companhia, e por ser quem desempenhou os papéis de amigo, namorado e psicólogo tão bem nesses dois anos. Você foi o meu encontro!

Ao meu irmão Fernando, por ser minha companhia mesmo quando não diz uma só palavra. Obrigada pelos dois anos de vivência.

Aos meus sogros e cunhados, por todo o carinho com que me recebem quando nos encontramos, mesmo que sejam poucas vezes.

A “profe” Eliana, tão rígida e tão maleável ao mesmo tempo. Por ter me recebido tão bem quando cheguei. Por todas as vezes que teve paciência comigo, e principalmente pelas vezes em que não teve, foi aí que aprendi mais. Por tantas vezes ter que me mostrar o óbvio e por ser uma conselheira tão boa. Por todas os papos, por todas as caronas com conversas tão divertidas, pelos momentos de descontração e por toda a disponibilidade que ofereceu sempre. Por ser um exemplo que me inspira. Por entender e saber lidar tão bem com as diferenças. Ainda bem que nos conhecemos e tive a oportunidade de aprender tanto com ela. Muito obrigada! Serei sempre grata e espero que mantenhamos esta amizade sempre.

Aos colegas do Laboratório de Micotoxinas e Ciência de Alimentos: ICs, pós graduandos, professoras e agregados, todos mesmo, obrigada pela companhia diária, pela ajuda e por compartilharem comigo de momentos de muita risada. Foram bons momentos!

As minhas grandes ajudantes, Ana (Les) e Larine, por terem me tirado algumas dúvidas e pelo trabalho braçal, muito obrigada, sem vocês duas teria sido mais difícil e com certeza muito mais chato. A Larine por todas as caronas, todas as risadas e por ser tão infantilmente debochada quanto eu, por rir de coisas tão banais e tornar a convivência tão legal! A Ana por ser minha companheira de almoço, e por ser uma pessoa tão amiga e tão doce. E sem esquecer a Sabrina, que também me ajudou muito me ouvindo, por ser minha companhia de fins de semana e de conversa fiada, e por ser aquela que sempre tá a fim de ouvir uma lamúria hehe.

Vocês são maravilhosas, obrigada por tudo!

As minhas ICs Andressa e Carol, por toda a ajuda, todos os experimentos que executaram e principalmente por me proporcionarem a oportunidade de ensinar alguma coisa pra vocês, por menos que tenha sido, foi gratificante pra mim ver a evolução de vocês. Obrigada e desculpa por todas as vezes em que quis matar alguma hahaha

Aos colegas que entraram no mestrado comigo, obrigada pela amizade e por serem tão animados, me proporcionando momentos de muita alegria. Guardo todos no coração!

Ao Manuel, pela parceria de trabalho, e por ter nos dado um licô de Salvadô! hahaha

Aos meus amigos Felipe e Geisa e também ao Ricardo, que me acompanham pra onde eu vou e que estão sempre se fazendo presentes. Vocês são valiosos pra mim!!

Aos meus amigos Mato-Grossenses que torcem tanto por mim e estão sempre esperando eu chegar pra fazer qualquer coisa maluca juntos!

A profe Leonor, Jaque e Gini por se disponibilizarem a estar na banca, tenho certeza que será de grande valia pra mim. Obrigada!

A Embrapa Soja por ceder e enviar a cultivar convencional.

A FURG e ao Programa, pela oportunidade.

A CAPES pelo apoio financeiro.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus não sou o que era antes.”

Martin Luther King

SOJA: COMPOSTOS FUNCIONAIS E CONTAMINANTES FÚNGICOS

Resumo

O melhoramento genético pode alterar a composição química da soja, e isso pode se refletir em diversos aspectos, inclusive na sua resistência à contaminação fúngica, em vista que estas técnicas visam melhorar os mecanismos de defesa natural. Alguns compostos presentes na soja se destacam pelo potencial antioxidante, como as isoflavonas e outros compostos fenólicos, que protegem o vegetal, em especial os grãos, da ação danosa de fatores bióticos e abióticos. Neste trabalho foi avaliada a presença de compostos funcionais em soja e sua correlação com a ocorrência de aflatoxina B₁ em cultivares de soja convencional e geneticamente modificadas. Dez cultivares de soja, sendo uma convencional e nove geneticamente modificadas foram caracterizadas quanto à presença e o perfil de frações fenólicas de diversas classes, incluindo ácidos fenólicos e isoflavonas, por métodos validados neste trabalho. As frações foram avaliadas quanto ao potencial de inibição da amilase fúngica e nas frações fenólicas solúvel e insolúvel em etanol os ácidos fenólicos vanilina e hidroxibenzóico, respectivamente mostraram maior correlação com a inibição da enzima (0,93 e 0,84). Na fração de isoflavonas, a genisteína mostrou o maior potencial de inibição, em concentrações em torno de 0,5 µg mL⁻¹. Foram avaliados parâmetros de validação dos métodos de QuEChERS e de Soares, Rodrigues-Amaya para determinação de AFLAs em soja. A matriz apresentou alta influência na recuperação, impossibilitando a determinação das AFLAs B₂, G₁ e G₂. O método de QuEChERS foi escolhido para determinar AFLAB₁ por apresentar percentuais de recuperação entre 105 e 117%, baixa variabilidade (3,6%) e limite de quantificação de 0,06 ng g⁻¹. Nas cultivares Monsoy 6972, Monsoy 8490, Monsoy 7639, Tornado e BRS 284 foi detectada a presença de AFLAB₁ em níveis de 1,7 ng g⁻¹; 2,3 ng g⁻¹; 1,2 ng g⁻¹; 1,1 ng g⁻¹ e 0,9 ng g⁻¹, respectivamente, todos abaixo do máximo permitido pela legislação brasileira para outras leguminosas. As amostras foram injetadas em CLAE-MS, para confirmação, não sendo detectada a presença de AFLAB₁, pois o limite de detecção deste método (0,06 ng g⁻¹) é superior ao determinado por fluorescência (0,03 ng g⁻¹). A capacidade inibidora de amilase fúngica das frações fenólicas da soja e os baixos níveis de AFLAB₁ detectados indicam que estes compostos tem ação protetora contra contaminação fúngica e a manifestação do potencial toxigênico deles.

Palavras chave: aflatoxinas, QuEChERS, frações fenólicas, atividade antifúngica.

SOYBEANS: FUNCTIONAL COMPOUNDS AND FUNGAL CONTAMINANTS

Abstract

The genetic modification can change the chemical composition of soybeans, and this can be reflected in many aspects, including its resistance to fungal contamination, given that these techniques aim to improve the mechanisms of natural defense. Some compounds present in soybeans stand out for antioxidant potential, such as isoflavones and other phenolic compounds, which protect the plant, especially the grains, of the harmful action of biotic and abiotic factors. In this study, we evaluated the presence of functional compounds in soy and its correlation with the occurrence of aflatoxin B1 in conventional soybean cultivars and genetically modified. Ten soybean cultivars, with one of them conventional and nine genetically modified were characterized for the presence and profile of phenolic fractions of different classes, including phenolic acids and isoflavones, by validated methods in this work. Fractions were assessed for inhibition potential of amylase and in the soluble and insoluble phenolic fractions in ethanol the phenolic acids vanillin and hydroxybenzoic, respectively showed highest correlations with inhibition of the enzyme (0.93 and 0.84). In the isoflavone fraction genistein showed the greatest potential for inhibition at concentrations around 0.5 mg L⁻¹. Were evaluated validation parameters of QuEChERS methods and Soares, Rodrigues-Amaya for determining AFLAs in soybean. The matrix had a high influence on the recovery, making it impossible to determine the AFLAs B₂, G₁ and G₂. The QuEChERS method was chosen to determine AFLAB₁ for presenting recovery percentage between 105 and 117%, low variability (3.6%) and limit of quantitation of 0.06 ng g⁻¹. In cultivars Monsoy 6972, Monsoy 8490, Monsoy 7639, Tornado and BRS 284 was detected the presence of AFLAB₁ at levels of 1.7 ng g⁻¹; 2.3 ng g⁻¹; 1.2 ng g⁻¹; 1.1 ng g⁻¹ and 0.9 ng g⁻¹, respectively, all below the maximum allowed by Brazilian law relative to other legumes. Samples were injected into HPLC-MS for confirmation, not being detected the presence of AFLAB₁ because the detection limit of this method (0.06 ng g⁻¹) is higher than that determined by fluorescence (0.03 ng g⁻¹). The inhibitory capacity of amylase by soy phenolic fractions and low levels of AFLAB₁ detected indicate that these compounds have protective action against fungal infection and the manifestation of their potential toxicogenic.

Keywords: aflatoxins, QuEChERS, phenolic fractions, antifungal activity.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Radicais referentes às estruturas das isoflavonas.	28
Tabela 2. Níveis reais e codificados das variáveis do planejamento experimental fracionado 2^{6-2} para extração e hidrólise de isoflavonas.	42
Tabela 3. Gradiente de eluição da fase móvel para determinação de AFLAs por CLAE-MS.	50
Tabela 4. Condições de fragmentação de AFLAB ₁ para confirmação por CLAE-MS.	50
Tabela 5. Características de origem tecnológica, geográfica e grupo de maturação das amostras de soja.	52
Tabela 6. Composição proximal das amostras de soja em base seca (g 100 g ⁻¹).	53
Tabela 7. Frações proteicas em variedades de soja extraídas por agitação orbital (AO) e por ultrassom assistida (UA).	56
Tabela 8. Percentual de albumina e globulina em relação a proteína total nas cultivares de soja.	57
Tabela 9. Atividades específicas de peroxidase e protease em cultivares de soja.	58
Tabela 10. Frações fenólicas em amostras de soja (mg de ácido gálico g de soja ⁻¹).	59
Tabela 11. Parâmetros de calibração do método cromatográfico aplicado à determinação de ácidos fenólicos.	61
Tabela 13. Parâmetros de calibração do método cromatográfico de quantificação de isoflavonas.	64
Tabela 14. Delineamento fatorial fracionado 2^{6-2} para extração de isoflavonas em soja.	65
Tabela 15. Efeitos das variáveis na extração de daidzeína* e genisteína** na soja BRS 284.	66
Tabela 16. Delineamento fatorial fracionado 2^{4-1} para extração de isoflavonas em soja.	67
Tabela 17. Efeitos das variáveis na extração de daidzeína* e genisteína** na soja BRS 284.	67
Tabela 18. Delineamento composto central rotacional 2^3 para extração de isoflavonas em soja.	68
Tabela 19. Análise de variância para daidzeína.	69
Tabela 20. Análise de variância para genisteína.	69
Tabela 21. Percentual de recuperação e coeficientes de variação do método proposto.	72
Tabela 22. Conteúdo de isoflavonas em amostras de soja (µg g ⁻¹).	72
Tabela 23. Inibição específica do radical DPPH por extratos frações fenólicas das cultivares de soja (% inibição µg fração fenólica ⁻¹).	75
Tabela 24. Inibição específica da atividade da PO por extratos frações fenólicas das cultivares de soja (% inibição µg fração fenólica ⁻¹).	77

Tabela 25. Concentração de ácidos fenólicos presentes em extratos de FFE e FFI necessária para inibir em 50% a atividade da enzima amilase ($\mu\text{g mL}^{-1}$).....	79
Tabela 26. Concentração de isoflavonas presentes em extratos de FFIs necessária para inibir em 50% a atividade da enzima amilase ($\mu\text{g mL}^{-1}$).....	80
Tabela 27. Parâmetros de calibração do método cromatográfico para determinação de AFLAs.....	83
Tabela 28. Parâmetros de validação dos métodos de extração de AFLAs.....	83
Tabela 29. Ocorrência de AFLA B ₁ em cultivares de soja.	86

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química de compostos fenólicos encontrados na soja.....	26
Figura 2. Estrutura química de isoflavonas.....	28
Figura 3. Estruturas químicas das principais aflatoxinas.....	32
Figura 4. Cromatograma de separação de ácidos fenólicos por CLAE-UV.....	60
Figura 5. Cromatograma de eluição de daidzeína e genisteína ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) por CLAE-UV.....	66
Figura 6. Diagramas de Pareto das respostas daidzeína e genisteína.....	69
Figura 7. Superfícies de resposta do teor de daidzeína ($\mu\text{g g}^{-1}$) (a, b, c) e genisteína ($\mu\text{g g}^{-1}$) (d, e, f) em função das variáveis significativas.....	70
Figura 8. Cromatogramas de eluição de AFLAs (1 ng mL^{-1}).....	81
Figura 9. Análise de componentes principais para estudo da recuperação de AFLAB ₁ em soja.....	85
Figura 10. Extração de aflatoxinas pelo método de QuEChERS.....	86
Figura 11. Análise de componentes principais dos mecanismos de defesa estudados nas cultivares de soja.....	88

LISTA DE ABREVIATURAS

USDA - Departamento de Agricultura dos Estados Unidos
OGM – Organismos geneticamente modificados
EPSPS - 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato
RR - *Roundup Ready*®
AFLAs - Aflatoxinas
IARC - Agência Internacional de Pesquisa em Câncer
WHO – Organização mundial de saúde
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
UA – Unidade de atividade enzimática
TCA – Ácido Tricloroacético
FFM – Fração fenólica solúvel em metanol
FFE - Fração fenólica solúvel em etanol
FFI - Fração fenólica insolúvel em etanol
FFIs - Fração fenólica de isoflavonas
CLAE-UV – Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de luz ultravioleta
CLAE-FL - Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de fluorescência
CLAE-MS - Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de massas
LD – Limite de detecção
LQ - Limite de quantificação
HCl – Ácido Clorídrico
INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia
k – fator de retenção
 α – fator de separação
DPPH - 2,2-Difenil-1-picril-hidrazila
 ϵ – absorvidade molar
ANOVA – Análise de variância
UA – Ultrassom assistida
AO – Agitação orbital
PO - Peroxidase
TR – Tempo de retenção
LD_i – Limite de detecção do instrumento
LQ_i – Limite de quantificação do instrumento
LD_m – Limite de detecção do método
LQ_m – Limite de detecção do método
EM – Efeito de matriz
IC₅₀ – medida da inibição de um composto em 50%
R – Coeficiente de correlação
ACP – Análise de componentes principais

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo geral.....	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	20
3.1 Soja	20
3.1.1 Melhoramento genético da soja	20
3.2 Composição química da soja.....	22
3.3 Compostos funcionais na soja	23
3.3.1 Compostos fenólicos	25
3.3.1.1 Isoflavonas	27
3.4 Mecanismos de defesa em tecidos vegetais	29
3.5 Fungos.....	30
3.6 Micotoxinas.....	30
3.6.1 Aflatoxinas.....	31
3.6.2 Métodos de determinação de aflatoxinas	34
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.1 Padrões e reagentes.....	36
4.2 Amostra.....	36
4.3 Composição proximal	36
4.4 Determinação de proteínas solúveis	37
4.5 Caracterização bioquímica	37
4.5.1 Atividade de protease	37
4.5.2 Atividade de peroxidase	38
4.6 Determinação das frações fenólicas	39
4.6.1 Fração fenólica solúvel em metanol (FFM)	39
4.6.2 Fração fenólica solúvel em etanol (FFE).....	40
4.6.3 Fração fenólica insolúvel em etanol (FFI).....	40
4.6.4 Avaliação do perfil de ácidos fenólicos	40
4.7 Determinação de isoflavonas	41
4.7.1 Preparo de padrões	41
4.7.2 Condições cromatográficas.....	41

4.7.3 Otimização do método de extração de isoflavonas	42
4.7.4 Validação do método.....	43
4.8 Avaliação da atividade antioxidante de compostos fenólicos e isoflavonas.....	44
4.8.1 Inibição do radical DPPH	45
4.8.2 Inibição da atividade da enzima peroxidase (PO).....	45
4.9 Avaliação das frações fenólicas como inibidores enzimáticos	46
4.10 Determinação de aflatoxinas	47
4.10.1 Preparo de padrões	47
4.10.2 Condições cromatográficas.....	47
4.10.3 Extração de aflatoxinas.....	48
4.10.3.1 Método de QuEChERS.....	48
4.10.3.2 Método de Soares e Rodrigues-Amaya	48
4.10.4 Validação de método	49
4.11 Análise estatística	50
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
5.1 Composição proximal.....	52
5.2 Proteínas solúveis	54
5.3 Caracterização bioquímica	57
5.4 Frações fenólicas	59
5.5 Isoflavonas	64
5.5.2 Otimização de método de extração	65
5.5.3 Validação do método otimizado	71
5.6 Atividade antioxidante.....	73
5.7 Atividade antifúngica: inibição de α -amilase.....	78
5.8 Determinação de aflatoxinas	81
5.8.1 Estabelecimento das condições cromatográficas	81
5.8.2. Análise de componentes principais	84
6. CONCLUSÃO	89
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo maior produtor de grãos de soja, com domínio de 30,3% do mercado mundial, correspondente a uma produção estimada de 94,5 milhões de toneladas na safra 2014/215. Os estados de Mato Grosso, Paraná e Rio Grande do Sul são os principais produtores (CONAB, 2015).

A composição da soja pode variar em função das condições climáticas a que são expostas as sementes. Más condições de colheita e armazenamento podem afetar a qualidade dos grãos, tornando-os suscetíveis a contaminação por pragas como micro-organismos e consequente manifestação de doenças, o que tornaria a soja um risco para os consumidores de seus produtos derivados, especialmente pela exposição crônica aos contaminantes, tendo em vista os diferentes produtos a base desta leguminosa que constituem a dieta (GREGORI et al., 2013). A existência de mecanismos de defesa natural das plantas pode ser aperfeiçoada para aumentar a produtividade na agricultura e a segurança alimentar pelo aumento da disponibilidade de compostos funcionais e diminuição da incidência de contaminação (FIGUEIRA et al., 2003; PAGNUSSATT et al., 2012).

A soja vem sendo melhorada geneticamente com intuito de aumentar a produtividade, além de características mais específicas, como resistência a insetos/pragas, tolerâncias a solos ácidos e a estresse hídrico e boas características sensoriais para a soja voltada à alimentação humana (EMBRAPA, 2004; TRZECIAK, 2012). O melhoramento genético pode alterar a composição química deste grão, e isso pode se refletir em diversos aspectos, inclusive na sua resistência à contaminação fúngica, uma vez que estas técnicas visam melhorar os mecanismos de defesa natural (BARROS et al., 2010).

Os fungos são um dos principais responsáveis por perdas na qualidade de grãos e seu crescimento ocorre sob condições ambientais favoráveis, tais como umidade, temperatura, tempo e condições físicas do grão, níveis de O₂ e CO₂, prevalência de linhagens toxigênicas, entre outros. Estes microrganismos além de promoverem deterioração e perda do valor nutritivo, sob condições de estresse, podem produzir micotoxinas, tornando os grãos inadequados para o consumo também por este fator (FORTI et al.; 2010; OLIVEIRA et al., 2010).

Alguns compostos presentes na soja se destacam pelo reconhecido potencial antioxidante, decorrente da presença de compostos como isoflavonas e outros compostos fenólicos que protegem o vegetal e em especial os grãos da ação de fatores bióticos e

abióticos (BALISTEIRO; ROMBALDI; GENOVESE 2013; KUMAR et al., 2010; MARKOVIC et al., 2015; TYUG; PRASAD; ISMAIL, 2010).

A avaliação do potencial de defesa destes compostos em soja, especialmente no que se refere a resistência à contaminação fúngica não são frequentes. Dentre as formas de proteção dos tecidos vegetais de pragas está a ação de compostos que inibem as enzimas digestivas do invasor. Um outro mecanismo natural consiste em dificultar a instauração de processos oxidativos que geram estresse no tecido, e especialmente no microrganismo invasor, que pode produzir micotoxinas se a espécie fúngica for toxigênica (FENG et al., 1996; FIGUEIRA et al., 2003; PAGNUSSATT et al., 2014). A avaliação da ocorrência destes compostos protetores e de suas atividades inibitórias de processos hidrolíticos e oxidativos permite inferir quais mecanismos de defesa contra ataque de patógenos estão presentes em um tecido.

No caso da soja não são comuns estudos de contaminação fúngica, e poucos autores mencionam a detecção de aflatoxinas (LIU et al, 2014; OLIVEIRA et al., 2010; XIE et al., 2014;). Considerando a frequência de consumo de produtos a base de soja, a avaliação da ocorrência de aflatoxinas é interessante, bem como o estudo dos mecanismos de defesa das cultivares através da capacidade da fração fenólica do grão de inibir a amilase fúngica e a formação de radicais livres. Desta forma, este trabalho buscou contribuir para a elucidação dos mecanismos de defesa contra a contaminação fúngica dos grãos de soja.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar compostos funcionais em soja e correlacionar com a ocorrência de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ em cultivares convencional e geneticamente modificadas.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar as amostras de soja quanto à composição proximal, bioquímica e presença de compostos funcionais.
- Validar método para extração e determinação de isoflavonas em CLAE-UV.
- Avaliar o potencial antifúngico e antioxidante dos compostos funcionais.
- Adaptar e validar método para avaliar a ocorrência aflatoxinas B₁, B₂, G₁, e G₂ em variedades de soja cultivadas em diferentes regiões do país.
- Correlacionar o perfil de compostos funcionais com a ocorrência de aflatoxinas.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Soja

A soja (*Glycine Max* L.) é uma leguminosa oleaginosa (MARTINEZ et al., 2011), originária de regiões de clima temperado, porém adaptada a regiões de clima tropical e subtropical, sendo, portanto, cultivada em praticamente todo o território brasileiro (TRZECIAK, 2012). O Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), em sua última divulgação do quadro de oferta e demanda mundial, referente ao mês de agosto/2015, estimou que a safra de soja em grãos 2015/16 dos EUA (33,3%), do Brasil (30,3%) e da Argentina (17,8%) serão responsáveis por 81,4% de toda a produção mundial, e a China será responsável por 64,1% de todas as importações mundiais. Para o Brasil, o USDA estima um aumento de produção em toneladas para a safra 2015/16 que foi plantada em setembro de 2015, de aproximadamente 2% (USDA, 2015).

Os principais estados produtores da safra 2014/15 foram: Mato Grosso, com 29,2% da produção (28,13 milhões de toneladas); Paraná, com 17,8% da produção (17,12 milhões de toneladas); Rio Grande do Sul, com 15,4% (14,79 milhões de toneladas); e Goiás, com 9,1% (8,75 milhões de toneladas). O estado brasileiro que mais exportou soja foi Mato Grosso, com 11,8 milhões de toneladas, seguido do Rio Grande do Sul, com 6,7 milhões de toneladas e do Paraná, com 5,6 milhões de toneladas de grãos de soja (CONAB, 2015).

O principal e mais conhecido uso da soja é para extração de óleo comestível e sua proteína residual é amplamente empregada em ração para animais (MILAZZO et al., 2013) e formulações para consumo humano, especialmente após a segunda metade do século XX, quando produtos como farinha de soja, farinha desengordurada de soja, proteína texturizada de soja, proteína isolada de soja e extratos hidrossolúveis passaram a constituir formulações de produtos de baixo teor de gordura (BARNES et al., 2006).

3.1.1 Melhoramento genético da soja

Historicamente, a soja foi melhorada geneticamente com intuito de aumentar a produtividade pelo aumento da resistência ao ataque de patógenos e plantas daninhas (TRZECIAK, 2012). Os organismos geneticamente modificados (OGMs), ou transgênicos, têm seu genoma alterado pelo processo de transferência de um ou mais genes de um organismo para outro (MARDEGAN et al., 2004). Diversos programas de melhoramento genético contribuíram para o desenvolvimento de cultivares de alto rendimento adaptadas às condições climáticas do Brasil. Mais recentemente, alguns programas tem buscado

desenvolver cultivares com conteúdos proteicos mais elevados do que as variedades nativas (TRZECIAK, 2012).

Basicamente, as características desejadas para a soja são: estabilidade de produção, produtividade, porte e ciclo adequados, resistência a doenças, boa qualidade de semente e teores adequados de óleo (20%) e proteína (30 a 40%). Além dessas, existem características mais específicas, como resistência a insetos/pragas, tolerância a solos ácidos e a estresse hídrico e boas características sensoriais para a soja voltada à alimentação humana. As especificidades regionais das cultivares geneticamente modificadas são as mesmas existentes nas convencionais (EMBRAPA, 2004).

Segundo Arango et al. (2014), a resistência a herbicida tem sido o foco das pesquisas e atividades em torno da transgenia, devido à larga escala de uso do herbicida glifosato, de largo espectro que mata a maioria das plantas. Em plantas sensíveis, o glifosato atua inibindo a atividade da enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfatossintase (EPSPS), responsável pela reação que condensa chiquimato-3-fosfato e fosfoenolpiruvato em 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato (EPSP) e fosfato inorgânico (Pi), na etapa pré-corismato da rota do chiquimato, impedindo a síntese de aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano, essenciais para a síntese de proteínas e divisão celular nas plantas (AGOSTINETO et al., 2009; MOLDES et al., 2012; SANTOS et al., 2007). A tecnologia de modificação genética da soja resistente ao glifosato é denominada *Roundup Ready*® pertencente a empresa Monsanto Company e as sojas modificadas levam a classificação de RR (BOHN et al., 2014).

No caso da soja resistente ao glifosato, a tolerância ao herbicida foi obtida pela inserção de um gene oriundo do genoma de *Agrobacterium* sp., estirpe CP4, a qual codifica uma variante da EPSPS (CP4 EPSPS), especialmente tolerante à inibição pelo glifosato. Sob tratamento com esse herbicida, as plantas de soja não são afetadas, devido à ação continuada e sistemática dessa enzima alternativa, insensível ao produto (SANTOS et al., 2007),

O melhoramento genético tem alterado a composição química da soja. Estudos ambientais e climáticos são importantes não apenas para avaliar o desempenho produtivo da soja, mas para fins de estudo do impacto destas condições na composição química da semente (CARRERA et al., 2011; BARROS et al., 2010). A busca do conhecimento da composição química da soja, visando aplicá-lo a fortificação de outros produtos de origem vegetal, é mais urgente do que buscar métodos de preparo e gestão de plantio. Assim, a concentração de diversos constituintes da soja, como compostos fenólicos, isoflavonas, aminoácidos, além de atividade antioxidante tem sido avaliada, numa postura voltada não apenas para a agricultura, mas para a alimentação humana para o fornecimento de nutrientes e de compostos funcionais

que previnam danos (HOUX; WIEBOLD; FRITSCHI, 2014). No entanto, não tem sido explorada a possibilidade de que os compostos funcionais possam estar relacionados com a susceptibilidade ao ataque dos patógenos. Também faltam evidências sobre como a melhoria genética pode afetar a manifestação do potencial toxigênico de espécies fúngicas contaminantes do grão.

Segundo Bohn et al. (2014) em sojas modificadas geneticamente, pouca atenção é dada aos resíduos de herbicidas e seus metabolitos que potencialmente se acumulam no produto final, bem como se a exposição a estes herbicidas ou outras alterações funcionais relacionadas com a própria modificação genética, tais como alterações no metabolismo intermediário da planta, podem afetar a composição de nutrientes.

Revisando o tema, observa-se que existem muitos resultados contraditórios quanto a alterações na composição de sojas RR. Alguns autores afirmam terem encontrado diferenças quando compararam com soja convencional. Bohn et al. (2014), Zobiolo et al. (2012) e Wei; Jone; Fang, (2004) encontraram conteúdo de isoflavonas maior em cultivares modificadas, embora a idéia principal é de que não ocorram alterações na soja proveniente da modificação genética. Segundo os autores uma soma de fatores pode alterar a composição da soja, sendo os principais a presença e quantidade de resíduos de herbicida glifosato e como estes resíduos interagem com componentes da planta, a própria alteração genética, além de fatores climáticos e ambientais. Considerando que cada cultivar apresenta características muito específicas, o que se pode afirmar é que a literatura a respeito de alterações nutricionais na soja em decorrência do melhoramento genético ainda é muito escassa.

3.2 Composição química da soja

Segundo Delarmelino-Ferraresi; Villela; Aumonde (2014), sementes de soja de diferentes cultivares, ou lotes da mesma cultivar, podem variar quanto à composição química devido ao cultivo em diferentes condições, com potenciais reflexos sobre a qualidade fisiológica.

A soja é composta dos macronutrientes lipídeos, carboidratos e proteínas. A porção lipídica presente nos grãos é a principal responsável pelo sabor característico em produtos a base de soja (CIABOTTI et al., 2006; PAUCAR-MENACHO et al., 2010a), sendo representada por aproximadamente 20% da composição do grão (SOUZA et al., 2009), correspondendo a aproximadamente 15% de lipídeos saturados, 61% lipídeos poliinsaturados e 24% lipídeos monoinsaturados (CEDERROTH; NEF, 2009), variando de acordo com as cultivares e as condições ambientais a que são expostas (KUMAR et al., 2006). Os principais

ácidos graxos encontrados na soja são o palmítico, esteárico, oléico, linoleico e linolênico, nas proporções de aproximadamente 10, 4, 18, 55 e 10% (MILAZZO et al., 2013).

As proteínas da soja correspondem a uma fração de 30 a 40% da composição do grão, dependendo da variedade da soja (CEDERROTH; NEF, 2009), sendo deste total, aproximadamente 80% representado pelas frações de globulinas 7S (β -conglucina) e 11S (glicina), proteínas de reserva (REZENDE, 2012), além de porções menores das frações de proteínas 2S, 9S e 15S. Carrera et al. (2011) citaram que fatores como temperatura, radiação solar e atividade de água podem influenciar no teor e no tipo de aminoácidos presentes nas proteínas do grão.

Nishinari et al. (2014) afirmaram que as proteínas presentes na soja apresentam algumas vantagens como conter todos os aminoácidos essenciais, apresentar um bom balanço de aminoácidos e diminuir o colesterol. Redondo-Cuenca et al. (2006) citaram ainda a diminuição do risco de doenças cardiovasculares, além de conferirem excelentes propriedades para o processamento.

A quantidade de carboidratos presentes na soja está ao redor de 25%, distribuídos entre solúveis – sacarose, rafinose e estaquiose, principalmente - e insolúveis – celulose e hemicelulose (REZENDE, 2012). Segundo Saldivar et al. (2011) a relação entre lipídeos, proteínas e carboidratos vem sendo examinada em diversas cultivares, pois estes apresentam inúmeras variações durante o desenvolvimento da semente. Outras frações que fazem parte da composição da soja são as fibras e os minerais, correspondendo a um total em torno de 6 e 5,8% respectivamente (SBARDELOTTO; LEANDRO, 2008), além de algumas vitaminas como niacina, ácido pantotênico, riboflavina, tiamina, ácido fólico, e as lipossolúveis A e E (REZENDE, 2012).

3.3 Compostos funcionais na soja

A relação entre a dieta e a redução de doenças crônicas é bem reconhecida e tem estimulado pesquisadores a buscar soluções para a prevenção destas doenças em compostos específicos presentes nos alimentos (BARNES et al., 2006). De acordo com a literatura a respeito de diversos compostos funcionais da soja, estes estão associados a diversas funções benéficas como antioxidantes, antiestrogênicos, antitumorais, entre outras (CAPRIOTTI et al., 2015; NAIM et al., 1974; PAUCAR-MENACHO et al., 2010b; SILVA; PERRONE, 2015).

O potencial funcional da soja está relacionado principalmente a sua fração fenólica ou de polifenóis, caracterizada pela presença de diferentes estruturas químicas, sintetizadas como

metabólitos secundários, cuja função é proteger o grão. A estes compostos se tem atribuído e demonstrado ações benéficas à saúde, em especial aquelas dependentes da atividade antioxidante (FELIX; CANNIATTI-BRAZACA, 2008; MARTINEZ et al., 2011). A soja também é conhecida por possuir alguns peptídeos exclusivos que têm provado possuir atividade biológica em alguns tipos de câncer e doenças cardíacas (BARNES et al., 2006; PAUCAR-MENACHO et al., 2010a; REZENDE, 2012).

Algumas enzimas presentes na soja apresentam características e atividades importantes, tais como as proteases que segundo Wu e Muir (2010) podem afetar o conteúdo de compostos fenólicos como as isoflavonas na semente. Elas catalisam a hidrólise de proteínas e de polipeptídeos em aminoácidos e têm sido utilizadas em vários setores industriais, tais como na produção de detergente, produtos farmacêuticos, indústrias de alimentos e no setor de biotecnologia (CASTRO et al., 2016). Na indústria alimentícia, onde produtos à base de proteínas são muitas vezes caracterizados pela presença de peptídeos antinutricionais e de baixa disponibilidade nutricional, elas são empregadas para melhorar a digestibilidade proteica ou para minimizar a poluição ambiental (NOVELLI, BARROS E FLEURI, 2016).

As peroxidases são enzimas oxirredutases que catalisam reações de oxidação de várias substâncias orgânicas e inorgânicas, doadoras de prótons (mono e difenóis, polifenóis, aminofenóis entre outros), na presença de peróxido de hidrogênio (cofator), gerando radicais livres. Na ausência do peróxido de hidrogênio, elas podem oxidar os compostos com o auxílio de oxigênio molecular (KAMAL; BEHERE, 2008; NORA, 2015). São enzimas também associadas a mecanismos de defesa na soja, tornando-a mais resistente a doenças, regulando a formação de parede celular pela lignificação e regulação da permeabilidade da membrana. Sua atividade decresce ao longo do período de armazenamento e por isto funciona como uma espécie de termômetro geral das atividades fisiológicas da planta, que são altamente influenciadas pelas condições externas, tais como infecções (COSTA; PEREIRA; NETO, 1979; LABANCA, 2002; STEEVENSZ et al., 2013).

Quando um patógeno entra em contato com a planta, genes são ativados e sintetizam novos compostos que podem ser indicados pelo aumento da atividade de enzimas de defesa, como a peroxidase. Embora as peroxidases não possam ser utilizadas como marcadores de resistência, o aumento de sua atividade é indicio de alteração metabólica especialmente promovida por estresse da invasão do tecido por fungos ou outros microrganismos. (LABANCA, 2002; MENEZES et al., 2004)

3.3.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos de ocorrência natural em plantas são divididos em vários grupos tais como fenóis simples, ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, entre outros. Alguns exemplos mostrados na Figura 1 são encontrados na soja. Eles são classificados como metabolitos secundários, pois estão relacionados com a proteção de plantas contra a radiação ultravioleta, herbívoros, agentes patogênicos ou microbianos, e sua presença pode ocorrer em fase de diferenciação ou de estresse. Além disso, os compostos fenólicos também têm várias atividades biológicas, como antioxidante, antimutagênica, antibacteriana, antiinflamatória, estrogênica ou efeitos anticancerígenos e antimicrobianos. Vários ensaios *in vitro* e *in vivo* tem sido conduzidos para demonstrar que podem minimizar ou eliminar a iniciação ou o progresso de várias doenças humanas (ALU'DATT et al., 2013; CHUNG et al., 2011; DIAS, et al., 2016; VERARDO et al., 2015).

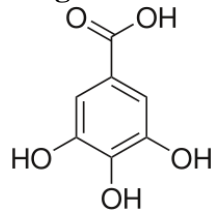
Os compostos fenólicos quimicamente são constituídos por um ou mais anéis aromáticos e estes servem de base para sua classificação, bem como os elementos estruturais que se ligam a estes anéis. A partir desta estrutura fenólica mais simples são sintetizados os ácidos fenólicos, que possuem um grupo carboxílico em uma posição do anel aromático e que servem como precursores de outros fenóis mais complexos (CHEN et al., 2015; DIAS et al., 2016). No caso específico da soja, muitos estudos tem avaliado o teor de compostos fenólicos livres, porém, poucos tem considerado o perfil de fenóis simples na forma ácida (CHUNG et al., 2011).

A via mais importante na biossíntese de compostos fenólicos é a via do ácido chiquímico em que uma molécula de ácido fosfoenolpirúvico derivada da glicólise e eritrose-4-fosfato, da via das pentoses fosfato são combinados resultando na formação de um açúcar, que é ciclizado e reduzido para formar chiquimato. A formação de chiquimato é uma etapa crítica para a formação de compostos fenólicos, pois está também envolvida com a síntese de aminoácidos e metabolitos primários com papéis essenciais em tecidos de plantas além de ser uma das rotas metabólicas utilizadas por alguns fungos para a síntese de metabólitos tóxicos como forma de defesa (DIAS et al., 2016; HEIDTMANN-BEMVENUTI et al., 2011).

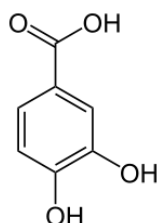
Ácidos fenólicos, os primeiros na via de síntese, podem estar nas formas solúveis livres, solúveis conjugados e insolúveis. As formas livres se encontram presentes dentro dos vacúolos de células vegetais, enquanto as conjugadas são ligadas a açúcares ou outro componente de baixa massa molecular; e as formas insolúveis são ligados de forma covalente

componentes estruturais de parede celular, tais como celulose, hemicelulose, lignina, pectina e proteínas estruturais em forma de bastonete (WANG et al., 2014).

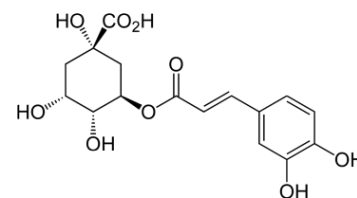
Figura 1. Estrutura química de compostos fenólicos encontrados na soja.



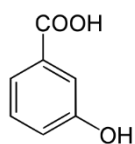
Gálico



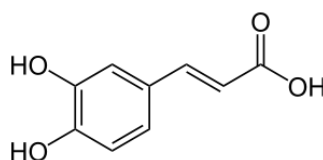
Protocatecúico



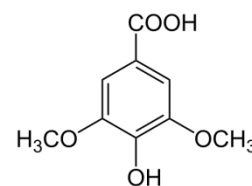
Clorogênico



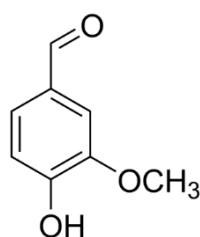
Hidroxibenzóico



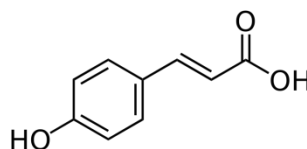
Cafeico



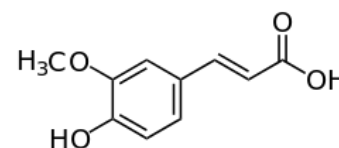
Serínico



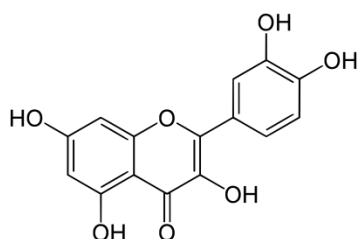
Vanilina



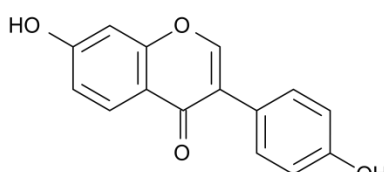
Cumárico



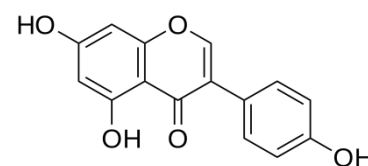
Ferúlico



Quercetina



Daidzeína



Genisteína

A soja tem sido utilizada por seu teor de substâncias funcionais, das quais se destacam os ácidos fenólicos e os flavonoides. Os ácidos fenólicos representam de 26 a 78% do conteúdo fenólico total em soja, e as isoflavonas são os compostos fenólicos mais estudados na semente (CHUNG et al., 2011; VERARDO et al., 2015). O conteúdo e perfil de compostos fenólicos em sementes de soja é alterado por fatores genéticos, ambientais ou processamento

industrial. Os principais ácidos fenólicos identificados na soja são ferúlico, siríngico, cumárico, vanilina, além das isoflavonas daidzeína, genisteína e gliciteína (Figura 1) (ALU'DATT; RABABAH; ALLI, 2013).

3.3.1.1 Isoflavonas

Dentre os compostos polifenólicos presentes na soja destacam-se as isoflavonas, uma subclasse da família dos flavonoides formadas pela mesma via biossintética (BARNES, 2006). As isoflavonas são compostos difenólicos que se caracterizam por apresentar dois anéis de benzeno ligados a um terceiro anel na posição do carbono 3 (SHAO et al., 2011). Em função dos substituintes nesta estrutura básica são sintetizadas diferentes isoflavonas.

Na soja, as isoflavonas são encontradas em concentrações que variam entre 400 e 9500 $\mu\text{g g}^{-1}$ (ROSTAGNO et al., 2009), distribuídas em 4 formas químicas (Figura 2), que perfazem 12 isômeros (Tabela 1): as agliconas daidzeína, genisteína e gliciteína; os β -glicosídeos daidzina, genistina e glicitina; e os derivados glicosilados acetilados 6-O-acetildaidzina, 6-O-acetilgenistina, 6-O-acetilglicitina; e glicosilados malonilados 6-O-malonildaidzina, 6-O-malonilgenistina e 6-O-malonilglicitina (YATSU et al., 2014).

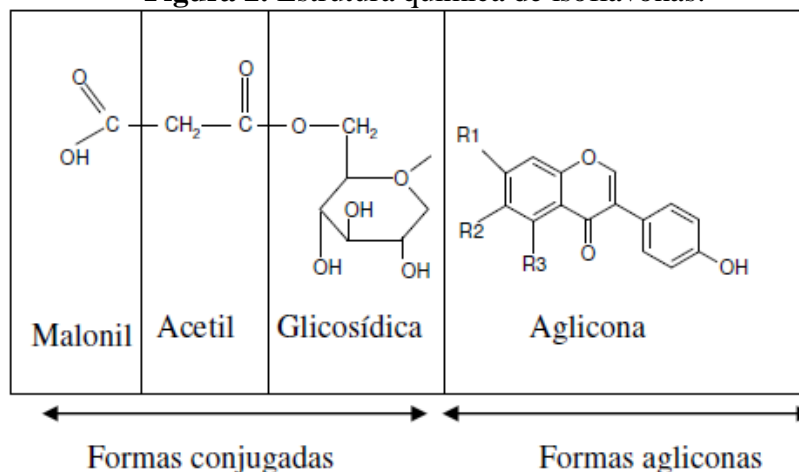
Os efeitos benéficos das isoflavonas são atribuídos as formas denominadas genisteína (4,5,7 trihidroxisoflavona), daidzeína (4,7 dihidroxisoflavona) e gliciteína (4,7 dihidroxi-6-metoxi-isoflavona), que tem semelhança estrutural com 17β -estradiol, ao qual se associa sua atividade estrogênica e a denominação de fitoestrógenos. Nos grãos de soja estão principalmente as formas β -glicosídicas, 6-O-malonil- β -glicosídeos ou 6-O-acetil- β -glicosídeos das isoflavonas (NEMITZ, TEIXEIRA e VON POSER, 2015), resultando em aproximadamente dois terços de glicosídeos conjugados de genisteína e o restante conjugados de daidzeína e pequenas quantidades de gliciteína (ESTEVES e MONTEIRO, 2001).

Alguns estudos indicam que as isoflavonas da soja podem interagir com componentes da matriz alimentar, influenciando diretamente na sua extração. Os principais componentes afetados ou que interagem são as proteínas, com as quais formam complexo proteína-isoflavona a partir de interações do tipo pontes de hidrogênio, iônica, covalente e hidrófobas (ACHOURI, BOYE e BELANGER, 2005). A maior parte das isoflavonas na soja está concentrada no hipocótilo e o seu conteúdo na casca é baixo. A extração do óleo de soja não remove as isoflavonas, devido à insolubilidade destes compostos em hexano (RIBANI, 2014).

Para otimizar o método de extração de isoflavonas, tem-se avaliado os principais parâmetros relacionados a eficiência da extração verificando pequenas modificações nos protocolos que resultem em aumento das concentrações determinadas. Portanto, é necessário

realizar-se a otimização e validação de método para cada matriz em estudo. A tendência mais recente é buscar diminuir o tempo total de extração, geralmente longo nos métodos convencionais e por isso a técnica de ultrassom assistida tem se destacado por sua eficiência e agilidade conferida ao processo de extração (ROSTAGNO et al., 2009)

Figura 2. Estrutura química de isoflavonas.



Fonte: (RIBANI, 2014 adaptado de ROSTAGNO et al., 2007).

Tabela 1. Radicais referentes às estruturas das isoflavonas.

Isoflavonas	R1	R2	R3
Genisteína	OH	H	OH
Daidzeína	OH	H	H
Gliciteína	OH	OCH ₃	H
Genistina	C ₆ O ₅ H ₁₁	H	OH
Daidzina	C ₆ O ₅ H ₁₁	H	H
Glicitina	C ₆ O ₅ H ₁₁	OCH ₃	H
Acetil-genistina	C ₆ O ₅ H ₁₁ +COCH ₃	H	OH
Acetil-daidzina	C ₆ O ₅ H ₁₁ +COCH ₃	H	H
Acetil-glicitina	C ₆ O ₅ H ₁₁ +COCH ₃	OCH ₃	H
Malonil-genistina	C ₆ O ₅ H ₁₁ +COCH ₂ COOH	H	OH
Malonil-daidzina	C ₆ O ₅ H ₁₁ +COCH ₂ COOH	H	H
Malonil-glicitina	C ₆ O ₅ H ₁₁ +COCH ₂ COOH	OCH ₃	H

Fonte: (RIBANI, 2014 adaptado de ROSTAGNO et al., 2007).

Os produtos que contem as formas de isoflavonas glicosídicas passam pelo metabolismo enzimático no intestino delgado para serem transformadas em agliconas, que é a forma da isoflavona mais biodisponível no organismo (RIBANI, 2014). Para fins de quantificação e para obter a forma aglicona, os protocolos descrevem uma hidrólise ácida sendo o ácido clorídrico diluído o mais empregado. A hidrólise ácida quebra a ligação entre a isoflavona e as porções de açúcares, transformando todos os derivados de isoflavona em suas

formas agliconas (LEE et al., 2015; ROSTAGNO et al., 2009). Embora a hidrólise represente um passo a mais no processo total de quantificação de isoflavonas, sua realização é importante por facilitar a separação e simplificar a determinação cromatográfica das diferentes formas de isoflavonas (NEMITZ, TEIXEIRA e VON POSER, 2015).

Como são compostos fenólicos, as isoflavonas podem inibir oxidação ou atuar como inibidores enzimáticos. Park et al. (2002) reportou que as agliconas apresentam atividade antioxidante maior que os derivados glicosilados. Assim as isoflavonas de soja podem apresentar atividade antifúngica, pois protegem a soja competindo com os metabólitos fúngicos que podem afetar o metabolismo de glicose e lipídeos do tecido invadido (NAIM et al., 1974; PENHA, 2003), mas esta característica ainda é pouco conhecida.

3.4 Mecanismos de defesa em tecidos vegetais

Defensivos naturais, associados a variáveis bióticas e abióticas são encontrados em tecidos vegetais e o aumento natural de defesa das plantas pode aperfeiçoar a produtividade na agricultura, contribuindo para a segurança alimentar e reduzindo o intenso uso de agrotóxicos (FIGUEIRA et al., 2003; PAGNUSSATT et al., 2012). Entre os mecanismos de defesa utilizados pelas plantas, dois são importantes para a proteção contra danos ocasionados por microrganismos como os fungos, os constituídos por compostos inibidores de enzimas fúngicas e os processos oxidativos promovidos por diferentes mecanismos.

A tecnologia do uso de inibidores de enzimas digestivas como fator de resistência tem chamado a atenção de vários pesquisadores (FENG et al., 1996; PAGNUSSATT et al., 2012; 2014), principalmente a inibição das alfa amilases, que são essenciais para o desenvolvimento de insetos e microrganismos. Elas são endoenzimas que hidrolisam amido, amilose e amilopectina em suas unidades monoméricas e constituem fonte de energia para o invasor, e no caso do tecido vegetal, para sua manutenção. Os inibidores de amilase, por afetarem a disponibilidade de nutrientes para patógenos, são fundamentais para a proteção de legumes, tubérculos e cereais contra diferentes organismos (FENG et al., 1996; FIGUEIRA et al., 2003).

A atividade antioxidante de compostos extraídos de plantas também tem sido explorada para diferentes fins. No caso da soja, dentre os compostos com esta atividade estão diferentes constituintes fenólicos com potencial atividade e mecanismos distintos (BALISTEIRO; ROMBALDI; GENOVESE 2013). Os polifenóis podem atuar como antioxidantes na sua forma reduzida (por meio de eliminação de radicais pró oxidantes) ou na forma oxidada (por meio da geração de radicais reativos), tornando-se pró-oxidantes,

dependendo do ambiente. A capacidade de doar prontamente eletrons e protons e a perda de eletrons e protons na sequência constitui a base dos efeitos biológicos dos compostos fenólicos. O estresse oxidativo pode resultar a partir de fatores ambientais e climáticos desfavoráveis, tais como a exposição à luz ultravioleta, seca e ataque de agentes patogênicos (TUOMINEN, 2013).

Alguns autores têm relatado o potencial antioxidante de isoflavonas e compostos fenólicos (BALISTEIRO; ROMBALDI; GENOVESE 2013; KUMAR et al., 2010; MARKOVIC et al., 2015; TYUG; PRASAD; ISMAIL, 2010). A literatura a respeito da avaliação do potencial de defesa da soja contra o ataque de patógenos através do mecanismo de inibição enzimática por compostos fenólicos é escassa.

3.5 Fungos

Fungos são microrganismos aeróbios, altamente disseminados no meio ambiente, presentes no solo, água e ar. Todos os fungos são heterotróficos, ou seja, precisam de compostos orgânicos como fonte de energia e carbono, portanto podem ter efeitos indesejáveis para a agricultura e indústria de alimentos. Eles podem ser inativados ou retirados durante o processamento e estar ausentes no produto manufaturado, porem as toxinas produzidas por espécies toxigênicas permanecem presentes (FIGUEIRA et al., 2003).

Os fungos que ocorrem em grãos simplifadamente podem ser classificados em dois grupos, conforme o período de contaminação, de campo ou de armazenamento. No primeiro grupo, estão os do gênero *Fusarium*, que contaminam os grãos no período de pré-colheita, pois necessitam de teores de umidade de no mínimo 20% para o seu crescimento. Os fungos de armazenamento, onde se incluem *Aspergillus* e *Penicillium*, necessitam de teor de umidade, em torno de 14%, para que ocorra o crescimento micelial (GARCIA et al., 2009). Ambos os gêneros possuem espécies toxigênicas.

Estes microrganismos causam a degradação dos cereais, por consumirem os nutrientes para seu desenvolvimento, tanto no campo quanto ao longo do armazenamento, motivando a busca por alternativas que minimizem a contaminação para garantia da qualidade do produto final e diminuição do risco de deterioração destes produtos ou a produção de toxinas (ZHAO et al., 2010).

3.6 Micotoxinas

As micotoxinas são compostos produzidos pelo metabolismo secundário de fungos filamentosos sobre diversos substratos, quando submetidos a condições de estresse. Elas são

potencialmente perigosas para o homem e animais domésticos (TURNER et al., 2009), pois quando ingeridas, podem causar diversos efeitos como carcinogênico, mutagênico, teratogênico, hemorrágico, nefrotóxico, hepatotóxico, neurotóxico e imunossupressor (PEREIRA et al., 2014). As micotoxinas são contaminantes naturais de difícil controle, pois resistem a condições drásticas de pH, temperatura, luminosidade entre outras, por isso aparecem no material *in natura* e em produtos processados (BENETT; KLICH, 2003). Além disso, compreendem uma grande variedade de estruturas químicas de baixa massa molecular, agrupadas de acordo com o grau e tipo de toxicidade ao homem e animais, o que dificulta seu monitoramento (HEIDTMANN-BEMVENUTI et al., 2011).

Os principais fatores que favorecem o desenvolvimento de fungos são umidade, temperatura, período de armazenamento, nível inicial de contaminação, impurezas, insetos, concentração de CO₂, condições físicas e sanitárias dos grãos (OLIVEIRA et al., 2010). Assim como a produção de micotoxinas depende primeiramente da colonização fúngica, elas podem ser sintetizadas em qualquer época do crescimento, colheita ou estocagem de alimentos, pois os fungos possuem espécies capazes de se desenvolver ao longo de diversas condições da cadeia produtiva (GARCIA et al., 2009). Os fungos toxigênicos mais conhecidos na cadeia alimentar de humanos e animais pertencem principalmente a três gêneros: *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (VIDAL et al., 2013).

Os principais alimentos onde são encontrados fungos e suas micotoxinas são cereais, grãos e frutas. Em produtos de origem animal ocorrem quando este se alimenta com ração contaminada. Exemplos de micotoxinas de alta significância em termos de saúde pública e importância agroeconômica são as aflatoxinas, ocratoxinas, tricotecenos, zearalenona e fumonisinas (HEIDTMANN-BEMVENUTI et al., 2011).

No entanto, levantamentos de ocorrência de micotoxinas em soja são escassos. Escrivá & Manyes (2015) relatam a ocorrência de toxina T-2 em soja, Sassahara, Yanaka & Netto (2003) encontram amostras positivas quanto a presença de aflatoxinas em farelo de soja e Cançado (2004) relatou a presença de aflatoxinas em soja geneticamente modificadas em níveis maiores do que em cultivares convencionais.

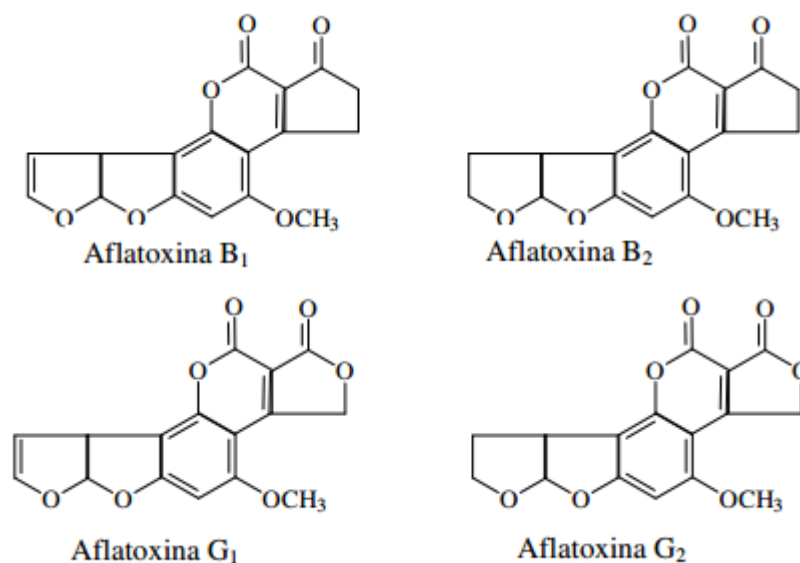
3.6.1 Aflatoxinas

Aflatoxinas são as toxinas que causam maiores danos aos seres humanos e animais, pela sua alta toxicidade e ampla ocorrência. Elas são produzidas por fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* e embora existam aproximadamente 20 compostos, todos designados aflatoxinas (ASHIQ et al., 2014), apenas as aflatoxinas B₁ (AFLAB₁), B₂

(AFLAB₂), G₁ (AFLAG₁) e G₂ (AFLAG₂), cuja nomenclatura é baseada na cor da fluorescência sob luz UV, em inglês (*blue ou green*) (TURNER et al., 2009) são encontradas naturalmente em alimentos de origem vegetal. Outros membros importantes da família das aflatoxinas são a M₁ e M₂, formas oxidadas da AFLAB₁, isoladas do leite, urina e fezes de animais (HEIDTMANN-BEMVENUTI et al., 2011).

As AFLAs B₁, B₂, G₁ e G₂ cujas estruturas são demonstradas na Figura 3, são difuranocumarínicas (PEREIRA et al., 2014), onde a AFLAB₁ é a mais tóxica e está classificada pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer, no Grupo 1 de toxicidade (IARC, 1993), porém todas podem afetar a síntese proteica, devido a sua capacidade de se ligar ao DNA, além de contribuírem para deficiência da imunidade celular, induzindo infecções em pessoas expostas a essas substâncias (MARROQUÍN-CARDONA et al., 2014).

Figura 3. Estruturas químicas das principais aflatoxinas.



Fonte: BIEHL AND BUCK, 1987

O fígado é o primeiro órgão afetado, pois promove a transformação na forma oxidada 8,9-óxido de AFLAB₁ ou AFLAB₁-epóxido, originada da epoxidação da dupla ligação do éter vinílico presente na estrutura bi-furanóide da molécula de AFLAB₁. Este composto é altamente eletrofílico, capaz de formar ligações covalentes com o DNA, RNA e proteínas. Os adutos representam a lesão bioquímica primária produzida pelas aflatoxinas (GROSS-STEINMEYER; EATON, 2012).

A AFLAB₁-epóxido pode também ser conjugada enzimaticamente com glutathione reduzida, por ação da glutathione-S-transferases, constituindo importante via de detoxificação deste composto (GROSS-STEINMEYER; EATON, 2012). A sensibilidade de uma variedade de espécies animais para o efeito tóxico de AFLAB₁, em grande parte, depende da capacidade de metabolizar os compostos reativos desta toxina pelo processo de conjugação com glutathione. A maioria das aflatoxinas são excretadas entre 72-96 h após a exposição, podendo ocorrer retenção de resíduos no fígado e no rim por mais tempo, em comparação com outros órgãos (HEIDTMANN-BEMVENUTI et al., 2011).

Os principais fatores que afetam a produção de aflatoxinas são a cepa do fungo, o substrato, teor de umidade, temperatura e umidade relativa. Condições quentes e úmidas são favoráveis para a produção de aflatoxina e podem ser proporcionadas pela má qualidade de armazenamento. Os fatores que afetam em menor proporção a produção incluem variedade de cultura, suprimento de oxigênio, interação com insetos e condições de armazenamento (BHATNAGAR et al., 2003).

A ocorrência de aflatoxinas em alimentos começou a ser estudada quando mais de 100.000 mil perus morreram na Inglaterra na década de 60, após ingestão de farelo de amendoim brasileiro (TURNER et al., 2009). De acordo com a Organização Mundial da Saúde as principais fontes de aflatoxinas na ração animal são o milho, caroço de algodão e torta de amendoim (WHO, 2002), entre outras culturas de grãos e produtos como pistache, frutas secas, nozes, especiarias, figos, óleos vegetais, sementes de cacau (OVEISI et al., 2007) e arroz (PRIETTO et al., 2015).

Os níveis máximos permitidos para aflatoxinas em alimentos e ração animal são controlados por legislação de abrangência mundial cujas doses máximas permitidas variam entre 1 e 20 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ para alimentação humana e entre 0 e 50 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ para alimentação animal (FAO, 2003). A ANVISA preconiza limite máximo de 5 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ para feijão, cereais e produtos de cereais, porém não estabelece limite específico para grãos de soja (ANVISA, 2011).

Oliveira et al. (2010) em seu estudo sobre as micotoxinas e a segurança alimentar na soja encontraram aflatoxina B₁ em grãos armazenados, sendo os valores próximos ao limite máximo legislado, e atribuíram às impurezas que são admitidas em limite de 1% na soja como a principal fonte do problema. Xie et al. (2014) e Liu et al. (2014) relataram a contaminação por aflatoxinas em molho de soja justificando-a pela presença de fungos do gênero *Aspergillus* nos grãos de soja.

No entanto, poucos são os estudos sobre ocorrência de micotoxinas em soja, principalmente por considerar que o melhoramento genético confere alta resistência as cultivares, reduzindo a ocorrência de doenças adquiridas através de insetos, pragas, plantas daninhas ou mesmo fungos (TRZECIAK, 2012).

3.6.2 Métodos de determinação de aflatoxinas

Devido às diferenças entre as estruturas das micotoxinas, não existe um método padrão de extração e quantificação do total destas em uma mesma matriz, por isso há necessidade de utilizar técnicas de separação prévias à etapa de quantificação. O desenvolvimento de métodos simples, baratos, sensíveis e específicos, baseado no fato de que são moléculas tóxicas em baixas concentrações, é fundamental para determinação confiável delas (TURNER et al., 2009; XIE et al., 2014). Para extração das aflatoxinas, estruturas apolares, são empregados solventes orgânicos de caráter mediamente polar ou apolar (PEREIRA et al., 2014; TURNER et al., 2009).

Muitos são os procedimentos descritos para a extração e clarificação dos extratos antes da identificação e quantificação de AFLAs usando métodos cromatográficos. Entre estes a cromatografia líquida acoplada à espectroscopia de massa ou fluorescência são as mais confiáveis para determinação das aflatoxinas (HOELTZ et al., 2009; PEREIRA et al., 2014; TURNER et al., 2009; VIDAL et al., 2013;), porém não é o mais acessível (BADIALE-FURLONG, 2015).

O método descrito por Soares e Rodrigues – Amaya (1989) (NEVES et al., 2009; HOELTZ et al., 2009) e o método QuEChERS (ANASTASSIADES et al., 2003; HEIDTMANN-BEMVENUTI et al., 2012; HACKBART et al., 2012) vem sendo utilizados para determinação de aflatoxinas em cereais.

O método de QuEChERS é considerado método oficial pela AOAC desde 2007 (PRESTES et al., 2009). A técnica de extração de QuEChERS foi desenvolvida por Anastassiades e colaboradores (2003) com o objetivo de estabelecer um método simplificado para efetuar preparações de amostras para detecção de multirresíduos de pesticidas em frutas e vegetais. A técnica recebe o nome de QuEChERS, pois foi desenvolvida com o objetivo de ser rápida (*quick*), fácil (*easy*), econômica (*cheap*), eficiente (*effective*), robusta (*rugged*) e segura (*safe*).

Em se tratando de soja, também não é comum encontrar na literatura estudos que apontam a validação de métodos analíticos para determinação de micotoxinas em geral. Assim, padronizar e validar método para extração de AFLAs desta matriz é imprescindível

para o estudo de susceptibilidade do grão à contaminação, relativa a variáveis bióticas deste. Cabe salientar que o elevado teor de proteínas, lipídeos e carboidratos pode ser um fator limitante para a recuperação das aflatoxinas, pois estas podem facilmente ser adsorvidas na matriz (WHITE et al., 2013), além de outros macro componentes como lipídeos e carboidratos que podem prejudicar a recuperação.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Padrões e reagentes

Os padrões de aflatoxinas (B₁, B₂, G₁ e G₂), genisteína, daidzeína, albumina, tirosina foram adquiridos da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil) com pureza > 98%. O padrão de amido foi adquirido da Merck (Darmstadt, Alemanha), e os padrões de compostos fenólicos, da Vetec. Foram utilizados acetonitrila e metanol (Backer) (pureza > 99,9%), filtro Millipore (Supelco, 58067), água ultrapura, ácido acético glacial (pureza > 99%) (Merck - Darmstadt, Alemanha), celite (Nuclear), sulfato de amônio, clorofórmio, acetato de etila, sulfato de zinco, sulfato de cobre, carbonato de sódio, iodeto de potássio, sulfato de magnésio, ácido clorídrico, 3,5 dinitrosalicílico, tricloroacético, hidróxido de sódio, hidróxido de bário, ácido fórmico, guaiacol, peróxido de hidrogênio, (Synth), cloreto de potássio, tolueno, metanol, tartarato duplo de sódio e potássio, sulfato de sódio, fosfato de sódio, acetato de sódio, ácido acético, ácido cítrico, iodo (Vetec), etanol (Alphatec), acetona, cloreto de sódio (Impex), reagente de Folin-Ciocalteau, entre outros.

4.2 Amostra

Amostras de aproximadamente 500 g de grãos de dez cultivares de soja foram coletadas; sendo uma convencional, nomeada BRS 284, cedida pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Soja, e nove variedades de soja modificadas geneticamente (OGM): Cooperfibra, Louis Dreyfus, Monsoy 6472, Monsoy 8490 e Monsoy 7639, provenientes de propriedades rurais do município de Campo Verde – MT e Intacta 5936, Intacta 7823, Tornado e Vtop, provenientes de propriedades rurais do município de São Gabriel – RS. Todas foram tomadas aleatoriamente por quarteamento nos silos de armazenamento, trituradas em liquidificador PH5000_{CL} Philco e separadas as partículas de granulometria menor que 0,5 mm que foram armazenadas em recipientes plásticos devidamente vedados com filme e congelados a -18°C para preservação até o momento em que foram analisadas, no Laboratório de Micotoxinas e Ciência de Alimentos.

4.3 Composição proximal

As determinações de umidade, proteína, lipídeos e cinzas foram realizadas de acordo com os métodos nº 935.29, nº 920.87, nº 920.85 e nº 923.03 da AOAC (2000), respectivamente. Carboidratos foram estimados por diferença. Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

4.4 Determinação de proteínas solúveis

As proteínas foram extraídas das amostras homogeneizadas e moídas (0,5 mm) com base na solubilidade em água e soluções aquosas de cloreto de sódio, etanol e hidróxido de sódio para separar as diferentes frações proteicas. Foram usados para a homogeneização das amostras o solvente extrator e dois tipos de agitação: em mesa orbital e em sonda de ultrassom, usando a técnica de extração sequencial. A 1 g de amostra foram adicionados 10 mL de água destilada. Após agitação em mesa orbital incubadora (Tecnal TE-420) (180 rpm) a 25 °C durante 30 min ou agitação em sonda ultrassônica (ULTRONIQUE 500 W) a 24 kHz por 10 min, a mistura foi centrifugada (centrífuga refrigerada CIENTEC CT-5000R) a 2240 g durante 20 min e o sobrenadante foi coletado, para a separação da fração albumina. O procedimento de extração foi repetido e o volume de 25 mL em balão volumétrico aferido com água. Ao resíduo da extração anterior foram adicionados 10 mL de NaCl 0,9% para a obtenção da fração globulina, procedendo como descrito para a extração aquosa. Da mesma forma foi realizado para as extrações de prolamina e glutelina, utilizando respectivamente solução de etanol 70% e de NaOH 0,1 mol L⁻¹ (OSBORNE, 1924). Os experimentos foram realizados em triplicata.

A quantificação das frações proteicas separadas pela solubilidade foi realizada pelo método de Lowry et al (1951), utilizando espectrofotômetro (Bioespectro SP-220) com leitura das absorbâncias a 660 nm e curva padrão de albumina de soro bovino (1 mg mL⁻¹) solubilizada em água, NaCl 0,9%, etanol 70% e NaOH (0,1 mol L⁻¹), cujas concentrações variaram entre 18 a 180 µg mL⁻¹.

4.5 Caracterização bioquímica

As cultivares de soja foram caracterizadas quanto à atividade enzimática de protease e peroxidase, para subsidiar a identificação dos mecanismos de defesa dos grãos. Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

4.5.1 Atividade de protease

O extrato enzimático para estimativa da atividade proteolítica foi obtido de acordo com Pagnussatt et al. (2013) pela solubilização de 5 g de amostra em 25 mL de NaCl 0,5%, sob agitação orbital por 60 min a 200 rpm e 37 °C. A solução foi centrifugada (Centrífuga Eppendorf 5804 R, Germany) a 9070 g por 2 min a 10 °C e o sobrenadante filtrado e medido em proveta. Ao volume filtrado, sob agitação orbital, foram adicionadas três alíquotas de

mesmo volume de acetona em intervalos de 5 min entre as adições, para purificação primária, e em seguida a solução foi congelada *overnight*. O extrato foi centrifugado a 9070 g por 10 min e 10 °C, e o precipitado dissolvido em NaCl 0,5% em balão volumétrico de 5 mL. A quantificação proteica dos extratos foi realizada pelo método de Lowry et al. (1951) com leitura das absorbâncias a 660 nm, utilizando curva padrão de albumina de soro bovino (1 mg mL⁻¹) solubilizada em água (18 a 180 µg mL⁻¹).

A atividade proteolítica foi determinada empregando albumina como substrato, medindo aminoácido livre, tendo tirosina como indicativo de hidrólise. Para a reação, foram adicionados 2,5 mL de albumina 0,5 %, 1 mL de extrato enzimático incubados em banho-maria a 37 °C por 30 min. A reação foi interrompida pela adição de ácido tricloroacético (TCA) 10 %. A seguir, a mistura foi centrifugada a 9070 g por 5 min, e uma alíquota de 3 mL do sobrenadante contendo o hidrolisado foi alcalinizada com 6 mL de hidróxido de sódio 1 mol L⁻¹ e 1 mL de reagente de Folin Ciocalteu 2 N diluído (1:2). Após repouso por 10 min, a absorbância do cromóforo foi lida em comprimento de onda de 660 nm, e a tirosina liberada estimada pela curva padrão de tirosina (20 a 200 µg mL⁻¹). A atividade específica de protease (UA) foi calculada conforme a Equação 1:

$$UA = \frac{\mu\text{g tirosina liberada}}{\text{mg de proteína} \cdot \text{min}} \quad (1)$$

4.5.2 Atividade de peroxidase

O extrato enzimático foi obtido de acordo com Feltrin (2013) pela solubilização de 2,5 g de soja em 25 mL de tampão fosfato pH 4,7 – 10 mM, sob agitação orbital por 60 min a 100 rpm. A solução foi centrifugada (Centrífuga Eppendorf 5804 R, Germany) a 9070 g por 10 min a 10 °C e o sobrenadante foi filtrado para balão volumétrico de 25 mL, cujo volume foi aferido com água. A quantificação proteica dos extratos foi realizada pelo método de Lowry et al. (1951) com leitura das absorbâncias a 660 nm, utilizando curva padrão de albumina de soro bovino (1 mg mL⁻¹) solubilizada em água (18 a 180 µg mL⁻¹).

A determinação da atividade enzimática do extrato foi adaptada de Devaiah; Shetty (2009), em que a reação foi composta por 2 mL de água; 1,5 mL de tampão fosfato 5 mM pH 5,5; 0,5 mL de guaiacol 1%, 1 mL de peróxido de hidrogênio 0,08% e 1 mL de extrato enzimático da amostra. A absorbância do produto formado foi lida em espectrofômetro a 470 nm, após 10 min de reação. Uma unidade de atividade da peroxidase representa a

quantidade de enzima que catalisa a oxidação de 1 μmol de guaiacol em 1 min, de acordo com a Equação 2, descrita por Zeraik et al. (2008):

$$\frac{U}{\text{mL}} = \frac{\text{Abs.FD.V.}10^6}{\epsilon.d.t} \quad (2)$$

Onde:

U mL^{-1} : unidade de atividade da peroxidase por mL de extrato; A: absorvância; FD: fator de diluição (diluição do extrato enzimático); V: volume total do tubo de reação (mL); 10^6 : conversão de mol para μmol ; ϵ : absortividade molar do guaiacol ($12000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$); d: tamanho horizontal da cubeta (cm); t: tempo de reação (min).

A atividade específica (U mg^{-1}) foi estimada pela razão entre atividade da enzima (U mL^{-1}) e o teor de proteína solúvel (mg mL^{-1}) de cada cultivar de soja.

4.6 Determinação das frações fenólicas

As frações fenólicas foram separadas em frações solúveis em metanol, solúveis em etanol e insolúveis em etanol. Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

4.6.1 Fração fenólica solúvel em metanol (FFM)

A extração da fração fenólica solúvel em metanol foi adaptada de Schmidt et al. (2014), a partir de 2 g de amostra adicionadas de 20 mL de metanol e submetidas à agitação em sonda ultrassônica (ULTRONIQUE 500 W) a 62 kHz por 30 min. O solvente foi evaporado em evaporador rotativo Fisoaton (60 Hz, 70 W) a 50 °C a 80 rpm e o extrato foi ressuspensão em água e clarificado com soluções de hidróxido de bário 0,1 mol L^{-1} e de sulfato de zinco 5%. Após 10 min de repouso, o extrato foi centrifugado (Centrífuga Eppendorf 5804 R, Germany) a 9070 g por 10 min a 10 °C e filtrado para balão volumétrico de 25 mL cujo volume foi aferido com água destilada. A quantificação da fração fenólica foi realizada por método espectrofotométrico adaptado de Souza et al. (2009), utilizando 1 mL do extrato, adicionados de 4,5 mL de solução alcalina (Na_2CO_3 4%, CuSO_4 2% e tartarato duplo de sódio e potássio 4%, proporção de 100:1:1) e 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu 2 N diluído em água destilada (1:2). A absorvância foi medida em comprimento de onda de 750 nm, utilizando curva padrão de ácido gálico (2,5 – 13,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$) para estimativa do conteúdo fenólico da fração metanólica.

4.6.2 Fração fenólica solúvel em etanol (FFE)

A extração da fração fenólica solúvel em etanol foi adaptada de Scaglioni et al. (2014), a partir de 3 g de amostra as quais foram adicionadas de 10 mL de etanol 80% e submetidas à agitação orbital a 200 rpm por 10 min. O extrato foi centrifugado (Centrífuga Eppendorf 5804 R, Germany) a 9070 g por 10 min a 10 °C, filtrado e recolhido o sobrenadante em balão de 25 mL. Este procedimento foi repetido por mais 2 vezes e o volume do balão aferido com etanol 80%. A quantificação dos compostos fenólicos livres foi realizada por método espectrofotométrico adaptado de Souza et al. (2009), descrito no item 4.6.1.

4.6.3 Fração fenólica insolúvel em etanol (FFI)

A extração da fração fenólica insolúvel em etanol foi adaptada de Scaglioni et al. (2014). Inicialmente 10 mL de hexano foram adicionados ao resíduo resultante da extração da fração fenólica solúvel em etanol e a mistura foi submetida à agitação orbital a 200 rpm por 10 min em temperatura ambiente, e em seguida centrifugada (Centrífuga Eppendorf 5804 R, Germany) a 9070 g por 10 min a 10 °C. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foram adicionados 60 mL de NaOH 4 mol L⁻¹, seguido de agitação orbital a 200 rpm por 4 h. O pH foi ajustado para 1 com HCl 6 mol L⁻¹, o extrato foi centrifugado a 9070 g por 30 min a 10 °C e então filtrado para funil de separação. Foram realizadas 3 partições de 30 mL com acetato de etila. A fração acetálica foi filtrada em erlenmeyer com aproximadamente 1 g de sulfato de sódio anidro adicionados no funil, em seguida foi evaporada em evaporador rotativo a 55 °C e 80 rpm e ressuspensa em 10 mL de etanol 80% em balão volumétrico. A quantificação dos compostos fenólicos livres foi realizada por método espectrofotométrico adaptado de Souza et al. (2009), descrita no item 4.6.1.

4.6.4 Avaliação do perfil de ácidos fenólicos

Para determinar a composição de ácidos fenólicos nas frações fenólicas, foi padronizado método de identificação e quantificação dos ácidos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE (Shimadzu LC-10), acoplado de detector de UV visível e coluna Discovery Bio Wide Pore C18 (5 µm, 25 cm x 4,6 mm). A fase móvel foi composta por gradiente de mistura de metanol e água ultrapura acidificada (ácido acético glacial 1%), sendo: 0 min= 30% metanol; 6 min= 40% metanol; 12 min= 50% metanol; 18 min= 60% metanol e 24 min= 30% metanol, com vazão de 0,7 mL min⁻¹ e temperatura de coluna de 35°C em tempo de corrida de 30 min, utilizando os comprimentos de onda de detecção de 280

nm até 15 min para determinação dos ácidos gálico, protocatecólico, clorogênico, hidroxibenzóico, cafeico, seríngico e vanilina, e 320 nm até 30 min, para determinação dos ácidos cumárico, ferúlico e quercetina (SCAGLIONI, et al. 2014). O sobrenadante dos extratos foi diluído na fase móvel e centrifugado a 1400 g (Eppendorf Centrifuge 5410, Hamburg, Germany) antes da injeção.

Os parâmetros de calibração do método cromatográfico avaliados foram a linearidade e os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ). A linearidade foi avaliada pela construção de curva analítica que foi estimada por dissolução de padrões na mistura de solventes que compõe a fase móvel, injetadas no cromatógrafo líquido em triplicata, sendo o primeiro ponto da curva a concentração correspondente ao LQ para garantia da confiabilidade das estimativas a partir da curva padrão. O LD do instrumento foi estimado injetando soluções padrão de ácidos fenólicos em ordem decrescente de concentração, considerando o LD pico com relação 3:1 e o LQ relação 10:1 vezes a área do ruído (INMETRO, 2003).

4.7 Determinação de isoflavonas

4.7.1 Preparo de padrões

Soluções padrão de daidzeína e genisteína foram preparadas a partir da dissolução dos padrões sólidos em metanol. Soluções estoque de 2 mg mL⁻¹ foram preparadas, secas sob atmosfera de nitrogênio, acondicionadas em frasco âmbar envolvidos com papel alumínio e armazenadas sob congelamento. Soluções de trabalho de 100 µg mL⁻¹ foram preparadas para uso durante as determinações. As soluções foram quantificadas por CLAE-UV (SHAO et al., 2011).

4.7.2 Condições cromatográficas

A identificação e quantificação de isoflavonas nos extratos hidrolisados foi realizada de acordo com adaptações realizadas a partir do protocolo de Klejdus et al. (2004) em cromatógrafo líquido Shimadzu (LC-10) acoplado a detector de UV visível e coluna Discovery Bio Wide Pore C18 (5 µm, 25 cm x 4,6 mm). A fase móvel foi composta por água ultrapura acidificada (ácido acético glacial 1%) e acetonitrila na proporção 50:50 (v/v), com vazão de 0,8 mL min⁻¹, temperatura da coluna de 40 °C em tempo de corrida de 10 min, conforme testes preliminares. Para a quantificação das isoflavonas o sobrenadante dos extratos foi diluído na fase móvel, centrifugado a 1400 g (Eppendorf Centrifuge 5410, Hamburg, Germany), filtrado em membrana de nylon 45 µm (Sartorius) e injetado em

cromatógrafo. As isoflavonas foram detectadas a 262 nm e quantificadas a partir de curvas padrão de daidzeína (0,005 a 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e genisteína (0,005 a 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

4.7.3 Otimização do método de extração de isoflavonas

A extração de isoflavonas foi realizada em triplicata, de acordo com o método adaptado de Rostagno (2003) em que a 0,5 g de soja previamente moída e desengordurada foram adicionados 25 mL de etanol e a mistura foi submetida à agitação em sonda ultrassônica (ULTRONIQUE 500 W), centrifugada (Centrífuga Eppendorf 5804 R, Germany) a 9070 g por 10 min a 10°C e filtrada em balão volumétrico de 25 mL, cujo volume foi aferido com etanol. Após extração foi realizada hidrólise ácida dos extratos de isoflavonas com HCl em estufa com circulação forçada de ar, para obtenção das agliconas daidzeína e genisteína. As condições ótimas de extração e hidrólise foram definidas por meio de planejamento experimental do tipo fracionado 2^{6-2} e as agliconas foram separadas e quantificadas por CLAE-UV.

Os níveis estudados para cada variável foram escolhidos com base na literatura e testes preliminares. A Tabela 1 apresenta os valores reais a serem testados para cada nível, sendo a resposta, os teores das isoflavonas daidzeína e genisteína presentes nos extratos em $\mu\text{g g}^{-1}$.

Tabela 2. Níveis reais e codificados das variáveis do planejamento experimental fracionado 2^{6-2} para extração e hidrólise de isoflavonas.

Variáveis independentes	Níveis codificados			Referência
	-1	0	1	
	Níveis reais			
Concentração do solvente (%)	30	50	70	ROSTAGNO et al., 2003
Tempo de agitação (min)	10	20	30	ROSTAGNO et al., 2003
Frequência (kHz)	24	40	56	PANANUN et al., 2012
Concentração do ácido (mol L^{-1})	1	2	3	SHAO et al., 2011
Tempo de hidrólise (min)	20	40	60	CÉSAR et al., 2006
Temperatura de hidrólise (°C)	70	85	100	SHAO et al., 2011

A partir da resposta deste planejamento, foi desenvolvido um planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} , para testar o efeito das variáveis tempo de agitação (x_2), frequência da sonda

ultrassônica (x_3), tempo de hidrólise (x_5) e temperatura de hidrólise (x_6), nos mesmos níveis do primeiro planejamento, totalizando 8 experimentos além da adição de 4 pontos centrais. Por fim, a partir deste foi feito um planejamento do tipo delineamento composto central rotacional 2^3 , para avaliação dos efeitos das variáveis tempo de agitação (x_2), frequência da sonda ultrassônica (x_3) e temperatura de hidrólise (x_6), com adição de pontos axiais e pontos centrais, totalizando 18 experimentos. A partir deste delineamento foram construídas as superfícies de resposta para determinação da condição ótima de extração e hidrólise.

4.7.4 Validação do método

A linearidade do método cromatográfico foi avaliada pela construção de curva analítica que foi estimada por dissolução de padrões na mistura de solventes que compõe a fase móvel, injetadas no cromatógrafo líquido em concentrações que variaram entre 0,005 a 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para as isoflavonas daizeína e genisteína, injetadas em triplicata, sendo 0,005 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a concentração correspondente ao LQ para garantir a confiabilidade das estimativas a partir da curva padrão.

Para avaliar a seletividade da coluna para separar as isoflavonas, foram preparadas soluções de daidzeína e genisteína no extrato de soja obtido na condição ótima de extração, de forma a obter concentrações de ambas que variaram entre 0,5 a 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O efeito de matriz foi calculado, conforme descrito na Equação 3 (MATUSZEWKI et al., 2003):

$$EM = \frac{A_a}{A_p} \cdot 100 \quad (3)$$

Onde:

A_a : Área da amostra fortificada.

A_p : Área do padrão.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do instrumento foram estimados injetando soluções padrão das isoflavonas em ordem decrescente de concentração, considerando o LD pico com relação 3:1 e o LQ relação 10:1 vezes a área do ruído (INMETRO, 2003). Os limites de detecção e quantificação do método foram estimados com base nas diluições do procedimento de preparo da amostra.

A exatidão foi avaliada usando porcentagem de recuperação em amostras fortificadas com três níveis de mistura de isoflavonas 1,5, 2,5 e 5,0 $\mu\text{g g}^{-1}$ (3, 5 e 10 vezes o LQ). Amostras fortificadas e não fortificadas foram deixadas em repouso durante 24 horas antes da

extração. A porcentagem de recuperação foi calculada através da Equação 4. A precisão foi avaliada através da repetibilidade, verificada em 9 determinações sucessivas dos ensaios de recuperação de isoflavonas por CLAE-UV. Os resultados foram expressos como coeficiente de variação entre os resultados obtidos (ANVISA, 2003).

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{C1-C2}{C3} \cdot 100 \quad (4)$$

Onde:

C1: Concentração determinada após a fortificação

C2: Concentração determinada na amostra não fortificada

C3: Concentração de padrão adicionado na fortificação

A eficiência da separação dos picos cromatográficos foi avaliada pelo fator de retenção e fator de separação, conforme as Equações 5 e 6 (SOARES, 2006).

$$k = \frac{t_r - t_m}{t_r} \quad (5)$$

Onde:

t_r : tempo de retenção do composto

t_m : tempo morto

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad (6)$$

Onde:

k_2 : fator de retenção do composto 2

k_1 : fator de retenção do composto 1

4.8 Avaliação da atividade antioxidante de compostos fenólicos e isoflavonas

O potencial de inibição do processo oxidativo dos extratos contendo as frações fenólicas solúvel em metanol, em etanol, insolúvel em etanol e de isoflavonas (itens 4.61 a 4.6.3 e 4.7) extraídas das 10 cultivares de soja estudadas foi avaliado por dois ensaios no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande, e estão descritos nos itens 4.8.1 e 4.8.2. O potencial de inibição da oxidação foi avaliado empregando os extratos inibidores em três concentrações, correspondentes a 50, 75 e 100% de cada extrato separadamente.

4.8.1 Inibição do radical DPPH

O método de inibição do DPPH baseia-se na transferência de elétrons da substância antioxidante para o radical livre, que passa da cor púrpura para amarelo, conforme é consumido. Em microplacas de poços de acrílico foram acrescentados 190 µL de extrato inibidor e 10 µL de solução de DPPH 0,002 mM. O consumo do radical foi monitorado em leitor de microplacas (TP Reader NM Thermoplate) a 490 nm em intervalos de 10 em 10 min durante 1 h. As leituras das reações foram subtraídas das leituras das amostras sem solução de DPPH, a fim de eliminar o efeito da amostra na absorbância, e subtraídas da amostra do controle, relativo ao poço contendo apenas solução de DPPH. A porcentagem de inibição foi estimada de acordo com a Equação 7 (OLIVEIRA et al., 2012) e expressa como % de inibição específica, pela Equação 8.

$$\% \text{ inibição} = \frac{\text{Abs controle} - \text{Abs amostra}}{\text{Abs controle}} \cdot 100 \quad (7)$$

$$\% \text{ inibição específica} = \frac{\% \text{ inibição}}{\mu\text{g de extrato}} \quad (8)$$

4.8.2 Inibição da atividade da enzima peroxidase (PO)

A enzima PO foi obtida a partir de 10 g de batata (*Solanum tuberosum* L.) trituradas em liquidificador com 100 mL de NaCl 0,9%. O extrato foi centrifugado (Centrífuga Eppendorf 5804 R, Germany) a 9070 g por 10 min a 4° C e filtrado. Ao sobrenadante foram adicionados 30 mL de acetona para purificação primária e o extrato foi novamente centrifugado a 9070 g por 10 min a 4 °C. O precipitado foi ressuspensão em 10 mL de NaCl 0,9% em balão volumétrico. A atividade inicial de peroxidase e a quantificação proteica foram determinadas conforme descrito no item 5.5.2, sendo a atividade específica inicial do extrato de 17,3 U mg⁻¹ de proteína .

O potencial de inibição da atividade de peroxidase foi avaliado em ensaio realizado nas condições descritas no item 5.5.2, cujos volumes foram adaptados para microplaca de poços de acrílico, adicionando os extratos inibidores. O decréscimo da atividade da enzima foi medido em leitor de microplacas a 490 nm em intervalos de 10 em 10 min durante 1 h. A leitura final foi descontada do controle, relativo ao poço contendo reação enzimática na ausência de inibidor. Foi calculada a atividade específica de peroxidase em cada poço, de

acordo com a Equação 2. A porcentagem de inibição foi calculada de acordo com a Equação 9 (OLIVEIRA et al., 2012) e expressa como % de inibição específica, pela Equação 8.

$$\% \text{ inibição} = \frac{\text{Atividade inicial-atividade final}}{\text{Atividade inicial}} \cdot 100 \quad (9)$$

4.9 Avaliação das frações fenólicas como inibidores enzimáticos

O potencial de inibição da atividade da enzima alfa amilase comercial (Fungamyl® 800L, CEE 2006/ 121, Novozymes Latin América, Paraná, Brasil) produzida por *Aspergillus oryzae*, a partir de extratos de frações fenólicas solúveis em metanol, etanol, insolúveis em etanol e isoflavonas (itens 4.6.1 a 4.6.3 e 4.7) obtidos das 10 cultivares de soja foi avaliado.

A atividade inicial da amilase fúngica foi determinada em meio reacional contendo 1 mL de substrato de amido 0,4% e 1 mL de tampão de ácido cítrico-fosfato de sódio 0,1M (pH 6,0). A mistura foi incubada em banho termostático por 5 min e em seguida foi adicionado 1 mL de solução de amilase comercial 1:5 (v/v) (0,29 mg amido mg proteína⁻¹ min⁻¹). A reação foi interrompida pela adição de HCl 0,1 mol L⁻¹ e o amido residual determinado por iodometria, adicionando solução de iodo (0,3% em solução de KI 3%). O meio reacional foi diluído em água a 10 mL e a absorbância do complexo amido-iodo medida em espectrofotômetro a 620 nm. O amido residual foi estimado a partir de curva padrão de amido (2 a 15 µg mL⁻¹). A quantidade de amido hidrolisado foi calculada pela diferença entre as medidas de absorbância da solução controle (tempo zero) e da reação enzimática, sendo o controle o meio reacional em que foi adicionado HCl antes da solução enzimática de modo a impedir sua atividade.

A quantificação proteica dos extratos foi realizada pelo método de Lowry et al (1951) conforme descrito no item 4.5.1 A atividade específica (UA) da enzima foi expressa em mg amido mg de proteína⁻¹ min⁻¹ de acordo com a Equação 10 (PAGNUSSATT et al., 2012):

$$\text{UA amilase} = \frac{\text{conc. inicial de amido} - \text{conc. final de amido}}{\text{mg de proteina} \cdot \text{min}} \quad (10)$$

Para o ensaio de inibição da enzima, utilizando os extratos estudados, foram adicionados ao meio reacional três concentrações, referentes a 0,1, 0,5 e 1 mL de cada extrato. O controle ou concentração inicial de amido foi considerado como 100% de amido e a

porcentagem de inibição foi calculada de acordo com a Equação 9 e expressa como % de inibição específica, pela Equação 8. Foi estimada a concentração necessária de cada extrato para inibir em 50% a atividade inicial de amilase, através da construção de curva relacionando a concentração de ácido fenólico contra percentual de inibição de cada fração correspondente, sendo o valor de y da equação referente ao percentual de 50% e o valor de x a concentração correspondente a esta inibição, a ser estimada.

4.10 Determinação de aflatoxinas

4.10.1 Preparo de padrões

Soluções padrão de AFLAs foram preparadas pela dissolução dos padrões sólidos em mistura de benzeno:acetonitrila (98:2 v/v). As concentrações teóricas das soluções estoque foram de $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ para as AFLAs (B_1 , B_2 , G_1 e G_2), separadamente. Esses padrões foram diluídos para o preparo de soluções padrão de $10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. As soluções foram secas sob atmosfera de nitrogênio e ressuspendidas em benzeno para a determinação das concentrações exatas em espectrofotômetro 350 nm para todas as AFLAs. Para a estimativa das concentrações foram utilizados os valores de absorvidade molar (ϵ) 19800, 20900, 17100, 18200 $\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para as AFLAs B_1 , B_2 , G_1 e G_2 , respectivamente, utilizando a Equação 11. Após a quantificação foram preparadas soluções de trabalho de 20 ng mL^{-1} de cada AFLA. Todas as soluções foram armazenadas a $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ (AOAC, 2000).

$$\mu\text{g micotoxina mL}^{-1} = \text{abs.PM.1000.FC.}\epsilon^{-1}.\text{b}^{-1} \quad (11)$$

Onde:

abs = valor da absorvância da solução padrão;

PM = peso molecular da micotoxina em estudo;

FC = fator de correção do instrumento;

ϵ = absorvidade molar característica de cada aflatoxina

b = largura da cubeta (cm)

4.10.2 Condições cromatográficas

A identificação e quantificação de AFLAs nos extratos foi realizada de acordo com adaptações feitas a partir do trabalho de Calori-Domingues et al. (2010) utilizando

cromatógrafo líquido Shimadzu (LC-10) acoplado a detector de fluorescência (FL), unidade de derivatização pós coluna (Romer®) para determinação sensível de aflatoxinas B₁ e G₁, através de irradiação de luz UV 254 nm, e Coluna Kromasil C18 (5 µm, 15 cm x 4,6 mm). A fase móvel foi composta por água ultrapura, metanol e acetonitrila na proporção 60:25:15 (v/v/v), desgaseificados em banho ultrassônico, com vazão de 1 mL min⁻¹, temperatura da coluna de 40 °C e tempo de corrida de 20 min. O sobrenadante dos extratos foi diluído em mistura de água ultrapura e acetonitrila (9:1), centrifugado a 1400 g (Eppendorf Centrifuge 5410, Hamburg, Germany), filtrado em membrana de nylon 45 µm (Sartorius) antes da injeção. As AFLAs foram detectadas em comprimentos de onda de excitação de 362 nm e de emissão de 440 nm.

4.10.3 Extração de aflatoxinas

A extração de AFLAs B₁, B₂, G₁ E G₂ foi realizada seguindo dois métodos propostos por Anastassiades et al (2003), e por Soares e Rodrigues-Amaya (1989) conforme protocolo descrito nos itens 4.10.3.1 e 4.10.3.2.

4.10.3.1 Método de QuEChERS

Foram solubilizadas 10 g de amostra em 20 mL de água destilada, a mistura foi agitada e 20 mL de acetonitrila acidificada (1% ácido acético glacial) foram adicionados, em tubo de centrífuga. A mistura foi agitada em mesa horizontal a 200 rpm por 20 min e após foi realizada a partição entre água e fase orgânica, através da adição de 4 g de MgSO₄ (previamente incinerado em mufla a 500 °C por 3 h para eliminar ftalatos) e 1 g de NaCl. O extrato foi agitado por 2 min em vortex e centrifugado por 10 min a 9070 g a 10 °C. Em 10 mL de sobrenadante foi realizada a etapa de limpeza do extrato, pela adição de 0,3 g de sulfato de magnésio e 0,2 g de celite com agitação em vortex por 30 s. Após centrifugação por 5 min a 9070 g a 10 °C foi coletada alíquota de 3 mL do sobrenadante, seca em banho termostático a 65 °C (ANASTASSIADES et al, 2003).

4.10.3.2 Método de Soares e Rodrigues-Amaya

À massa de 10 g de amostra foram adicionados 60 mL de solução de metanol:cloreto de potássio 4% (9:1) homogeneizando em blender por 2 min. A solução foi filtrada e 30 mL do extrato foi recolhido em erlenmeyer, aos quais foram adicionados 30 mL de sulfato de amônio 30% e aproximadamente 1 g de celite e a mistura foi agitada levemente. Após

repouso por 5 min, 30 mL da solução foram filtrados e recolhidos em funil de separação; onde foram adicionados 30 mL de água destilada. Após realização de três partições com 10 mL de clorofórmio, 10 mL de extrato foram evaporados em banho termostático a 80°C (PRIETTO et al., 2015 adaptado de SOARES; RODRIGUEZ-AMAYA, 1989).

4.10.4 Validação de método

Os métodos foram avaliados quanto a linearidade do instrumento pela construção de curva analítica através da dissolução de padrões em mistura de água ultrapura e acetonitrila (9:1) injetados em CLAE-FL, em triplicata para as quatro AFLAs, sendo o primeiro ponto da curva a concentração correspondente ao LQ para garantia da confiabilidade das estimativas a partir da curva padrão.

Para avaliar a seletividade na determinação das AFLAs foram preparadas curvas no extrato da matriz, adicionando-se as mesmas concentrações das curvas com solvente. O efeito de matriz foi calculado, conforme descrito na Equação 3 do item 4.7.4 (MATUSZEWKI et al., 2003).

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do instrumento foram estimados pela injeção de soluções padrão das AFLAs em ordem decrescente de concentração, considerando o LD pico com relação 3:1 e o LQ relação 10:1 vezes a área do ruído (INMETRO, 2003). Os limites de detecção e quantificação do método foram estimados com base nas diluições do procedimento de preparo da amostra.

A exatidão foi avaliada pela porcentagem de recuperação em amostras contaminadas com três níveis de mistura de AFLAs (3, 5 e 8 vezes o LQ) sendo eles 2,0, 3,3 e 5,3 ng g⁻¹ para as AFLAs B₁ e G₂, 6,0, 10,0 e 16,0 ng g⁻¹ para a AFLAG₁ e 1,4, 2,3 e 3,7 ng g⁻¹ para AFLAB₂. Amostras contaminadas e não contaminadas foram deixadas em repouso durante 24 h antes da extração. A porcentagem de recuperação foi calculada pela Equação 4 (item 4.7.4). A precisão foi avaliada através da repetibilidade, verificada por 3 determinações em triplicata sucessivas das soluções de extrato empregadas para estimar a recuperação de aflatoxinas por CLAE-FL e os resultados foram expressos como coeficiente de variação entre os resultados obtidos (ANVISA, 2003).

A eficiência da separação dos picos cromatográficos foi avaliada pelo fator de retenção e fator de separação, conforme as equações 5 e 6 (item 4.7.4) (SOARES, 2006). A avaliação do método de extração mais eficiente foi feita através dos percentuais de recuperação e de repetibilidade de cada um.

4.10.5 Confirmação da presença de aflatoxinas

Os extratos das dez cultivares de soja quantificados por CLAE-FL foram submetidos à análise em cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a detector de massas (CLAE-MS) para confirmar a presença de AFLAB₁ nas amostras, de acordo com Hackbart (2013). O cromatógrafo utilizado foi Alliance Separations modelo 2695 Waters (Milford, MA, USA) equipado com amostrador automático, bomba quaternária, sistema de desgaseificação, Detector MS, Micromass® Quatro Micro™ API Waters com fonte API, utilizando o modo de ionização por Electrospray, Sistema de aquisição de dados através do software Masslynx 4.0 Waters e coluna analítica XTerra® MS C18 3,5 µm 144 Å (50 × 3 mm d.i.).

A fase móvel utilizada foi composta por acetonitrila e água ultrapura, ambos com 0,1% de ácido acético com eluição no modo gradiente (Tabela 2) e vazão de 0,4 mL min⁻¹.

Tabela 3. Gradiente de eluição da fase móvel para determinação de AFLAs por CLAE-MS.

Tempo (min)	Acetonitrila (%)	Água (%)
0	18	82
3	45	55
3,8	100	0
4,3	18	82
10	18	82

A temperatura da fonte empregada foi de 120 °C, a temperatura do gás de dessolvatação foi de 400 °C e as vazões do gás nitrogênio para dessolvatação da amostra e para o cone da amostra, respectivamente 500 e 100 L h⁻¹. A Tabela 3 apresenta as condições de fragmentação para AFLAB₁.

Tabela 4. Condições de fragmentação de AFLAB₁ para confirmação por CLAE-MS.

	Massa Molar	ESI	Transição (m/z) Íon precursor → Íon produto	Voltagem do cone (V)	Energia de colisão (eV)
AFLAB1	312,3	+	313>241*	45	37
			313>285	45	20

*Transições utilizadas para quantificação.

4.11 Análise estatística

Os dados obtidos em cada experimento foram avaliados com auxílio do programa computacional *Statistica* 6.0 através de análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey para comparação de médias ao nível de 95% de confiança. A otimização do método de extração de

isoflavonas foi realizada por planejamentos experimentais fracionado e completo e análise de superfície de resposta. A Análise de Componentes Principais (ACP) foi realizada utilizando o software *Past* (folk.uio.no/ohammer/past) estabelecendo as correlações entre a composição das amostras e a ocorrência de aflatoxinas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As cultivares de soja são provenientes de diferentes regiões, cujas características de origem geográfica, tecnológica e grupo de maturação estão apresentadas na Tabela 5, e são usualmente empregadas para processamento industrial. Elas são classificadas mais frequentemente em grupos que representam seu ciclo de maturação, sendo até tipo 6 consideradas de ciclo super precoce, de 6 a 6,5 são precoces, de 7 a 8 as de ciclo médio ou normal e acima de 8 são de ciclo tardio. Cada aumento de 0,1 no valor corresponde a aproximadamente 1,5 a 2 dias de maturação (EMBRAPA, 2000).

Tabela 5. Características de origem tecnológica, geográfica e grupo de maturação das amostras de soja.

Cultivar	Empresa	Origem	Grupo de Maturação
Monsoy 6972	Monsanto	Campo Verde/MT	6,4
Monsoy 8490	Monsanto	Campo Verde/MT	8,4
Monsoy 7639	Monsanto	Campo Verde/MT	7,6
Intacta 5936	Monsanto	São Gabriel/RS	5,9
Intacta 7823	Monsanto	São Gabriel/RS	7,8
VTOP	Syngenta	São Gabriel/RS	5,9
Tornado	Brasmax	São Gabriel/RS	6,2
Misturas de OGM1	Cooperfibra	Campo Verde/MT	-
Misturas de OGM2	Louis Dreyfus	Campo Verde/MT	-
BRS 284	Embrapa	Londrina/PR	6,5

OGM = organismos geneticamente modificados

Com exceção da cultivar BRS 284, todas as outras são modificadas pela tecnologia *Roundup Ready*® (RR), portanto, resistentes ao herbicida glifosato.

5.1 Composição proximal

A composição química da soja é influenciada por fatores climáticos e ambientais, além dos específicos de cada cultivar e das modificações genéticas sofridas (ESTEVEZ et al., 2010). A contaminação dos grãos por fungos também é influenciada pela composição do grão, pois ela propicia aos microrganismos os nutrientes necessários para seu desenvolvimento (PAGNUSSATT et al., 2014). As cultivares de soja estudadas foram caracterizadas quanto a seus componentes majoritários (Tabela 6) e os resultados foram analisados estatisticamente para avaliação das diferenças entre os componentes das cultivares de soja.

Tabela 6. Composição proximal das amostras de soja em base seca (g 100 g⁻¹).

Cultivar	Lípídeos	Cinzas	Proteínas	Carboidratos²
Cooperfibra	27,5 ^a (1,1)	5,3 ^a (0,6)	35,1 ^{abcd} (2,4)	32,2 ^{bcd} (3,4)
Louis Dreyfus	28,6 ^a (1,1)	5,3 ^a (0,5)	36,8 ^{abc} (1,8)	29,3 ^d (3,3)
Monsoy 6972	25,4 ^{bc} (4,2)	5,1 ^a (2,1)	34,3 ^{bcd} (2,4)	35,3 ^{ab} (7,1)
Monsoy 8490	24,9 ^{cd} (1,0)	5,3 ^a (0,3)	37,6 ^{ab} (2,7)	32,2 ^{bcd} (3,9)
Monsoy 7639	25,4 ^{bc} (4,3)	4,7 ^b (2,8)	34,7 ^{bcd} (2,8)	35,3 ^{ab} (4,2)
Intacta 5936	27,6 ^a (1,5)	5,3 ^a (1,2)	37,0 ^{ab} (2,2)	30,1 ^{cd} (3,8)
Tornado	22,9 ^d (0,9)	5,2 ^a (1,8)	33,5 ^{cd} (1,2)	38,4 ^a (1,3)
Vtop	28,0 ^a (3,9)	5,4 ^a (0,5)	36,5 ^{abc} (4,4)	30,1 ^b (1,8)
Intacta 7823	27,4 ^a (1,9)	5,4 ^a (2,8)	38,2 ^a (3,1)	28,9 ^d (3,0)
BRS 284	27,6 ^a (1,3)	5,3 ^a (0,2)	33,0 ^d (3,8)	33,9 ^{bc} (3,9)

¹ Resultados expressos como média e coeficiente de variação (5%). Médias na mesma coluna seguidas de letras diferentes indicam diferença significativa pelo Teste de Tukey (p<0,05).

² Estimados por diferença dos componentes determinados.

A composição proximal dos grãos de soja foi semelhante aos valores encontrados por outros autores (ESTEVEZ et al., 2010; FERREIRA et al., 2013). Segundo Nam et al., (2016), com relação à alteração genética, a composição química do grão de soja é considerada importante sob o ponto de vista de segurança alimentar, pois o balanço de nutrientes deve ser mantido de forma que o ideal é que haja uma equivalência entre soja convencional e soja modificada geneticamente em seus percentuais de macro constituintes.

A cultivar de soja convencional, BRS 284 apresentou teores de lipídeos semelhantes aos das cultivares transgênicas Cooperfibra, Louis Dreyfus, Intacta 5936, Intacta 7823 e Vtop, e teores de proteínas semelhantes aos das cultivares Cooperfibra, Monsoyb 6972, Monsoy 7639 e Tornado. Para os carboidratos, foi verificada semelhança entre a cultivar convencional e 6 das 9 cultivares transgênicas. Estes resultados corroboram com a afirmação do autor, a respeito da segurança do consumo de soja geneticamente modificada, sob o ponto de vista de macro componentes.

A modificação genética da soja visa principalmente torná-la resistente ao herbicida glifosato, que causa a inibição da via de produção de aminoácidos aromáticos. O metabolismo de aminoácidos é um dos principais responsáveis pela resistência ao estresse em plantas, e o uso do glifosato aumenta os teores de aminoácidos em sojas resistentes (MOLDES et al., 2012).

O percentual de umidade da cultivar BRS 284 (7,0 g 100 g⁻¹) foi significativamente menor do que os das cultivares geneticamente modificadas. Agelet et al., (2013) estudaram umidades percentuais em cultivares de soja convencional e suas respectivas formas OGM, e verificaram que as OGM apresentavam maior teor de umidade que as convencionais. A maior

higroscopicidade foi atribuída ao fato de que embora a modificação não promova alteração quanto aos nutrientes principais (proteína, lipídeos e carboidratos), ela altere componentes minoritários, os tipos de aminoácidos que são produzidos para conferir resistência ou a relação lignina-celulose, aumentando a retenção de água pelo grão, explicando o menor teor de umidade encontrado na soja BRS 284 em comparação com as cultivares geneticamente modificadas.

5.2 Proteínas solúveis

Osborne (1924) desenvolveu protocolo de extração sequencial de frações proteicas em vegetais que é utilizado para avaliação da solubilidade de proteínas até hoje. O protocolo de Osborne entretanto, depende de tempo prolongado e muitas etapas analíticas, o que afeta a reprodutibilidade dos resultados. Apesar da quantidade e importância das proteínas da soja, são poucos os estudos que avaliaram as frações proteicas de acordo com sua solubilidade em água e diferentes soluções aquosas.

Proteínas de soja são geralmente solúveis em água e, principalmente as proteínas hidrossolúveis despertam interesse para o processamento e consumo humano. Assim, a distribuição das frações proteicas é usada para avaliar as características funcionais da soja ao invés do teor de proteína total (YU et al., 2016). A fração proteica total de leguminosas como a soja, pode ser dividida em dois grupos: metabólicas e de reserva, sendo que as de reserva representam aproximadamente 85% e são compostas por aproximadamente 40-60% de globulinas, 8-20% de albuminas e prolaminas e glutelinas em menor quantidade. Estas proporções podem variar entre as cultivares e é o que as diferencia quanto a propriedades funcionais (NEVES, LOURENÇO & SILVA, 2001).

Neste estudo, o conteúdo de proteínas solúveis foi fracionado em função da solubilidade em água e soluções aquosas conforme o protocolo do autor, ou seja, foi realizada a extração sequencial. Também foi aplicada a técnica de ruptura por uso de ultrassom, paralelamente a agitação orbital convencional, a fim de avaliar a eficiência do processo e a possibilidade de sua utilização para tornar mais rápida e mais exata a determinação das frações proteicas (Tabela 7).

A extração assistida por ultrassom é reconhecida como uma técnica de extração eficiente que reduz o tempo de trabalho, aumenta a produção e, muitas vezes, a qualidade do extrato (PICÓ, 2013). A principal força motriz para os efeitos de extração por sonicação é a cavitação. Quando ultrassons se propagam através do meio, induzem uma série de

compressões nas moléculas. Tais alterações de pressão causam a formação e o colapso das bolhas em meio líquido, provocando a ruptura das células e a liberação de compostos (TIWARI, 2015). A extração por ultrassom assistida vem sendo aplicada para recuperação de vários componentes da soja, como peptídeos (WANG et al., 2014), óleo (LI; PORDESIMO; WEISS, 2004) e isoflavonas (ROSTAGNO; PALMA; BARROSO, 2003), porém não foi utilizada para separação de proteínas.

O uso de UA foi mais eficaz na extração de albuminas em todas as cultivares de soja, exceto Vtop. Para as cultivares Louis Dreyfus, Monsoy 6972, Monsoy 8490 e BRS 284 as porcentagens de aumento da fração albumina foram as maiores: 98, 90, 71 e 72% respectivamente, com aplicação de UA. Para as globulinas, Vtop teve o teor aumentado em 84% com o uso de UA. O percentual de aumento das outras cultivares variou de 12 a 38% de aumento e redução do conteúdo de globulinas com uso de UA foi verificada apenas para as cultivares Louis Dreyfus e Monsoy 8490, de 2 e 0,8% respectivamente.

O conteúdo de prolaminas apresentou para as cultivares Monsoy 6972, Intacta 5936 e Vtop os maiores percentuais de aumento com uso de UA, de 120, 266 e 133% respectivamente. Nesta fração, assim como para as globulinas, as cultivares Louis Dreyfus e Monsoy 8490 apresentaram redução de seu conteúdo em 9 e 78% respectivamente, com aplicação de UA. A fração das glutelinas, excepcionalmente, apresentou conteúdos maiores quando extraídas por AO (entre 10 e 71% superiores) em todas as cultivares, exceto BRS 284, provavelmente porque a aplicação de UA pode não ter liberado as proteínas.

O conteúdo total das frações proteicas das cultivares de soja estudada foi maior quando UA foi aplicada em 9 das 10 amostras, excluindo Vtop. O percentual de aumento variou de 7,9% para Monsoy 7639 até 67% para BRS 284, com 7% de redução do conteúdo com aplicação de UA em Vtop. Portanto, é recomendável estabelecer parâmetros para otimizar a ação da UA, pois a técnica foi mais eficiente pelo efeito provocado pela cavitação (CASTRO e CAPOTE, 2007). Neste trabalho, a aplicação de ultrassom reduziu em 5 vezes o tempo de extração de cada fração, diminuiu o gasto de solvente pela metade, além de ter sido mais eficiente para três das quatro frações proteicas avaliadas.

Os resultados apresentados contrariam o que vem sendo descrito pela literatura sobre a maior parte das proteínas de reserva da soja ser formada por globulinas. Na Tabela 8 estão demonstrados os teores estimados em percentual de albumina e globulina com relação ao conteúdo total de proteína das cultivares de soja. A fração albumina foi a mais abundante em todas as cultivares de soja, e isto pode ser atribuído ao fato de que a albumina e globulina podem ter se misturado na água, resultando em percentuais mais elevados.

Tabela 7. Frações proteicas em variedades de soja extraídas por agitação orbital (AO) e por ultrassom assistida (UA).

Cultivar	Albuminas (mg g ⁻¹)		Globulinas (mg g ⁻¹)		Prolaminas (mg g ⁻¹)		Glutelinas (mg g ⁻¹)		Total (mg g ⁻¹)	
	AO	UA	AO	UA	AO	UA	AO	UA	AO	UA
Cooperfibra	91,5 ^{Bc} (0,1)	133,2 ^{Ag} (2,8)	6,0 ^{Ae} (7,8)	8,0 ^{Af} (4,2)	4,0 ^{Ad} (7,5)	4,4 ^{Ade} (0,1)	20,0 ^{Aef} (0,9)	7,4 ^{Bc} (4,6)	121,4 ^{Bd} (0,9)	151,3 ^{Af} (1,8)
Louis Dreyfus	111,7 ^{Bc} (0,9)	220,4 ^{Ae} (1,7)	12,8 ^{Ab} (5,6)	12,6 ^{Ade} (6,1)	4,9 ^{Ad} (4,4)	4,5 ^{Ade} (8,0)	73,7 ^{Aa} (5,7)	32,5 ^{Ba} (7,8)	202,7 ^{Bb} (2,4)	270,0 ^{Ad} (2,7)
Monsoy 6972	97,1 ^{Bc} (5,5)	202,2 ^{Aef} (1,0)	10,8 ^{Abc} (3,0)	12,8 ^{Ade} (6,2)	1,5 ^{Ad} (2,9)	3,8 ^{Ade} (0,7)	33,0 ^{Abc} (2,2)	9,5 ^{Bde} (0,2)	151,8 ^{Bc} (7,0)	227,3 ^{Ae} (0,2)
Monsoy 8490	154,0 ^{Bb} (3,0)	265,2 ^{Abc} (1,6)	22, ^{Aa} 1(3,5)	22,1 ^{Aa} (6,5)	35,6 ^{Aa} (2,4)	8,3 ^{Bc} (0,2)	35,6 ^{Ab} (2,4)	16,6 ^{Bc} (0,2)	246,4 ^{Ba} (1,2)	309,8 ^{Ab} (1,9)
Monsoy 7639	208,9 ^{Ba} (1,5)	240,0 ^{Ad} (0,6)	12,8 ^{Bb} (3,2)	14,4 ^{Ac} (5,1)	2,4 ^{Bd} (7,4)	2,7 ^{Ae} (7,0)	23,4 ^{Ade} (4,2)	9,8 ^{Bde} (2,2)	247,5 ^{Ba} (1,8)	267,1 ^{Ad} (1,2)
Intacta 5936	167,2 ^{Ab} (0,1)	184,8 ^{Af} (0,1)	10,8 ^{Abc} (2,8)	10,1 ^{Bef} (2,7)	3,1 ^{Bb} (7,0)	11,5 ^{Ab} (7,2)	20,1 ^{Ae} (7,0)	11,4 ^{Bde} (7,2)	194,4 ^{Bb} (4,3)	285,9 ^{Ac} (0,9)
Tornado	181,5 ^{Bab} (7,9)	209,0 ^{Ae} (4,0)	12,6 ^{Bb} (5,3)	18,0 ^{Ab} (0,7)	3,2 ^{Bd} (11,3)	5,4 ^{Ad} (2,3)	18,3 ^{Aef} (7,4)	8,3 ^{Bde} (9,6)	211,0 ^{Bb} (7,2)	237,0 ^{Ae} (4,3)
Vtop	116,2 ^{Ac} (7,6)	104,3 ^{Ah} (2,2)	10,2 ^{Ac} (5,1)	17,6 ^{Bb} (0,1)	3,9 ^{Ad} (6,4)	8,4 ^{Bc} (0,8)	27,7 ^{Ac} (5,0)	12,2 ^{Bcd} (6,6)	155,0 ^{Ac} (7,5)	144,0 ^{Af} (2,3)
Intacta 7823	164,9 ^{Bb} (4,8)	252,1 ^{Ac} (1,2)	7,9 ^{Ade} (4,3)	11,3 ^{Ae} (6,6)	20,3 ^{Ad} (1,4)	5,3 ^{Bd} (9,2)	18,4 ^{Aef} (8,0)	16,5 ^{Ac} (0,4)	194,4 ^{Bb} (0,8)	285,9 ^{Ac} (0,7)
BRS 284	159,6 ^{Bb} (4,9)	272,3 ^{Aa} (1,2)	13,2 ^{Bb} (7,4)	17,1 ^{Abc} (4,1)	13,9 ^{Bc} (7,0)	21,7 ^{Aa} (4,2)	13,7 ^{Bg} (7,0)	21,4 ^{Ab} (4,2)	198,2 ^{Bb} (3,1)	331,4 ^{Aa} (0,9)

¹ Resultados expressos como média e coeficiente de variação (%). Médias na mesma coluna seguidas de letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa pelo Teste de Tukey (p<0,05). Médias na mesma linha para cada fração proteica seguidas de letra maiúscula diferente indicam diferença significativa Teste de Tukey (p<0,05).

AO = agitação orbital

UA = ultrassom assistida

Outra possibilidade é que um processo de proteólise endógena ocorre preferencialmente com as globulinas em soja, assim, quando as sementes passam por condições que favorecem a ação proteolítica, tais como armazenamento sob temperatura e umidade relativa não controlada, moagem prolongada ou mesmo início do processo de germinação podem explicar as baixas quantidades do grupo das globulinas nas cultivares de soja (SHUTOV et al., 2012).

Tabela 8. Percentual de albumina e globulina em relação a proteína total nas cultivares de soja.

Cultivar	Albumina (%)		Globulina (%)	
	AO	UA	AO	UA
Cooperfibra	25,3	36,5	1,7	2,2
Louis Dreyfus	30,2	59,9	3,5	3,4
Monsoy 6972	31,0	58,7	3,2	3,7
Monsoy 8490	40,9	70,1	5,8	5,8
Monsoy 7639	60,3	69,1	3,7	4,2
Intacta 5936	44,4	49,9	2,2	2,7
Tornado	47,7	55,7	3,4	4,6
Vtop	31,0	28,3	2,8	5,2
Intacta 7823	43,1	66,1	2,1	2,9
BRS 284	47,6	82,2	4,1	5,2

AO = agitação orbital; UA = ultrassom assistida

Assim, o uso de UA pode ser indicado para extração de proteínas, pois é mais rápido, alterando menos a conformação das proteínas solúveis, sendo a repetibilidade maior em todas as frações proteicas. A extração de glutelinas por este tipo de técnica precisa ser mais bem avaliada. Para uma melhor avaliação do método de extração por UA, devem ser estudados parâmetros referentes a tempo e frequência seguidos de validação para diferentes matrizes proteicas.

5.3 Caracterização bioquímica

As cultivares de soja foram caracterizadas quanto às atividades das enzimas protease e peroxidase (PO) e as atividades específicas das duas enzimas estão expressas na Tabela 9.

As cultivares Louis Dreyfus e Monsoy 8490 se destacaram por suas atividades proteolíticas frente às outras cultivares, estando entre as que apresentam maiores quantidades de proteínas solúveis (270 e 309,8 mg g⁻¹, respectivamente). Isto sugere que outros fatores afetam o conteúdo de proteínas solúveis em grãos, principalmente da fração globulina na reserva a ser mobilizada (TAN-WILSON, BANDAK, JEYABALAN, 2012).

Tabela 9. Atividades específicas de peroxidase e protease em cultivares de soja.

Cultivar	Protease (μg tirosina mg proteína⁻¹ min^{-1})	Peroxidase (U mg proteína⁻¹)
Cooperfibra	3,9 ^{cd} (3,4)	60,4 ^c (5,0)
Louis Dreyfus	7,9 ^a (1,0)	339,2 ^b (3,5)
Monsoy 6972	2,9 ^e (7,9)	35,3 ^d (3,4)
Monsoy 8490	4,9 ^b (1,8)	23,3 ^d (1,1)
Monsoy 7639	2,8 ^{ef} (0,1)	15,2 ^e (5,9)
Intacta 5936	3,6 ^d (0,9)	6,8 ^e (4,0)
Tornado	3,0 ^e (0,9)	48,7 ^{cd} (2,7)
Vtop	2,4 ^f (0,2)	523,0 ^a (3,7)
Intacta 7823	4,3 ^c (0,6)	15,7 ^e (1,6)
BRS 284	3,1 ^e (1,4)	24,5 ^d (2,6)

¹Resultados expressos como média e coeficiente de variação (%). Médias na mesma coluna seguidas de letras diferentes indicam diferença significativa pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$)

Alguns autores afirmam que as proteases podem ser inibidas por isoflavonas em soja (AGUIAR, 2002) e outros afirmam que a ação proteolítica destas enzimas aumenta o teor de isoflavonas (WU; MUIR, 2010). Contradizendo o último autor, os resultados obtidos mostram que as cultivares com maior atividade proteolítica, Louis Dreyfus e Monsoy 8490, apresentam os menores conteúdos de isoflavonas (707 e 689 μg g^{-1}). A afirmação que a atividade proteolítica não foi afetada pelas modificações genéticas não é conclusiva, pois não houve diferença significativa entre a atividade na soja nativa e em 5 cultivares OGM (Tabela 9), além da variabilidade dos valores da atividade proteolítica. Possivelmente outro método de avaliação da atividade proteolítica fosse menos suscetível aos interferentes redutores presentes no meio reacional durante a determinação da tirosina liberada.

Os resultados implicam na necessidade de caracterização das proteases presentes nas cultivares de soja, sendo que existem enzimas com ações diversificadas e o conhecimento de suas frações permite entender melhor suas atividades biológicas. Silva & Silva (2000) afirmam que funções de proteases e inibidores de proteases em grãos não são muito bem entendidas e que apenas os efeitos dos inibidores em outras espécies são mais conhecidos.

Segundo Panoff (2013), em condições de estresse, as plantas tendem a aumentar a atividade da peroxidase, sendo, às vezes, a primeira enzima a ter atividade alterada, independentemente do substrato utilizado ou do estresse aplicado. Comparando a atividade da PO em cultivares convencionais e OGM, Labanca (2002) observou maior atividade nas modificadas, e afirma que esta diferença pode estar relacionada ao fato de que o aumento da atividade da peroxidase ocorre mais rapidamente em plantas que apresentam resistência ao agente causador do estresse comparativamente à planta mais suscetível, justificando, deste modo, o aumento da atividade da peroxidase nas sementes de sojas tolerantes ao herbicida

glifosato. Huber et al. (2002) encontrou atividades de 2,2 U g de soja⁻¹, bem maiores que a atividade experimental convertida de Vtop de 0,08 U g de soja⁻¹.

O perfil de atividade de PO nas cultivares de soja mostra que ocorrem diferenças bastante significativas entre as cultivares modificadas, indicando que as cultivares Louis Dreyfus e Vtop sofreram algum tipo de estresse e em resposta produziram níveis mais elevados (Tabela 9) da enzima como forma de proteção (VALÁRIO et al., 2014).

5.4 Frações fenólicas

Ácidos fenólicos simples e flavonóides são os mais comuns em grãos e cereais e geralmente ocorrem como conjugados solúveis (glicosídeos) ou em formas insolúveis (ACOSTA-ESTRADA; GUTIÉRREZ-URIBE; SERNA-SALDÍVAR, 2014). Os compostos fenólicos são sintetizados em plantas para exercerem papel estrutural, de sinalização, de defesa e de proteção contra dano oxidativo ou ataque de patógenos, portanto a concentração deles é diretamente proporcional ao estresse sofrido pela planta (BERTIN et al., 2014; GARCIA-SALAS et al., 2010). Dentre os efeitos atribuídos aos compostos fenólicos o mais estudado é seu potencial antioxidante (SCHMIDT et al., 2014; WANYO; MEESO; SIRIAMORNUN, 2014) e pouco quanto ao seu papel antifúngico (PAGNUSSATT et al., 2014; SOUZA et al., 2011) *in vitro* e *in vivo*.

As cultivares de soja foram caracterizadas quanto às frações fenólicas solúveis em metanol (FFM), solúveis em etanol (FFE) e insolúveis em etanol (FFI). Os extratos foram quantificados por reação de redução e os conteúdos fenólicos determinados (Tabela 10).

Tabela 10. Frações fenólicas em amostras de soja (mg de ácido gálico g de soja⁻¹).

Cultivar	FFM	FFE	FFI	Total
Cooperfibra	5,2 ^a (2,5)	2,5 ^{cde} (3,9)	1,1 ^{bc} (2,8)	8,8 ^a (1,8)
Louis Dreyfus	2,8 ^c (3,3)	2,6 ^{cde} (1,3)	1,0 ^c (0,7)	6,3 ^c (6,0)
Monsoy 6972	3,9 ^b (2,3)	2,3 ^e (5,1)	1,1 ^{bc} (1,6)	7,3 ^b (7,6)
Monsoy 8490	1,3 ^d (2,4)	2,6 ^{abcd} (2,9)	1,2 ^{ab} (1,4)	5,2 ^d (3,3)
Monsoy 7639	2,3 ^c (3,5)	2,7 ^{abc} (2,3)	1,1 ^{bc} (0,7)	6,1 ^c (2,0)
Intacta 5936	2,7 ^c (1,8)	2,6 ^{bcd} (0,6)	0,9 ^c (2,8)	6,2 ^c (0,6)
Tornado	2,6 ^c (2,7)	2,7 ^{abc} (0,5)	1,0 ^c (2,9)	6,3 ^c (5,3)
Vtop	2,6 ^c (1,0)	2,9 ^a (1,3)	1,1 ^{bc} (1,3)	6,5 ^{bc} (0,5)
Intacta 7823	2,7 ^c (0,9)	2,4 ^{de} (1,5)	1,2 ^{bc} (4,1)	6,3 ^c (5,4)
BRS 284	2,3 ^c (0,6)	2,9 ^{ab} (1,2)	1,4 ^a (0,5)	6,5 ^{bc} (4,0)

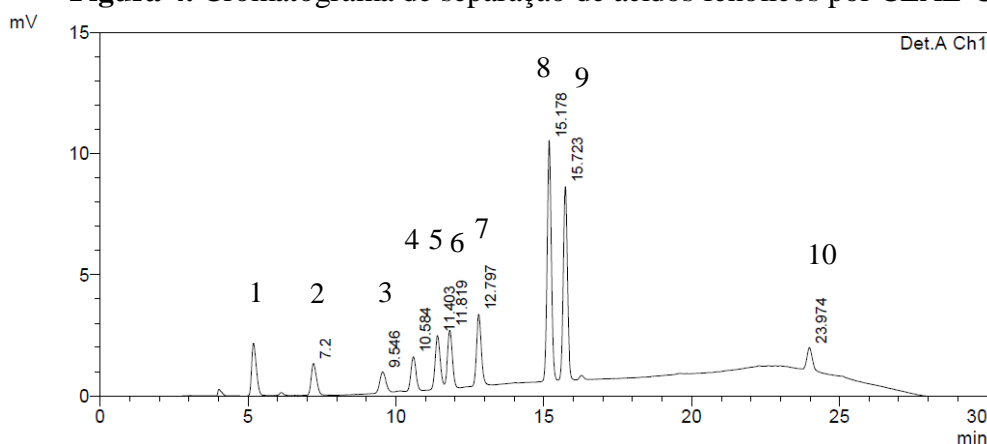
¹ Resultados expressos como média e coeficiente de variação (%). Médias na mesma coluna seguidas de letras diferentes indicam diferença significativa pelo Teste de Tukey (p<0,05)

FFM = frações fenólicas solúveis em metanol; FFE = frações fenólicas solúveis em etanol e FFI = frações fenólicas insolúveis em etanol.

Bolanho e Beléia (2011) encontraram FFM na ordem de 1,9 mg de ácido gálico g de soja⁻¹. Chung et al. (2011) 3,6 mg de ácido gálico g de soja⁻¹ e Alu'datt et al. (2013) reportaram também 1,9 mg de ácido gálico g de soja⁻¹, todos valores inferiores aos relatados neste estudo. Os altos valores de FFM podem ser explicados pela aplicação de ondas ultrassônicas para extração, que se mostrou mais eficaz que a técnica convencional de agitação orbital, verificado em testes preliminares (*dados não mostrados*). Como pode ser visto, as cultivares de soja mostraram ser boas fontes de frações fenólicas, quando comparadas a outros autores, destacando as cultivares Louis Dreyfus e Monsoy 6972 pelo seu conteúdo de frações fenólicas.

Os extratos de frações fenólicas das cultivares de soja foram caracterizados quanto ao perfil de ácidos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência, estando na Tabela 11 os parâmetros de confiabilidade do método. As curvas analíticas apresentam ampla faixa de linearidade, com coeficientes de correlação acima de 0,99 para todos os compostos, conforme recomendado pela AOAC (2002), e baixos limites de detecção. Na Figura 4 está ilustrado o cromatograma de separação de ácidos fenólicos.

Figura 4. Cromatograma de separação de ácidos fenólicos por CLAE-UV.



1= gálico, 2= protocatecóico, 3= clorogênico, 4= hidroxibenzóico, 5= cafeico, 6= serínico, 7= vanilina, 8= cumárico, 9= ferúlico, 10= quercetina.

A Tabela 12 apresenta o perfil de ácidos fenólicos das frações fenólicas solúveis em metanol, solúveis em etanol e insolúveis em etanol. O estudo de compostos funcionais na soja, em especial os fenólicos, vem sendo amplamente explorado, mas a avaliação do perfil da forma ácida deles, além de ser algo incomum permite pela identificação relacionar a ação funcional com os compostos que a determinam.

Tabela 11. Parâmetros de calibração do método cromatográfico aplicado à determinação de ácidos fenólicos.

Ácido fenólico	Curva analítica	Linearidade ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	R^2	LD_i *	LQ_i *	LD_m ($\mu\text{g g}^{-1}$)			LQ_m ($\mu\text{g g}^{-1}$)		
						FFM	FFE	FFI	FFM	FFE	FFI
Gálico	$y = 89247,9x + 6310,99$	0,005–21	0,9989	0,0016	0,005	0,04	0,03	0,01	0,125	0,08	0,03
Protocatecóico	$y = 57225,9x + 5567,31$	0,005–21	0,9994	0,0016	0,005	0,04	0,03	0,01	0,125	0,08	0,03
Clorogênico	$y = 43549,7x + 3691,65$	0,005–21	0,9995	0,0016	0,005	0,04	0,03	0,01	0,125	0,08	0,03
Hidroxibenzóico	$y = 57143,1x + 6368,62$	0,005–21	0,9991	0,0016	0,005	0,04	0,03	0,01	0,125	0,08	0,03
Caféico	$y = 87825,1x + 6316,79$	0,005–21	0,9991	0,0016	0,005	0,04	0,03	0,01	0,125	0,08	0,03
Siríngico	$y = 85426,3x + 6266,86$	0,0016–18	0,9982	0,0005	0,0016	0,012	0,008	0,003	0,04	0,03	0,01
Vanilina	$y = 126155x + 10115,1$	0,005–18	0,9988	0,0016	0,005	0,04	0,03	0,01	0,125	0,08	0,03
Cumárico	$y = 405444x - 3968,51$	0,0016–6	0,9998	0,0005	0,0016	0,012	0,008	0,003	0,04	0,03	0,01
Ferúlico	$y = 321522x - 4823,84$	0,0016–6	0,9996	0,0005	0,0016	0,012	0,008	0,003	0,04	0,03	0,01
Quercetina	$y = 44670,9x + 4867,05$	0,025–21	0,9985	0,008	0,025	0,2	0,13	0,05	0,625	0,42	0,16

*expressos em $\mu\text{g mL}^{-1}$

LD_i = limite de detecção do instrumento, LQ_i = limite de quantificação do instrumento, LD_m = limite de detecção do método, LQ_m = limite de quantificação do método, FFM = fração fenólica solúvel em metanol, FFE = fração fenólica solúvel em etanol, FFI = fração fenólica insolúvel em etanol.

Tabela 12- Perfil de ácidos fenólicos das frações fenólicas de soja ($\mu\text{g g}^{-1}$).

Cultivar	Gálico	PC	Clorogênico	HB	Cafeico	Serínico	Vanilina	Cumárico	Ferúlico	Quercetina	Total	
Cooperfibra	3,2	44,3	1,7	nd	nd	nd	39,9	0,5	4,5	nd	94,1	FFM
Louis Dreyfus	2,8	49,8	<LQ	nd	nd	nd	25,2	0,4	2,5	nd	80,7	
Monsoy 6972	0,3	31,2	nd	nd	nd	nd	4,9	Nd	1,1	nd	37,5	
Monsoy 8490	nd	66,7	nd	<LQ	<LQ	0,2	30,3	0,6	3,0	nd	100,8	
Monsoy 7639	nd	0,5	nd	0,2	nd	nd	48,8	0,7	6,2	1,7	58,1	
Intacta 5936	nd	4,7	nd	3,4	nd	nd	75,7	0,5	6,9	7,2	98,4	
Tornado	0,8	11,5	nd	5,7	<LQ	<LQ	101,5	1,8	8,3	11,3	140,9	
Vtop	9,2	nd	22,8	1,8	nd	nd	62,5	0,9	7,5	nd	104,7	
Intacta 7823	0,8	4,4	3,3	1,9	<LQ	<LQ	104,3	0,6	10,4	nd	125,7	
BRS 284	0,1	8,4	4,2	0,1	nd	nd	46,4	1,7	8,2	17,0	86,1	
Cooperfibra	14,78	9,5	nd	nd	1,4	0,4	23,5	7,7	5,5	29,4	92,2	FFE
Louis Dreyfus	6,84	7,4	nd	nd	1,5	0,2	21,8	4,9	3,5	nd	46,1	
Monsoy 6972	14,04	8,9	nd	3,6	nd	0,5	12,0	2,4	Nd	nd	41,4	
Monsoy 8490	14,21	25,8	5,5	6,3	4,1	nd	17,5	9,9	8,0	65,2	156,5	
Monsoy 7639	25,9	10,0	nd	nd	2,9	2,1	45,1	6,3	14,3	nd	106,6	
Intacta 5936	15,81	9,1	nd	5,2	nd	50,9	10,5	4,4	2,3	nd	98,2	
Tornado	16,41	14,6	nd	9,1	nd	0,0	59,1	4,7	8,4	14,9	127,2	
Vtop	9,37	9,0	15,7	25,6	nd	6,9	40,7	9,0	9,6	40,4	166,3	
Intacta 7823	14	11,0	nd	4,5	nd	nd	46,3	6,7	7,7	16,7	106,9	
BRS 284	13,93	18,4	nd	nd	2,4	nd	63,2	8,4	19,9	16,9	143,1	
Cooperfibra	nd	82,1	76,3	1,7	9,7	93,3	8,2	12,3	9,7	nd	293,3	FFI
Louis Dreyfus	nd	59,6	48,5	0,4	8,5	81,8	5,6	4,9	7,4	nd	216,7	
Monsoy 6972	16,7	11,2	nd	0,2	3,0	67,9	2,4	4,2	4,8	nd	110,4	
Monsoy 8490	nd	73,6	22,2	2,6	6,1	153,2	1,2	7,5	9,2	nd	275,6	
Monsoy 7639	3,0	14,0	23,8	0,7	6,2	60,9	3,1	5,2	5,9	nd	122,8	
Intacta 5936	nd	57,4	73,1	1,1	6,7	59,2	8,6	7,1	5,2	nd	218,4	
Tornado	nd	27,9	67,6	0,9	4,2	38,9	9,8	5,5	5,4	nd	160,2	
Vtop	nd	0,0	35,5	1,4	6,0	57,2	2,8	15,5	4,4	nd	122,8	
Intacta 7823	20,8	32,4	64,9	2,0	7,4	92,5	9,0	9,3	11,1	nd	249,4	
BRS 284	nd	57,2	120,1	2,9	10,2	100,1	4,2	11,5	9,5	nd	315,7	

PB = protocatecico, HB = Hidroxibenzóico, <LQ = menor que o limite de quantificação, nd = não detectado.

A concentração total de compostos identificados na FFM é no mínimo 13 vezes menor (dependendo da cultivar) que a concentração espectrofotométrica determinada no extrato, o que pode ser explicado pelo fato de que nesta determinação outros fenóis ou compostos redutores podem ter interferido na reação de óxido redução empregada para a quantificação deles. Os ácidos mais abundantes na fração metanólica foram o protocatecólico e a vanilina (ACOSTA-ESTRADA; GUTIÉRREZ-URIBE; SERNA-SALDÍVAR, 2014).

Soares (2002) afirmou que a metoxila presente com a hidroxila na vanilina, reduz a atividade antioxidante dela. Mira et al. (2008) afirmou que ácido protocatecólico possui alta atividade antioxidante *in vitro*, dependendo do tipo de solvente empregado na extração, concluindo que é difícil estabelecer uma ordem dos ácidos de acordo com potencial antioxidante. Souza (2010) afirmou que ácido protocatecólico apresenta atividade antifúngica e que vanilina é inibidor fúngico somente em concentrações mais altas.

Os ácidos gálico, hidroxibenzóico, cumárico e quercetina são mais solúveis em etanol, visto seus maiores teores nesta fração (Tabela 12), mas os ácidos protocatecólico e vanilina ainda permanecem sendo os mais abundantes, diferindo entre as cultivares. Soares (2002) afirmou que ácido gálico tem boa capacidade antioxidante e Pagnussatt et al. (2014) demonstram a capacidade dele de inibir em 21% o crescimento de fungos do gênero *Fusarium*. Nas frações fenólicas solúveis em metanol e etanol, há prevalência de ácidos derivados do ácido hidroxibenzóico: gálico, protoatecólico e vanilina.

Ácidos fenólicos nas formas insolúveis são ligados a componentes estruturais da parede celular vegetal, tais como celulose, hemicelulose, lignina, pectina e proteínas estruturais. Estes desempenham importantes funções na parede celular como barreiras físicas e químicas, proteção contra a invasão de patógeno, antifúngicos e antioxidantes (ACOSTA-ESTRADA; GUTIÉRREZ-URIBE; SERNA-SALDÍVAR, 2014).

Na fração fenólica insolúvel, uma mudança de perfil de ácidos fenólicos foi observada, ocorrendo a prevalência dos ácidos serínico, clorogênico e protocatecólico (Tabela 12) em maiores quantidades que nas frações solúveis. Outro destaque é para a ausência de quercetina detectável. O ácido clorogênico é considerado um inibidor eficiente da enzima alfa amilase, representando um mecanismo importante de defesa das plantas (FENG et al., 1996; NARITA; INOUE, 2011). Soares (2002) demonstrou que após hidrólise alcalina, o ácido clorogênico foi um dos mais abundantes, observado também neste estudo. O somatório dos ácidos fenólicos insolúveis é maior que nos outros extratos em decorrência da hidrólise alcalina, que colocou em exposição um maior número de ácidos que tinham grupamentos reativos, associados a outros tipos de compostos, além dos já disponíveis.

Conhecido o perfil dos ácidos fenólicos de soja extraídos por diferentes processos e solventes e em vista das diferentes possibilidades de atividades biológicas evidenciadas, o potencial antioxidante e a inibição fúngica foram avaliados conforme estimativa do seu efeito inibidor de amilase fúngica, visando identificar o efeito biológico protetor conferido pelas frações fenólicas ao grão.

5.5 Isoflavonas

5.5.1 Estabelecimento das condições cromatográficas

Para garantir a confiabilidade dos dados obtidos foi realizada a validação do método nas condições otimizadas. Os parâmetros cromatográficos avaliados estão mostrados na Tabela 13. Através de análise de regressão linear foi determinada a linearidade, $R^2 = 0,9993$ e $0,9997$ no intervalo de $0,005-20 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente para daidzeína e genisteína. Os parâmetros analíticos foram considerados adequados, pois a faixa de linearidade é ampla a partir de um limite de detecção da ordem de parte por bilhão (ANVISA, 2003).

Tabela 13. Parâmetros de calibração do método de quantificação de isoflavonas.

	Daidzeína	Genisteína
Equação da curva	$y = 122857x - 5526,6$	$y = 104902x - 16257$
Linearidade do instrumento	$0,005 - 20 \mu\text{g mL}^{-1}$	$0,005 - 20 \mu\text{g mL}^{-1}$
Coeficiente de correlação	0,9993	0,9997
LD_i	$0,001 \mu\text{g mL}^{-1}$	$0,001 \mu\text{g mL}^{-1}$
LQ_i	$0,005 \mu\text{g mL}^{-1}$	$0,005 \mu\text{g mL}^{-1}$
LD_m	$0,2 \mu\text{g g}^{-1}$	$0,2 \mu\text{g g}^{-1}$
LQ_m	$1 \mu\text{g g}^{-1}$	$1 \mu\text{g g}^{-1}$

LD_i = limite de detecção do instrumento; LQ_i = limite de quantificação do instrumento;
 LD_m = limite de detecção do método; LQ_m = limite de quantificação do método.

O tempo de retenção dos compostos foi de 4,6 e 5,9 min respectivamente para daidzeína e genisteína, conforme a Figura 5, e os fatores de retenção (k) foram de 0,8 e 1,4, considerados dentro da faixa recomendada para a separação (HARRIS, 2003). O fator de separação (α) indica a seletividade do sistema cromatográfico com relação a dois compostos e seu valor é, por definição, igual ou maior que 1 (SOARES, 2006). Para daidzeína e genisteína, o valor de α foi de 1,6, indicando separação satisfatória dos dois compostos.

Peñalvo, Nurmi & Adlercreutz (2004) encontraram valores iguais para os limites de detecção das mesmas isoflavonas, e Yatsu et al. (2014) obtiveram limites de $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ para daidzeína e genisteína.

5.5.2 Otimização de método de extração

Um delineamento fatorial fracionado foi utilizado para otimização do método de extração de isoflavonas de soja (Tabela 14), usando a amostra de soja convencional (BRS 284).

Tabela 14. Delineamento fatorial fracionado 2^{6-2} para extração de isoflavonas em soja.

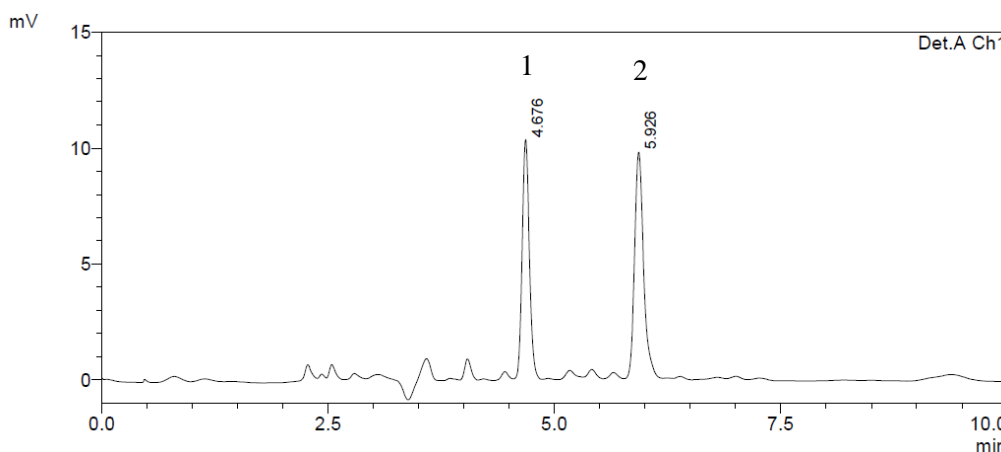
Ensaio	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	x_6	Daidzeína ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Genisteína ($\mu\text{g g}^{-1}$)
1	30 (-1)	10 (-1)	24 (-1)	1 (-1)	20 (-1)	70 (-1)	123,4	96,5
2	70 (1)	10 (-1)	24 (-1)	1 (-1)	60 (1)	70 (-1)	35,1	154,6
3	30 (-1)	30 (1)	24 (-1)	1 (-1)	60 (1)	100 (1)	226,3	805,0
4	70 (1)	30 (1)	24 (-1)	1 (-1)	20 (-1)	100 (1)	173,6	589,6
5	30 (-1)	10 (-1)	56 (1)	1 (-1)	60 (1)	100 (1)	205,2	894,0
6	70 (1)	10 (-1)	56 (1)	1 (-1)	20 (-1)	100 (1)	100,4	313,5
7	30 (-1)	30 (1)	56 (1)	1 (-1)	20 (-1)	70 (-1)	<LQ	79,0
8	70 (1)	30 (1)	56 (1)	1 (-1)	60 (1)	70 (-1)	32,0	108,8
9	30 (-1)	10 (-1)	24 (-1)	3 (1)	20 (-1)	100 (1)	147,9	260,4
10	70 (1)	10 (-1)	24 (-1)	3 (1)	60 (1)	100 (1)	<LQ	119,9
11	30 (-1)	30 (1)	24 (-1)	3 (1)	60 (1)	70 (-1)	44,8	187,3
12	70 (1)	30 (1)	24 (-1)	3 (1)	20 (-1)	70 (-1)	87,9	110,3
13	30 (-1)	10 (-1)	56 (1)	3 (1)	60 (1)	70 (-1)	<LQ	80,4
14	70 (1)	10 (-1)	56 (1)	3 (1)	20 (-1)	70 (-1)	438,3	569,9
15	30 (-1)	30 (1)	56 (1)	3 (1)	20 (-1)	100 (1)	71,4	175,4
16	70 (1)	30 (1)	56 (1)	3 (1)	60 (1)	100 (1)	657,0	1224,0
17	50 (0)	20 (0)	40 (0)	2 (0)	40 (0)	85 (0)	52,9	593,7
18	50 (0)	20 (0)	40 (0)	2 (0)	40 (0)	85 (0)	12,7	178,3
19	50 (0)	20 (0)	40 (0)	2 (0)	40 (0)	85 (0)	283,5	183,5
20	50 (0)	20 (0)	40 (0)	2 (0)	40 (0)	85 (0)	195,8	190,1

x_1 = concentração de solvente (%); x_2 = tempo de extração (min); x_3 = frequência (kHz); x_4 = concentração de ácido (mol L^{-1}); x_5 = tempo de hidrólise (min) e x_6 = temperatura de hidrólise ($^{\circ}\text{C}$); <LQ = menor que o limite de quantificação.

Os conteúdos de daidzeína variaram entre 13 e $657 \mu\text{g g}^{-1}$ e de genisteína entre 79 e $1224 \mu\text{g g}^{-1}$, sendo que nas condições do ensaio 16 foram encontrados os maiores teores de

daidzeína e genisteína. Na Tabela 15 estão descritos os efeitos das variáveis estudadas na extração.

Figura 5. Cromatograma de eluição de daidzeína e genisteína ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$).



1= daidzeína, 2= genisteína.

Tabela 15. Efeitos das variáveis na extração de daidzeína* e genisteína** na soja BRS 284.

Variáveis	Coefficiente de regressão	Erro padrão	t calculado	p-valor
Média*	0,14	0,02	5,49	0,03
Concentração de solvente (x_1)	0,07	0,06	1,32	0,31
Tempo de extração (x_2)	0,02	0,06	0,33	0,77
Frequência (x_3)	0,09	0,06	1,61	0,24
Concentração do ácido (x_4)	0,06	0,06	0,99	0,42
Tempo de hidrólise (x_5)	0,02	0,06	0,31	0,78
Temperatura de hidrólise (x_6)	0,11	0,06	1,94	0,19
Média**	0,33	0,00	246,31	0,00
Concentração de solvente (x_1)	0,07	0,00	26,01	0,00
Tempo de extração (x_2)	0,09	0,00	33,54	0,00
Frequência (x_3)	0,14	0,00	47,61	0,00
Concentração do ácido (x_4)	-0,03	0,00	-13,30	0,00
Tempo de hidrólise (x_5)	0,17	0,00	58,58	0,00
Temperatura de hidrólise (x_6)	0,37	0,00	127,19	0,00

Para extração de daidzeína nenhuma variável teve influencia significativa ($p < 0,05$) e para genisteína todas as variáveis foram significativas. Para solucionar o impasse e reduzir o número de variáveis do processo, foi decidido fixar a variável x_1 (concentração de solvente) em seu menor nível ($-1 = 30\%$), pois seu efeito foi baixo, permitindo também diminuir o gasto de solvente durante as próximas etapas de estudo das condições; e fixar a variável x_4

(concentração de ácido) no menor nível, pois seu efeito na hidrólise de genisteína foi negativo. Assim, com 4 variáveis foi elaborado um delineamento fatorial fracionado 2^{4-1} (Tabela 16).

Tabela 16. Delineamento fatorial fracionado 2^{4-1} para extração de isoflavonas em soja.

Ensaio	x_2	x_3	x_5	x_6	Daidzeína ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Genisteína ($\mu\text{g g}^{-1}$)
1	10 (-1)	24 (-1)	20 (-1)	70 (-1)	<LQ	101,9
2	30 (1)	24 (-1)	20 (-1)	100 (1)	40,0	440,6
3	10 (-1)	56 (1)	20 (-1)	100 (1)	522,0	2147,7
4	30 (1)	56 (1)	20 (-1)	70 (-1)	587,3	1490,2
5	10 (-1)	24 (-1)	60 (1)	100 (1)	150,3	1044,2
6	30 (1)	24 (-1)	60 (1)	70 (-1)	422,5	1709,2
7	10 (-1)	56 (1)	60 (1)	70 (-1)	40,4	317,7
8	30 (1)	56 (1)	60 (1)	100 (1)	803,6	2317,7
9	20 (0)	40 (0)	40 (0)	85 (0)	510,7	2216,3
10	20 (0)	40 (0)	40 (0)	85 (0)	297,6	1667,6
11	20 (0)	40 (0)	40 (0)	85 (0)	387,4	2134,6
12	20 (0)	40 (0)	40 (0)	85 (0)	304,2	1730,8

x_2 = tempo de extração (min); x_3 = frequência (kHz); x_5 = tempo de hidrólise (min) e x_6 = temperatura de hidrólise ($^{\circ}\text{C}$); <LQ = menor que o limite de quantificação.

Os níveis das variáveis em estudo permaneceram os mesmos do primeiro delineamento. Os teores de daidzeína variaram entre 40 e 804 $\mu\text{g g}^{-1}$ e os de genisteína entre 102 e 2318 $\mu\text{g g}^{-1}$, sendo que nas condições do ensaio 8 foi determinado o maior teor de daidzeína e genisteína. A Tabela 17 mostra os efeitos das variáveis sobre os teores de daidzeína e genisteína determinadas neste planejamento.

Tabela 17. Efeitos das variáveis na extração de daidzeína* e genisteína** na soja BRS 284.

Variáveis	Coefficiente de regressão	Erro padrão	t calculado	p-valor
Média*	0,33	0,02	11,81	0,00
Tempo de extração (x_2)	0,28	0,07	4,06	0,02
Frequência (x_3)	0,33	0,07	4,77	0,02
Tempo de hidrólise (x_5)	0,06	0,07	0,95	0,41
Temperatura de hidrólise (x_6)	0,11	0,07	1,65	0,19
Média**	1,44	0,08	17,97	0,00
Tempo de extração (x_2)	0,58	0,19	2,98	0,05
Frequência (x_3)	0,74	0,19	3,78	0,03
Tempo de hidrólise (x_5)	0,30	0,19	1,53	0,22
Temperatura de hidrólise (x_6)	0,58	0,19	2,96	0,05

Para daidzeína as variáveis tempo de extração e frequência foram significativas ($p < 0,05$) e para genisteína apenas a variável frequência da agitação. As variáveis x_2 (tempo de

extração) e x_6 (temperatura de hidrólise) apresentaram p-valor de 0,05 para genisteína, portanto, foram mantidas para novo estudo. A decisão a respeito deste experimento foi fixar a variável x_5 (tempo de hidrólise) em seu menor nível (-1 = 20 min) a fim de diminuir o tempo de análise. Um delineamento composto central rotacional 2^3 foi realizado, aumentando a faixa de variação entre os níveis, com adição de pontos axiais além de repetições dos pontos centrais. Os teores de daidzeína e genisteína deste experimento estão expressos na Tabela 18.

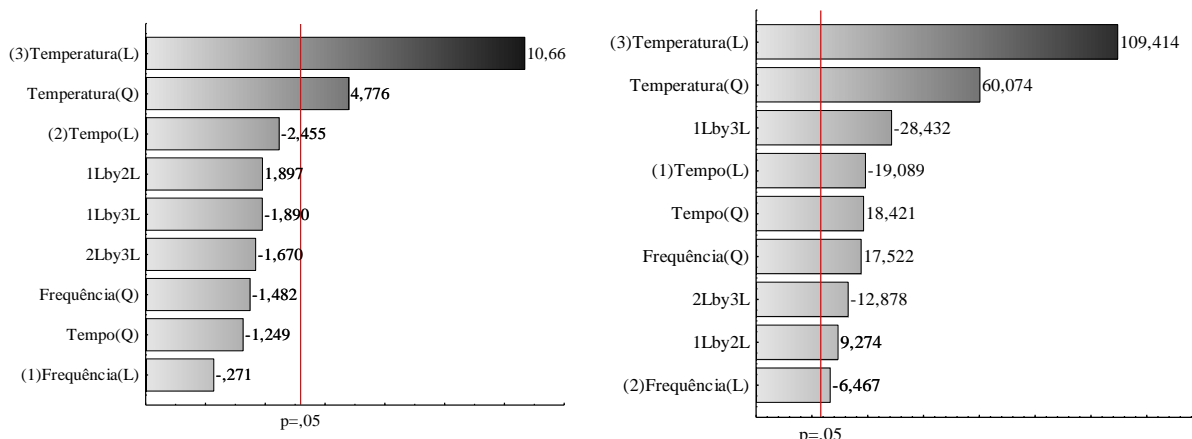
Tabela 18. Delineamento composto central rotacional 2^3 para extração de isoflavonas em soja.

Ensaio	x_2	x_3	x_6	Daidzeína ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Genisteína ($\mu\text{g g}^{-1}$)
1	18 (-1)	34 (-1)	60 (-1)	131,7	26,5
2	42 (1)	34 (-1)	60 (-1)	46,1	232,9
3	18 (-1)	76 (1)	60 (-1)	125,5	260,4
4	42 (1)	76 (1)	60 (-1)	56,2	244,8
5	18 (-1)	34 (-1)	140 (1)	492,7	2612,6
6	42 (1)	34 (-1)	140 (1)	209,5	1238,9
7	18 (-1)	76 (1)	140 (1)	275,7	1826,6
8	42 (1)	76 (1)	140 (1)	203,7	1343,0
9	10 (-1,68)	55 (0)	100 (0)	23,0	462,3
10	50 (1,68)	55 (0)	100 (0)	97,7	385,3
11	30 (0)	20 (-1,68)	100 (0)	<LQ	456,9
12	30 (0)	90 (1,68)	100 (0)	105,0	354,3
13	30 (0)	55 (0)	32 (-1,68)	11,0	65,5
14	30 (0)	55 (0)	168 (1,68)	515,8	2468,2
15	30 (0)	55 (0)	100 (0)	88,2	207,8
16	30 (0)	55 (0)	100 (0)	188,7	231,1
17	30 (0)	55 (0)	100 (0)	140,5	171,3
18	30 (0)	55 (0)	100 (0)	160,4	190,3

x_2 = tempo de extração (min); x_3 = frequência (kHz) e x_6 = temperatura de hidrólise ($^{\circ}\text{C}$); <LQ = menor que o limite de quantificação.

Os teores de daidzeína variaram entre 11 e 516 $\mu\text{g g}^{-1}$ e entre 27 e 2613 $\mu\text{g g}^{-1}$, sendo que nos ensaios 5 e 14 foram determinados os maiores teores de daidzeína e genisteína. Nestes ensaios, foi verificado decréscimo do teor de daidzeína em relação aos planejamentos experimentais anteriores. Este fato pode ser atribuído ao tempo de hidrólise empregado, que foi anteriormente fixado em 20 min (-1). Embora esta variável não apresente efeito significativo sobre nenhuma das respostas (Figura 6) parece ter influenciado na liberação da aglicona daidzeína. O efeito da matriz (113 a 393% para daidzeína) pode também ser um dos responsáveis pelas variações na determinação desta aglicona.

As variáveis que foram significativamente influentes na extração de daidzeína e genisteína, respectivamente, estão mostradas nos Diagramas de Pareto (Figura 6).

Figura 6. Diagramas de Pareto das respostas daidzeína e genisteína.

Os diagramas mostram que todas as variáveis e suas interações foram significantes para genisteína e apenas a variável temperatura teve efeito significativo para a extração e determinação de daidzeína. As Tabelas 19 e 20 mostram a análise de variância (ANOVA) para as duas isoflavonas.

Tabela 19. Análise de variância para daidzeína.

Fontes de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F calculado	F tabelado	p-valor
Regressão	292261,34	9	32473,48	3,80	3,39	0,037
Resíduo	68338,33	8	8542,29			
Total	360599,7	17				

Nível de significância $\alpha=0,05$; R^2 : 81,0%

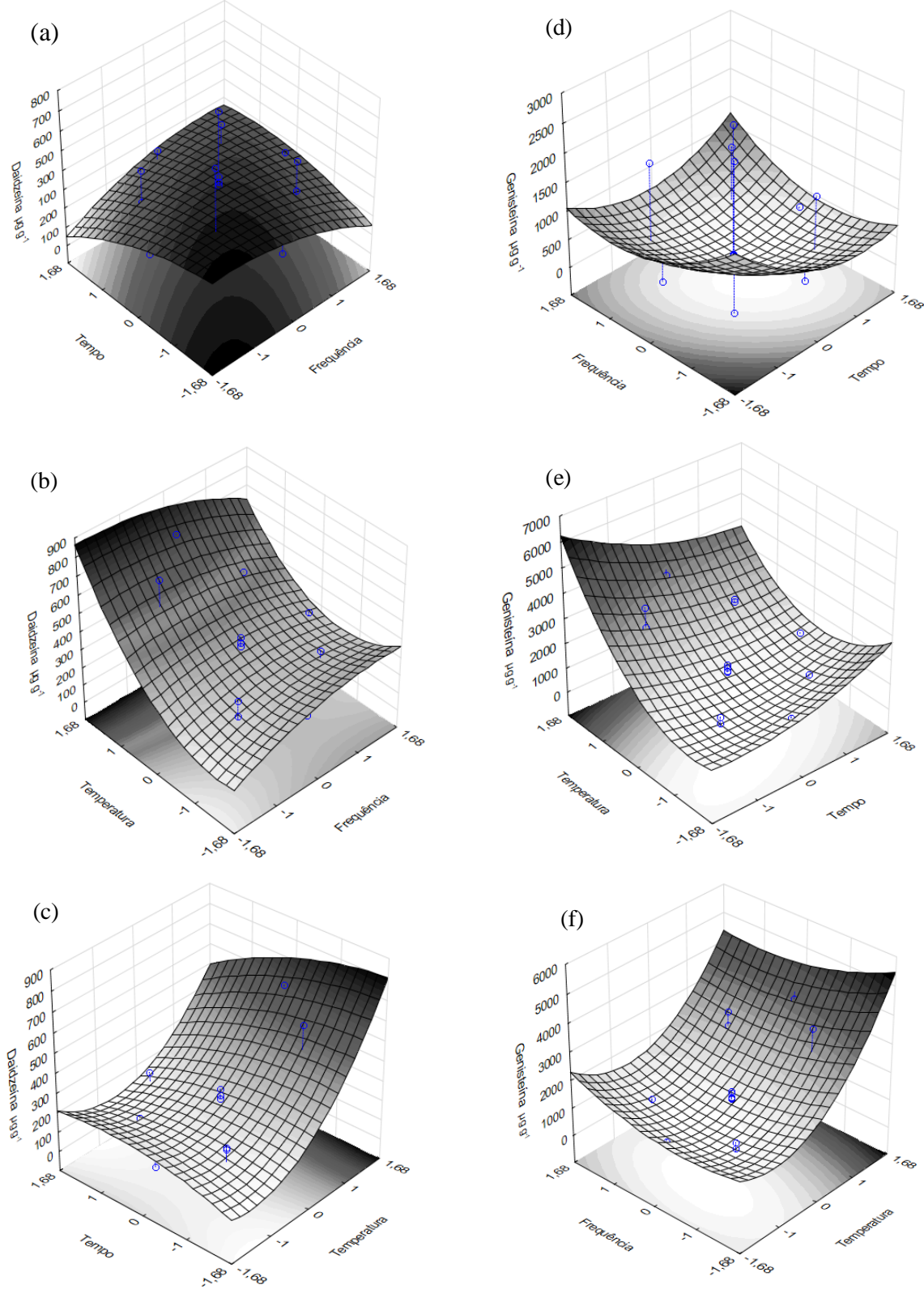
Tabela 20. Análise de variância para genisteína.

Fontes de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F calculado	F tabelado	p-valor
Regressão	11091247,53	9	1232360,84	20,75	3,39	0,000
Resíduo	475057,56	8	59382,20			
Total	11566305	17				

Nível de significância $\alpha=0,05$; R^2 : 95,8%

Considerando o F calculado, p-valor e o coeficiente de determinação o modelo foi considerado adequado para descrever as superfícies de respostas, apresentadas na Figura 7.

Figura 7. Superfícies de resposta do teor de daidzeína ($\mu\text{g g}^{-1}$) (a, b, c) e genisteína ($\mu\text{g g}^{-1}$) (d, e, f) em função das variáveis significativas.



Avaliando as superfícies de resposta é possível verificar que o nível extremo de temperatura de hidrólise é mais eficaz para as duas isoflavonas. O tempo e a frequência de

extração ótimos variam do nível menor ao ponto central. Sendo assim, as superfícies de resposta confirmam os dados encontrados na Tabela 16, em que o ensaio 14 (tempo de extração = 30 min, frequência de extração = 55 kHz, temperatura de hidrólise = 168 °C) promoveu a determinação dos maiores níveis de daidzeína e genisteína.

As condições de extração definidas a partir dos planejamentos experimentais foram: concentração do solvente = 70%, tempo de extração = 30 min, frequência = 55 kHz, concentração de ácido = 1 mol L⁻¹, tempo de hidrólise = 20 min e temperatura de hidrólise = 168° C. A variável concentração do solvente foi definida em seu maior nível relativo ao delineamento fatorial fracionado 2⁶⁻² por ter apresentado efeito positivo para as duas respostas.

As condições otimizadas foram reproduzidas em triplicata e os teores de daidzeína e genisteína obtidos e os respectivos coeficientes de variação foram de 586,1 (11,1%) e 2665,8 (7,4%) respectivamente. O teor de daidzeína foi 7% maior que o encontrado no ensaio 16 e o de genisteína 13% maior, confirmando que nesta condição são extraídas quantidades aproximadas de isoflavonas em diferentes ensaios.

5.5.3 Validação do método otimizado

O efeito dos componentes dos grãos de soja na recuperação do método proposto foi avaliado. O efeito de matriz (EM) permite avaliar a seletividade do método analisando possíveis interferências causadas pelos componentes da matriz em estudo, podendo resultar em supressão (EM<100%) ou intensificação (EM>100%) do sinal instrumental avaliado (KRUIVE et al., 2008), e neste estudo, variou entre 113 a 393% para daidzeína e 95 e 194% para genisteína. Como a matriz exerce grande influência nos resultados, foi feita uma curva analítica na matriz para cada isoflavona, com as mesmas concentrações da curva analítica em solvente. Ambas as curvas apresentaram linearidade entre 0,5 e 20 µg mL⁻¹ e coeficientes de correlação de 0,9868 para daidzeína e 0,9949 para gensiteína.

Os percentuais de recuperação das isoflavonas foram determinados com as curvas reproduzidas na matriz, a fim de diminuir o efeito dos seus componentes. A Tabela 21 apresenta os dados referentes à recuperação do método e o coeficiente de variação, que permitiu avaliar a precisão do mesmo. A recuperação do método apresenta em níveis aceitáveis, em torno de 95%, e a precisão, avaliada pelo coeficiente de variação, também está abaixo do estabelecido, 20% (AOAC, 2002).

Tabela 21. Percentual de recuperação e coeficientes de variação do método proposto.

	Daidzeína (%)	Genisteína (%)
Nível 1	103,0 (5,8)	96,8 (5,1)
Nível 2	98,1 (4,6)	101,3 (0,7)
Nível 3	93,1 (1,9)	99,9 (2,8)
Média	98,1 (5,0)	99,3 (2,3)

Um método de extração, hidrólise, separação e quantificação cromatográfica de daidzeína e genisteína foi otimizado e validado neste trabalho. Ele é rápido, simples, eficiente e preciso, e foi aplicado para determinação nas amostras de soja deste estudo, cujos teores estão na Tabela 22.

Tabela 22. Conteúdo de isoflavonas em amostras de soja ($\mu\text{g g}^{-1}$).

Cultivar	Extratos não hidrolisados			Extratos hidrolisados		
	Daidzeína	Genisteína	Total	Daidzeína	Genisteína	Total
Cooperfibra	484,6 ^d (9,5)	23,2 ^f (0,6)	518,8 ^e (8,9)	732,8 ^{bc} (6,0)	1952,8 ^{ab} (16,2)	2621,5 ^{bc} (10,6)
Louis Dreyfus	210,3 ^e (11,6)	34,3 ^{ef} (11,4)	239,3 ^f (8,5)	220,5 ^e (9,7)	508,4 ^e (14,4)	706,6 ^f (10,9)
Monsoy 6972	477,1 ^d (7,7)	159,2 ^a (5,8)	636,3 ^{de} (6,5)	764,7 ^b (7,4)	2246,3 ^a (6,1)	3011,0 ^b (6,4)
Monsoy 8490	45,2 ^f (9,2)	99,4 ^{bc} (6,7)	144,6 ^f (4,3)	224,5 ^e (12,8)	491,2 ^e (17,0)	689,2 ^f (13,3)
Monsoy 7639	554,1 ^{cd} (5,7)	169,0 ^a (7,3)	723,1 ^{bcd} (4,2)	508,2 ^{ce} (11,6)	615,6 ^{de} (11,2)	1123,7 ^{ef} (11,4)
Intacta 5936	569,1 ^{cd} (7,2)	62,0 ^d (9,1)	631,1 ^{de} (7,2)	338,3 ^{de} (6,7)	656,4 ^{cde} (12,3)	970,2 ^{ef} (8,7)
Tornado	769,4 ^b (11,0)	53,7 ^{de} (9,4)	822,0 ^b (10,7)	2139,5 ^a (10,5)	2704,2 ^a (2,38)	4660,7 ^a (13,6)
Vtop	697,0 ^{bc} (10,9)	91,8 ^{bc} (8,9)	788,8 ^{bc} (10,7)	703,3 ^{bc} (2,5)	829,4 ^{cde} (3,25)	1543,1 ^{de} (2,3)
Intacta 7823	575,8 ^{cd} (7,7)	89,1 ^c (11,7)	665,0 ^{cde} (8,2)	730,8 ^{bc} (10,0)	1335,7 ^{bcd} (12,3)	2118,2 ^{cd} (4,9)
BRS 284	1105,1 ^a (4,6)	113,1 ^b (4,4)	1218,2 ^a (4,1)	519,1 ^{bcd} (1,9)	1371,8 ^{bc} (12,7)	1847,3 ^d (8,2)

¹ Resultados expressos como média e coeficiente de variação (%). Médias na mesma coluna seguidas de letras diferentes indicam diferença significativa pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$)

As isoflavonas são encontradas na soja em maior quantidade em suas formas glicosiladas, sendo as mais abundantes e importantes do ponto de vista biológico a daidzeína e genisteína cujas formas glicosiladas são daidzina e genistina (NEMITZ; TEIXEIRA & VON POSER, 2015). A quantificação de todos os glicosídeos de isoflavonas se torna difícil devido a falta de padrões comercialmente disponíveis. A hidrólise permite a medida quantitativa das principais isoflavonas de forma mais simples e barata, além disso permite uma avaliação da disponibilidade delas. Após ingeridas, as formas glicosídicas sofrem ação de enzimas intestinais humanas que as convertem em suas formas agliconas, que são biologicamente ativas (CHIANG; SHIH; CHU, 2001; LEE et al., 2015). Verificando a Tabela 22, ficou evidente que a hidrólise propicia maior disponibilidade das agliconas.

Os teores de daidzeína e genisteína variaram bastante entre as cultivares. Segundo Shao et al. (2011) e Wu & Muir (2010) as quantidades e tipo de isoflavonas são alteradas dependendo da cultivar, região geográfica, prática agrônômica, condições ambientais de crescimento da planta e condições de estocagem e processamento, da mesma forma que outros compostos fenólicos. Carrão-Panizzi et al. (1999) estudaram os efeitos das condições de cultivo no teor de isoflavonas em diversas cultivares de soja e concluíram que em locais onde a temperatura média era mais alta, os níveis de isoflavonas eram menores. Isso pode ser confirmado pelos teores de isoflavonas das sojas Louis Dreyfus e Monsoy 8490, cultivadas no estado de Mato Grosso.

Além da temperatura, outros dois fatores podem explicar as baixas quantidades de isoflavonas das sojas Louis Dreyfus e Monsoy 8490 frente às outras. Para Louis Dreyfus, o ciclo de maturação pode ser responsável, pois segundo Carrão-Panizzi et al (1999) cultivares super precoces (Tabela 5) tendem a ter menores quantidades de isoflavonas. O mesmo se aplica para a cultivar Intacta 5936, que embora tenha sido produzida na região Sul, é de ciclo super precoce, apresentando menor teor de isoflavonas. Achouri; Boye & Belanger (2005) afirmam que como isoflavonas são compostos fenólicos, podem interagir de formas diferentes com componentes da matriz como as proteínas, por exemplo, sendo que Monsoy 8490 apresenta um dos maiores teores protéicos (Tabela 7), o que pode ter prejudicado a extração de suas isoflavonas (PAUCAR-MENACHO et al., 2010a).

Rostagno et al. (2009) afirmam que os teores totais de isoflavonas em soja variam entre 400 e 9500 $\mu\text{g g}^{-1}$. As cultivares de soja deste trabalho variaram entre 689 e 4661 $\mu\text{g g}^{-1}$ de isoflavonas, sendo que deve ser levado em consideração a existência de outros tipos de isoflavonas presentes na soja, embora as que foram determinadas sejam as mais abundantes. Rostagno; Palma & Barroso, (2003) encontraram cerca de 1200 $\mu\text{g g}^{-1}$ de isoflavonas com 10 min de extração por UA. A técnica de extração por ultrassom assistida, como citado por Rostagno et al. (2009) e Vilku et al. (2008) mostrou ser uma potente ferramenta para extração de isoflavonas e a avaliação de seu perfil em amostras de soja, como neste estudo.

5.6 Atividade antioxidante

Compostos químicos que possuem atividade antioxidante geralmente são aromáticos e contêm pelo menos uma hidroxila livre. A eficiência dos compostos fenólicos como antioxidantes depende, em grande parte, de suas estruturas químicas, e número e orientação relativa de grupos hidroxila ligados ao anel aromático. A determinação da inativação de

radicais livres é a técnica mais utilizada para estimar o potencial antioxidante de diferentes compostos (SCHMIDT et al., 2014).

Poucos estudos tem avaliado a eficácia dos compostos fenólicos como antioxidantes empregando a inibição enzimática da oxidoreductase peroxidase como indicativo. Esta enzima oxida compostos doadores de elétrons, protegendo as células de possíveis danos, e sua atividade se manifesta, principalmente, em situações de desequilíbrio físico-químico dos sistemas biológicos. O excesso da ação desta enzima pode resultar em danos indesejáveis nas células, por isto a atuação da peroxidase sobre diversos compostos doadores de elétrons a torna atrativa para se estimar a atividade antioxidante de grupos de compostos fenólicos diferentes (SOUZA et al., 2012).

O potencial antioxidante foi estimado nos extratos de FFM, FFE, FFI e isoflavonas (FFIs) de cada uma das dez cultivares de soja usando dois mecanismos de avaliação (inibição do radical livre DPPH e da enzima peroxidase), estimando o percentual de inibição referente a cada extrato ao longo do tempo, visando inferir sobre a estabilidade da ação antioxidante.

A Tabela 23 mostra que os extratos das FFM apresentaram ação inicial pró-oxidante e algumas cultivares apresentaram ação antioxidante mais prolongada. A cultivar Monsoy 8490 teve a maior ação, com 0,8 % de inibição de DPPH por μg de extrato fenólico. Compostos fenólicos podem atuar como pró-oxidantes por quelar ou reduzir metais e esta atividade é diretamente proporcional ao número de hidroxilas, o que significa que a mesma característica estrutural que aumenta a capacidade antioxidante pode também exacerbar o estresse oxidativo e os danos funcional e estrutural de biomoléculas. Portanto, há um limite entre os benefícios e os danos do uso destes compostos (BEHLING et al., 2004).

O perfil dos ácidos fenólicos (Tabela 12) pode explicar estes resultados, uma vez que foram detectadas pequenas quantidades e variabilidade de ácidos fenólicos nos extratos, com destaque apenas para ácido protocatecólico e vanilina, que têm sido bem relatados como tendo atividade antioxidante relativamente baixa, bem como atividade antifúngica. Outros compostos não identificados presentes nos extratos podem ter contribuído com efeito pró-oxidante observado (SOUZA et al., 2010).

Os extratos das FFE e FFI, (Tabela 23) das variedades de soja mostraram ação antioxidante semelhante, constante após 30 min para os extratos FFE e a partir dos 20 min para os extratos FFI.

Tabela 23. Inibição específica do radical DPPH por extratos frações fenólicas das cultivares de soja (% inibição μg fração fenólica⁻¹).

Tempo (min)	Cooperfibra	L. Dreyfus	M. 6972	M. 8490	M. 7639	I. 5936	Tornado	Vtop	I.7823	BRS 284	
0	-0,10	-0,21	-0,11	-0,19	-0,13	-0,11	-0,37	-0,12	-0,18	-0,14	FFM
10	-0,10	-0,19	-0,09	-0,12	-0,11	-0,07	-0,16	-0,12	-0,09	-0,13	
20	-0,10	-0,15	-0,07	-0,12	-0,10	-0,04	-0,11	-0,12	0,03	-0,08	
30	-0,10	-0,10	-0,05	0,81	-0,10	-0,03	-0,09	-0,13	0,13	-0,07	
40	-0,11	-0,04	-0,03	0,81	-0,10	0,01	-0,08	-0,14	0,19	-0,03	
50	-0,11	-0,03	0,01	0,81	-0,10	-0,01	-0,07	-0,15	0,23	0,02	
60	-0,12	0,10	0,06	0,81	-0,10	0,16	-0,05	-0,16	0,25	0,06	
0	0,27	0,17	0,27	0,24	0,35	0,34	0,31	0,00	0,28	0,09	FFE
10	0,46	0,46	0,28	0,29	0,38	0,48	0,34	0,09	0,40	0,17	
20	0,37	0,45	0,28	0,33	0,41	0,50	0,33	0,10	0,43	0,22	
30	0,51	0,48	0,27	0,37	0,42	0,52	0,41	0,20	0,47	0,26	
40	0,52	0,49	0,27	0,40	0,44	0,52	0,43	0,26	0,49	0,30	
50	0,52	0,49	0,27	0,42	0,44	0,52	0,40	0,29	0,50	0,32	
60	0,53	0,50	0,27	0,44	0,45	0,53	0,43	0,23	0,53	0,35	
0	0,36	0,11	0,20	0,06	0,28	0,34	0,00	0,18	0,35	0,20	FPI
10	0,36	0,16	0,22	0,19	0,38	0,37	0,18	0,30	0,40	0,32	
20	0,35	0,20	0,23	0,20	0,40	0,37	0,26	0,30	0,42	0,35	
30	0,34	0,23	0,23	0,22	0,46	0,37	0,30	0,34	0,43	0,38	
40	0,35	0,23	0,24	0,20	0,48	0,37	0,29	0,37	0,43	0,39	
50	0,34	0,27	0,24	0,20	0,49	0,37	0,33	0,40	0,44	0,41	
60	0,33	0,29	0,24	0,22	0,51	0,37	0,36	0,44	0,44	0,42	
0	1,85	7,92	2,91	10,98	2,50	1,08	1,32	1,70	2,36	0,15	FFIS
10	2,89	9,79	4,27	15,13	2,21	1,85	1,87	2,02	2,56	0,84	
20	3,85	10,06	4,61	14,82	3,33	1,68	2,09	2,40	2,59	0,81	
30	3,92	10,11	4,97	16,15	3,71	1,68	2,43	2,56	2,77	0,89	
40	4,57	10,18	5,74	18,43	3,91	2,08	2,93	2,47	3,35	1,13	
50	4,55	10,18	5,76	19,64	3,97	3,69	2,87	3,37	4,54	1,88	
60	5,67	10,16	6,34	22,07	4,53	4,06	3,82	3,30	4,59	2,07	

Os extratos de isoflavonas apresentaram os maiores potenciais de inibição do processo oxidativo, destacando a cultivar Louis Dreyfus, com 10,1% de inibição de DPPH por μg de extrato de indicado e a cultivar Monsoy 8490, com 22% de inibição de DPPH por μg de extrato. (Tabela 23). O consumo de DPPH por isoflavonas foi crescente ao longo do tempo para todas as cultivares e Louis Dreyfus e Monsoy 8490 mostraram percentuais de inibição maiores, mesmo com os menores conteúdos de isoflavonas ($706,6$ e $689,2 \mu\text{g g}^{-1}$). Genisteína é reportada por sua atividade antioxidante por diversos autores, porém outros flavonoides presentes no extrato podem ter interferido no meio reacional aumentando a ação antioxidante destes extratos (ROSTAGNO; PALMA; BARROSO, 2003; ROSTAGNO et al., 2009)

A inibição da ação da enzima PO foi também avaliada e a Tabela 24 mostra ação de inibição da atividade da enzima apenas pelos extratos das FFM das cultivares Cooperfibra, Monsoy 6972, Monsoy 7639, Intacta 7639 e Tornado, variando de 0,02 a 0,25% de inibição. As demais não mostraram capacidade de inibição da PO, o que indica que compostos fenólicos presentes nestes extratos podem ser substrato da enzima (SCHMIDT et al., 2014), portanto podem funcionar como pró-oxidantes para o processo catalisado enzimaticamente.

Os extratos das FFE mostraram aumento da inibição da enzima apenas após 40 min de reação, e os percentuais de inibição variaram entre 0,08 e 0,12%. Os extratos das FFI mostraram poucas variações do percentual de inibição da PO ao longo do tempo de reação e a cultivar BRS 284 mostrou maior capacidade de inibição, sendo também a que apresentou maior conteúdo total de ácidos fenólicos insolúveis em etanol (Tabela 12). Ácido ferúlico foi reportado como inibidor da atividade de PO (SCHMIDT et al., 2014), presente em ambas as frações reportadas, porém em baixas quantidades.

As FFIs mostraram o maior potencial de inibição de todas as frações fenólicas estudadas, chegando a 6% de inibição da atividade da PO por μg de extrato com a cultivar Louis Dreyfus, frisando que esta é a cultivar com um dos menores teores de isoflavonas ($706,6 \mu\text{g g}^{-1}$), junto com Monsoy 8490 (5,4% de inibição de atividade de PO e $689,2 \mu\text{g g}^{-1}$ de isoflavonas). Os resultados obtidos permitem inferir que as isoflavonas tem capacidade de inibição enzimática, porém em cultivares com maiores teores destes compostos não se obteve maior inibição da enzima, o que pode indicar que a associação com outros compostos fenólicos pode ser responsável por uma maior inibição enzimática.

Tabela 24. Inibição específica da atividade da PO por extratos frações fenólicas das cultivares de soja (% inibição μg fração fenólica⁻¹).

Tempo (min)	Cooperfibra	L. Dreyfus	M. 6972	M. 8490	M. 7639	I. 5936	Tornado	Vtop	I.7823	BRS 284	
0	-0,25	-0,81	0,08	-0,17	-0,13	0,08	-0,13	-0,81	-0,15	-0,14	FFM
10	-0,09	-0,37	0,09	-0,18	-0,03	0,09	-0,03	-0,44	-0,15	-0,14	
20	-0,06	-0,30	0,09	-0,17	-0,02	0,09	0,02	-0,40	-0,09	-0,02	
30	-0,04	-0,24	0,15	-0,15	-0,01	0,09	0,02	-0,34	-0,08	-0,05	
40	-0,02	-0,17	0,12	-0,12	0,01	0,10	0,00	-0,31	-0,11	-0,06	
50	0,01	-0,14	0,16	-0,10	0,04	0,11	0,01	-0,26	-0,09	-0,06	
60	0,05	-0,17	0,25	-0,10	0,06	0,11	0,02	-0,23	-0,09	-0,04	
0	0,08	0,06	0,09	0,01	0,08	0,09	0,11	-0,02	0,03	0,07	FFE
10	0,08	0,05	0,09	-0,01	0,08	0,07	0,10	-0,02	0,02	0,07	
20	0,08	0,05	0,09	-0,03	0,07	0,06	0,09	-0,03	0,01	0,07	
30	0,08	0,05	0,09	-0,03	0,08	0,06	0,10	-0,02	0,02	0,07	
40	0,09	0,06	0,09	-0,02	0,08	0,06	0,10	0,00	0,03	0,08	
50	0,10	0,06	0,10	-0,01	0,10	0,07	0,11	0,02	0,06	0,09	
60	0,12	0,07	0,11	0,01	0,11	0,08	0,12	0,06	0,12	0,10	
0	0,07	-0,04	-0,02	0,03	0,12	-0,05	-0,05	0,12	0,11	0,18	FPI
10	0,06	0,00	-0,02	0,02	0,17	-0,01	-0,01	0,15	0,10	0,21	
20	0,06	-0,02	-0,03	0,01	0,18	-0,02	-0,01	0,16	0,09	0,21	
30	0,06	-0,02	-0,02	0,02	0,18	-0,01	-0,01	0,16	0,10	0,21	
40	0,06	-0,01	0,00	0,03	0,19	-0,01	-0,01	0,16	0,10	0,21	
50	0,07	0,00	0,02	0,06	0,19	0,00	-0,01	0,16	0,11	0,21	
60	0,09	0,01	0,06	0,12	0,19	0,02	0,00	0,16	0,12	0,21	
0	0,96	1,31	1,43	1,77	0,45	-0,28	1,28	0,22	1,19	0,32	FFIS
10	0,73	1,30	1,31	0,93	0,22	-0,22	1,08	0,10	0,95	0,31	
20	0,82	1,49	1,45	1,07	0,19	-0,13	1,16	0,16	0,96	0,41	
30	1,14	2,10	1,61	1,95	0,10	0,11	1,37	0,36	1,10	0,50	
40	1,48	2,67	1,71	3,28	0,46	0,46	1,51	0,76	1,15	0,56	
50	1,62	3,32	1,83	5,83	0,43	0,95	1,71	0,93	1,27	0,63	
60	1,65	6,02	1,98	5,38	0,91	1,14	1,92	1,10	1,52	0,68	

5.7 Atividade antifúngica: inibição de α -amilase

A atividade de compostos funcionais sobre a enzima α -amilase já foi estudada por diversos autores (PAGNUSSATT et al., 2014; MOJICA et al., 2015; TELLES, 2015). Segundo Pagnussatt et al. (2014) a atividade inibidora de amilase a partir de extratos fenólicos pode constituir um mecanismo natural de defesa contra o ataque fúngico e seu potencial de atividade pode ser avaliado pela cinética de inibição da enzima amilase fúngica. A inibição de amilase dificulta a organização estrutural da célula microbiana, por impedir a obtenção de nutrientes pelo fungo a partir da degradação de amido em cereais, pois os compostos fenólicos se ligam ao sítio ativo da enzima causando sua inibição (PAGNUSSATT et al., 2013).

A atividade específica da amilase utilizada foi de $0,29 \text{ mg amido mg proteína}^{-1} \text{ min}^{-1}$. De todos os extratos avaliados, o de FFM foi o único que não proporcionou inibição marcante sobre a amilase fúngica. Embora fosse esperada presença de atividade antifúngica devido a relatos da literatura a respeito da eficiência dos ácidos fenólicos vanilina e protocatecólico (MIRA et al., 2008; SOUZA, 2010), majoritários neste extrato. Porém, na soja estes compostos não parecem exibir este mecanismo de proteção antifúngica. Vale ressaltar que os extratos de FFM foram obtidos a partir da aplicação de ultrassom assistida, sendo interessante estudar a influência desta técnica nas atividades funcionais do extrato.

Para os extratos de FFE, FFI e FFIs, observou-se que quanto maior a concentração do princípio ativo (referente a 1 mL), menor foi a porcentagem de inibição específica sobre a enzima. A concentração de ácidos fenólicos necessária para inibir 50% da atividade de amilase (IC_{50}) foi estimada pela plotagem de concentração de ácido fenólico contra percentual de inibição de cada fração, e as estimativas estão apresentadas na Tabela 25.

O somatório de ácidos fenólicos é maior nos extratos de FFI, porém, nos extratos de FFE, os ácidos fenólicos apresentaram valores de IC_{50} menores que os dos extratos da primeira, indicando que inibem a ação de amilase mesmo em concentrações muito baixas, provavelmente porque não estão ligados a outros compostos, como carboidratos, que podem diminuir sua ação funcional, e também a exposição dos grupamentos ativos é maior nesta forma livre (ACOSTA-ESTRADA; GUTIÉRREZ-URIBE; SERNA-SALDÍVAR, 2014).

Hemalatha et al. (2016) encontraram alta correlação entre atividade inibitória de amilase com conteúdo total de compostos fenólicos e seu perfil. Ademiluyi et al. (2014) avaliando atividade inibitória de amilase por compostos fenólicos de juta, encontraram correlação baixa ($R=0,47$) entre inibição da enzima e níveis de compostos fenólicos. O autor afirma que embora os percentuais de inibição da enzima pelos extratos tenha sido alta, a baixa

correlação mostra que compostos não fenólicos co-extraídos podem exercer efeito sinérgico junto aos ácidos fenólicos, o que pode explicar a maior eficácia de ação inibitória dos extratos de FFE, neste trabalho.

Tabela 25. Concentração de ácidos fenólicos presentes em extratos de FFE e FFI necessária para inibir em 50% a atividade da enzima amilase ($\mu\text{g mL}^{-1}$).

Cultivar	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Cooperfibra	0,74	0,42	nd	nd	0,07	0,02	1,07	0,39	0,25	1,31	FFE
Louis Dreyfus	0,35	0,46	nd	nd	0,08	0,01	1,13	0,30	0,18	nd	
Monsoy 6972	1,24	0,83	nd	0,33	nd	0,04	1,10	0,19	nd	nd	
Monsoy 8490	0,78	1,53	0,34	0,35	0,23	nd	1,07	0,55	0,48	3,54	
Monsoy 7639	2,08	0,76	nd	nd	0,24	0,17	3,21	0,73	1,14	nd	
Intacta 5936	0,97	0,56	nd	0,31	nd	3,13	0,66	0,28	0,13	nd	
Tornado	1,00	0,90	nd	0,51	nd	3,68	3,68	0,30	1,08	0,89	
Vtop	0,75	0,68	1,31	1,98	nd	0,54	3,15	0,72	0,70	3,22	
Intacta 7823	0,81	0,62	nd	0,26	nd	nd	2,63	0,40	0,44	1,00	
BRS 284	0,80	1,06	nd	nd	0,14	nd	3,59	0,49	1,15	0,95	
Cooperfibra	nd	14,59	15,17	0,32	2,05	19,35	1,69	2,51	1,97	nd	FFI
Louis Dreyfus	nd	13,41	10,61	0,08	1,91	18,56	1,39	1,14	1,60	nd	
Monsoy 6972	2,69	2,09	nd	0,04	0,56	12,57	0,39	0,79	0,79	nd	
Monsoy 8490	nd	16,53	4,69	0,61	1,37	34,86	0,29	1,67	2,05	nd	
Monsoy 7639	0,43	1,77	3,70	0,10	0,86	8,72	0,42	0,79	0,79	nd	
Intacta 5936	nd	9,50	14,77	0,20	1,28	19,06	1,55	1,48	1,33	nd	
Tornado	nd	6,60	14,25	0,19	0,89	8,60	2,02	1,11	1,28	nd	
Vtop	nd	Nd	7,03	0,30	1,10	11,20	0,65	3,09	0,88	nd	
Intacta 7823	3,75	5,87	14,12	0,35	1,59	19,91	1,71	1,82	2,31	nd	
BRS 284	nd	9,27	21,85	0,51	2,03	16,23	0,88	1,93	1,66	nd	

1 = gálico; 2 = protocatecólico, 3 = clorogênico; 4 = hidroxibenzóico, 5 = cafeico, 6 = serínico; 7 = vanilina; 8 = cumárico; 9 = ferúlico; 10 = quercetina; nd = não detectado na amostra.

O percentual de inibição de amilase neste trabalho apresentou correlação de $R=0,6$ com o somatório dos ácidos fenólicos solúveis em etanol, e alta correlação com ácido cafeico e vanilina ($R=0,93$), seguida de cúmarico ($R=0,79$), quercetina ($R=0,76$) e gálico ($R=0,71$), sendo que os ácidos cumárico, vanilina e gálico aparecem em todas as cultivares de soja e mostraram que para inibir a atividade da enzima são necessários em baixas concentrações.

Quanto as FFI, o ácido hidroxibenzóico se destaca pelos mais baixos valores de IC₅₀ estimados para inibição de amilase. Djeridane et al. (2015) afirmam que resíduos glicosídeos em compostos fenólicos podem diminuir a ação inibitória, o que pode explicar a menor eficiência dos extratos de FFI com relação aos extratos de FFE. A correlação entre inibição de amilase e somatório de ácidos fenólicos ligados foi baixa (R=0,42), a maior correlação encontrada foi entre inibição de amilase e ácido hidroxibenzóico (R=0,84), confirmando os resultados encontrados.

Para as isoflavonas determinadas nos extratos de FFIs também foi estimada a IC₅₀, como mostrado na Tabela 26. A genisteína é capaz de inibir a amilase estando presente em concentrações menores (0,46 a 3,53 µg mL⁻¹) que daidzeína (0,49 a 15,18 µg mL⁻¹).

Tabela 26. Concentração de isoflavonas presentes em extratos de FFIs necessária para inibir em 50% a atividade da enzima amilase (µg mL⁻¹).

Cultivar	Daidzeína	Genisteína
Cooperfibra	7,09	0,50
Louis Dreyfus	5,00	0,46
Monsoy 6972	11,53	3,53
Monsoy 8490	0,49	1,27
Monsoy 7639	13,01	3,53
Intacta 5936	7,03	0,75
Tornado	9,01	0,67
Vtop	10,16	1,33
Intacta 7823	6,83	1,11
BRS 284	15,18	1,68

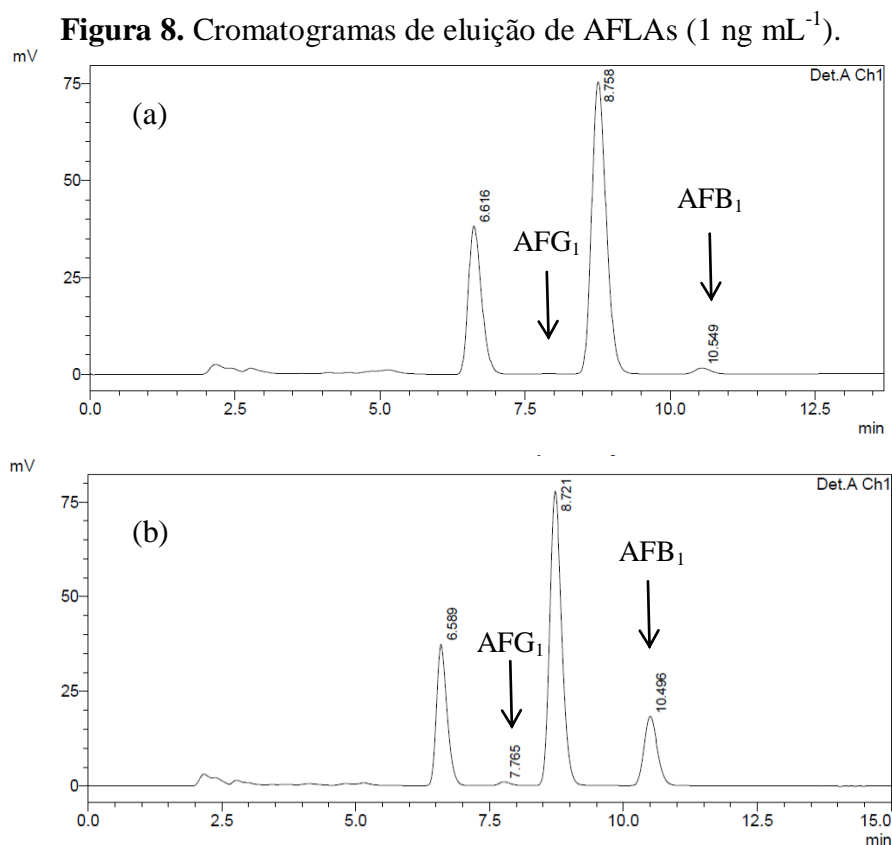
Naim et al. (1974) avaliaram a capacidade fungistática de isoflavonas sobre vários fungos, encontrando atividade fungicida em concentração da ordem de 0,005% de isoflavonas, sendo que esta atividade não aumentava quando a concentração passava para 0,1%. Kramer et al. (1984) porém, afirmaram não ter encontrado atividade notável de isoflavonas, apenas de outros isoflavonóides (isoflavanos), sobre o *Fusarium culmorum*. Estes relatos indicam que outros isoflavonóides não identificados podem ter auxiliado na atividade fungicida, lembrando que frações de isoflavonas livres são mais eficazes que glicosídeos na inibição (NAIM et al., 1974).

5.8 Determinação de aflatoxinas

5.8.1 Estabelecimento das condições cromatográficas

As aflatoxinas separadas por cromatografia líquida de alta eficiência eluíram na ordem: G₂, G₁, B₂ e B₁, sendo os tempos de retenção dos compostos 6,6; 7,8; 8,7 e 10,5 min, respectivamente. A eficiência da separação foi avaliada estimando o fator de retenção (k), sendo de 0,6; 0,7; 0,7 e 0,8, todos dentro da faixa considerada como adequada (0,5 e 20) para definir boa separação cromatográfica (HARRIS, 2003). O fator de separação (α) foi de 1,3 entre AFLAG₂ e AFG₁; 1,1 entre AFLAG₁ e AFLAB₂ e 1,3 entre AFLAB₂ e AFLAB₁. Segundo Soares (2006) fatores de separação iguais ou menores que 1,0 indicam que não houve separação satisfatória. Sendo assim, as aflatoxinas G₁ e B₂ apresentam fator separação entre si ligeiramente acima de 1, indicando que pode ocorrer interação entre estas durante a eluição, principalmente a partir de altos níveis de concentração.

Devido a baixa intensidade do sinal de fluorescência de AFLAB₁ e AFLAG₁, foi utilizada derivatização pós coluna para intensificar o sinal emitido destas micotoxinas e aumentar a sensibilidade da detecção (Figura 8).



Há diferença da intensidade do sinal de AFLAB₁ e AFLAG₁ com o uso do derivatizador pós coluna, sendo que a área foi 14 vezes maior para AFB₁ e 7 vezes maior para AFLAG₁ depois da derivatização. Yang, Chen, Zhang (2005) afirmam que a derivatização pós coluna apresenta vantagens frente a derivatização pré coluna. Ela é mais rápida, totalmente automatizada, e, portanto mais precisa e exata. Fato importante pois aumenta a sensibilidade da detecção e limita a influência de compostos da matriz que promovem a supressão do sinal.

Para avaliar a confiabilidade das condições do instrumento foram estudados parâmetros referentes a validação do mesmo (Tabela 27). A análise de regressão linear permite estabelecer a linearidade das concentrações detectadas com o aumento proporcional de sinal. Os parâmetros analíticos determinados foram considerados adequados, pois os coeficientes de correlação se encontram dentro do exigido pela ANVISA (2003) de no mínimo 0,99. As condições cromatográficas detectaram aflatoxinas em níveis mais baixos que os encontrados por Prietto (2015) que obteve limites de detecção de 0,4 ng mL⁻¹ para a AFLAB₁ e AFLAG₁ e 0,1 ng mL⁻¹ para AFLAB₂ e AFLAG₂.

As AFLAs foram extraídas por dois métodos e avaliou-se os parâmetros de validação para ambos (Tabela 28). Como AFLAs são compostos traços e a soja é um grão com grandes quantidades de carboidratos, lipídeos e proteínas, foi avaliado o efeito de matriz para verificar a influência destes compostos na extração. A porcentagem de efeito indicou influência da matriz na determinação das AFLAs analisadas, com supressão do sinal para AFLAB₁, AFLAB₂ e AFLAG₂ e intensificação de sinal para AFLAG₁. Para corrigir esse efeito, as recuperações foram estimadas com as curvas reproduzidas na matriz.

O melhor método foi escolhido considerando os percentuais de recuperação e de repetibilidade. O que apresentou recuperação mais próxima da faixa recomendada (70 a 120%) foi considerado melhor para a matriz de soja. Contrariando os resultados dos efeitos da matriz, mesmo com a correção, para o método de Soares e Rodrigues-Amaya os percentuais de recuperação indicam uma intensificação do sinal, para todas as AFLAs, com exceção da AFLAB₂, que apresentou valores baixos de recuperação. Considerando a relação entre os coeficientes angulares das curvas analíticas de matriz dos dois métodos e a curva analítica em solvente, no método de QuEChERS foram encontrados valores mais próximos de 1, (QuEChERS: 0,7; 0,3; 0,7; 0,4 e Soares e Rodrigues-Amaya : 0,2; 0,2; 0,3 e 0,2 para AFLAs B₁, B₂, G₁, G₂) indicando menor influência da matriz na determinação.

Tabela 27. Parâmetros de calibração do método cromatográfico para determinação de AFLAs.

	AFLAB₁	AFLAB₂	AFLAG₁	AFLAG₂
Equação da curva	$y = 327808x - 61557$	$y = 1023120,41x - 56950,5$	$y = 15923x - 5140,4$	$y = 513818x - 139984$
Linearidade	0,1 – 12 ng mL ⁻¹	0,07 – 8 ng mL ⁻¹	0,3 – 15 ng mL ⁻¹	0,1 – 15 ng mL ⁻¹
Coefficiente de correlação	0,9912	1,0000	0,9941	0,9971
LD _i	0,05 ng mL ⁻¹	0,025 ng mL ⁻¹	0,1 ng mL ⁻¹	0,05 ng mL ⁻¹
LQ _i	0,1 ng mL ⁻¹	0,07 ng mL ⁻¹	0,3 ng mL ⁻¹	0,1 ng mL ⁻¹

LD_i= limite de detecção do instrumento; LQ_i= limite de quantificação do instrumento;

Tabela 28. Parâmetros de validação dos métodos de extração de AFLAs.

	AFLAB₁		AFLAB₂		AFLAG₁		AFLAG₂	
	QuEChERS	Soares	QuEChERS	Soares	QuEChERS	Soares	QuEChERS	Soares
Efeito de matriz	44 a 74%	3 a 13%	15 a 37%	13 a 33%	797 a 868%	82 a 295%	44 a 109%	12 a 69%
Coefficiente de correlação	0,9852	0,9968	0,9889	0,9816	0,8236	0,8384	0,9894	0,9960
Recuperação (%)*								
Nível 1	105 (3,6)	110 (15,4)	127 (10,4)	32 (15,3)	3627 (8,0)	565 (10,3)	163 (3,2)	108 (1,8)
Nível 2	106 (1,4)	198 (8,6)	128 (2,3)	77 (7,8)	129 (23,0)	136 (28,3)	nd	103 (2,6)
Nível 3	117 (0,5)	211 (22,8)	1334 (6,1)	15 (16,7)	72 (3,2)	36 (12,5)	134 (9,2)	152 (4,1)
Média	109 (6,1)	173 (31,7)	530 (131,5)	41 (77,5)	1276 (159,6)	246 (114,4)	99 (87,8)	121 (26,9)
LD _m	0,03 ng g ⁻¹	0,02 ng g ⁻¹	0,016 ng g ⁻¹	0,01 ng g ⁻¹	0,06 ng g ⁻¹	0,04 ng g ⁻¹	0,03 ng g ⁻¹	0,02 ng g ⁻¹
LQ _m	0,06 ng g ⁻¹	0,04 ng g ⁻¹	0,05 ng g ⁻¹	0,03 ng g ⁻¹	0,2 ng g ⁻¹	0,12 ng g ⁻¹	0,06 ng g ⁻¹	0,04 ng g ⁻¹

nd= não determinado

LD_m= limite de detecção do método; LQ_m= limite de quantificação do método.

*Expressa como média e coeficiente de variação

A Tabela 28 mostra recuperação satisfatória nos três níveis apenas para AFLAB₁ quando extraída pelo método de QuEChERS, enquanto a curva de matriz mostra que quanto maiores as concentrações de AFLAs G₁ e B₂, mais superestimada foi a quantificação, possivelmente pelo baixo fator de separação entre elas, o que impossibilita a determinação destas duas AFLAs em concentrações maiores. A determinação de AFLAG₂ demonstra pouca seletividade, pois a porcentagem de efeito de matriz indica efeito supressor e as recuperações indicam interferência positiva da matriz.

A avaliação do efeito da matriz é importante na verificação de componentes traços. No caso da soja, a hipótese é de que a grande quantidade de macro componentes dificultem o processo de extração das AFLAs, como pode ser verificado pela discrepância entre os percentuais de recuperação.

Sendo assim, optou-se em determinar apenas AFLAB₁ nas amostras de soja, pois esta apresentou percentuais de recuperação aceitáveis quando utilizada a curva de matriz ($y=241703x-290583$) para quantificação, quando extraídas pelo método de QuEChERS. Dado a frequência com que este método tem sido usado, foi aplicado nas mesmas condições descritas pelos autores para outras matrizes e procederam-se as técnicas para validá-lo para soja. O limite de detecção deste método para determinação de AFLAB₁ foi de 0,03 ng g⁻¹ e o de quantificação 0,06 ng g⁻¹. Este método foi escolhido por ser mais simples, rápido e econômico quanto ao uso de solventes, e exato e preciso para determinação de AFLAB₁.

5.8.2. Análise de componentes principais

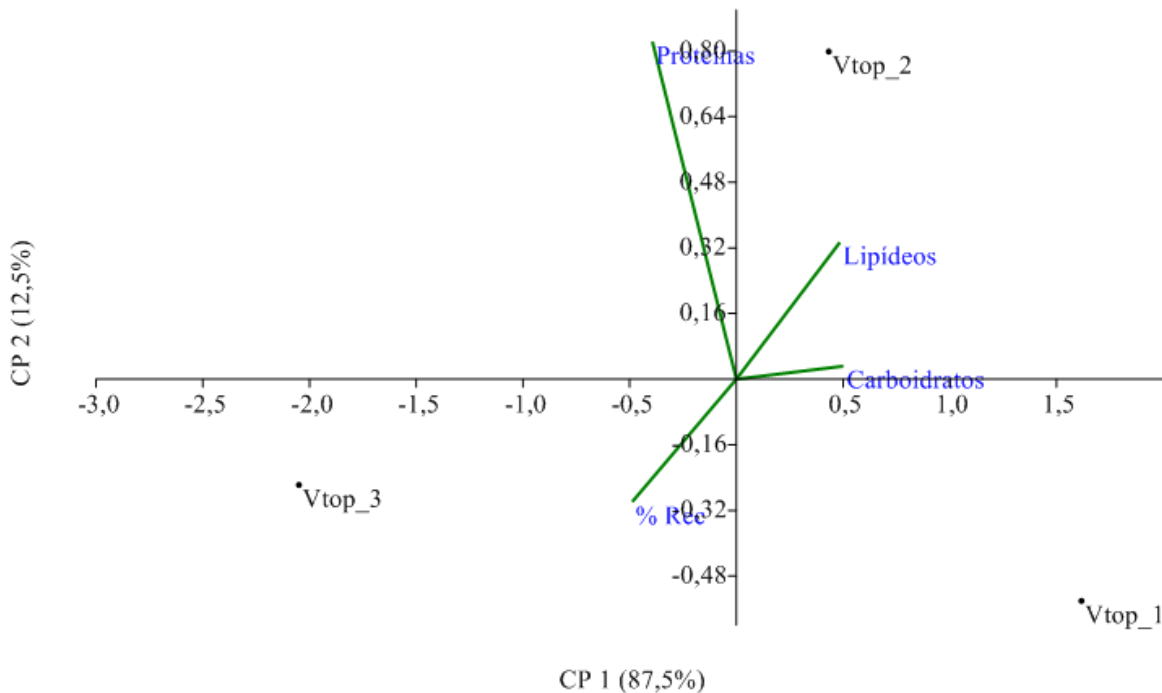
Para estimar quais componentes da matriz exerciam maior efeito na recuperação de AFLAB₁, foi realizada a Análise de Componentes Principais (ACP) (Figura 12). De acordo com Kupski & Badiale-Furlong (2015), este método de análise estatística permite compreender matematicamente as principais alterações nos dados, entendendo o que acontece com os resultados e quais os fatores devem ser manipulados para observar a sua melhora. ACP tem como fundamento a geração de novas variáveis, denominadas componentes principais, para explicar a variabilidade dos resultados, além de evidenciar a influência entre as diferentes variáveis estudadas, através da correlação de Pierson (R). Quanto maior este valor, em módulo, maior a relação entre a variável e o componente avaliado.

A variabilidade dos dados foi explicada por duas componentes. A componente 1 (CP 1) que explica 87,5% dos resultados e a componente 2 (CP2) que explica 12,5%. O percentual de proteínas apresentou menor correlação com a recuperação de AFLAB₁ (R=0,6), o que

indica que a mistura de sais utilizada na etapa de limpeza precipitou as proteínas, diminuindo os efeitos desse interferente. Os carboidratos e lipídeos apresentaram as maiores correlações com a recuperação, $R = -0,99$ e $-0,97$, respectivamente, indicando que quanto maior a quantidade destes componentes, menor é a recuperação de aflatoxinas.

Anastassiades et al. (2003) afirmam que acetonitrila é o solvente mais indicado para extração de contaminantes de polaridade baixa ou intermediária, pois extrai menores quantidades de interferentes apolares, sugerindo também, uma etapa de extração de lipídeos da amostra com hexano por exemplo, devido a imiscibilidade dos dois solventes.

Figura 9. Análise de componentes principais para estudo da recuperação de AFLAB₁ em soja.

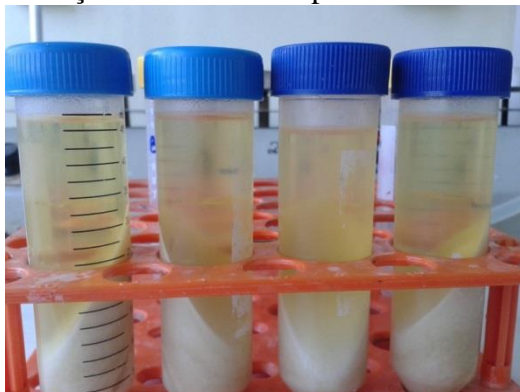


CP = componente principal

Neste trabalho, a etapa de remoção dos lipídeos com hexano foi realizada, porém, provavelmente esta não tenha sido suficiente para extrair estes interferentes, em especial no caso da soja, onde eles são abundantes. Segundo Anastassiades et al. (2003) quanto maior a quantidade de NaCl utilizada, menos compostos polares são co-extraídos, como por exemplo açúcares, ácidos orgânicos, como vanilina e hidroxibenzóico e alguns pigmentos. A cor dos extratos, mostrada na Figura 13 indica que pode haver presença de pigmentos co-extraídos, como flavonoides, presentes na soja.

Os resultados da ACP indicam que maiores quantidades de NaCl devem ser utilizadas, para remover com mais eficácia interferentes polares e a etapa de desergorduramento deve ser aprimorada para determinações em soja.

Figura 10. Extração de aflatoxinas pelo método de QuEChERS.



O método estudado foi aplicado para extração de AFLA B₁ nas amostras de soja, cujos resultados estão apresentados na Tabela 29. Não existe legislação para micotoxinas em soja, porém em outras leguminosas como feijão, o limite máximo tolerado de AFLAs é de 5 ng g⁻¹ (ANVISA, 2011).

Tabela 29. Ocorrência de AFLA B₁ em cultivares de soja.

Cultivar	Aflatoxina B ₁ (ng g ⁻¹)*
Cooperfibra	nd
Louis Dreyfus	nd
Monsoy 6972	1,7 (1,1)
Monsoy 8490	2,3 (4,9)
Monsoy 7639	1,2 (5,2)
Intacta 5936	nd
Tornado	1,1 (5,4)
Vtop	nd
Intacta 7823	nd
BRS 284	0,9 (9,8)

*Resultados expressos como média e coeficiente de variação.
nd= não detectado.

Foi detectada AFLAB₁ em 5 das 10 amostras analisadas. Todas as amostras apresentaram níveis de contaminação abaixo dos máximos permitidos pela legislação. Como os resultados apresentaram alta variabilidade entre si, pois são próximos ao limite de quantificação do método, para confirmação da presença de AFLAB₁ os extratos foram

submetidos à cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas. A presença de AFLAB₁ não foi confirmada pelo detector de massas. No entanto o limite de detecção do método é de 0,1 ng mL⁻¹, maior do que o limite de detecção de AFLAB₁ quando quantificada em detector de fluorescência, que é de 0,05 ng mL⁻¹, o que pode explicar a não detecção da desta AFLAB₁ pelo detector de massas. Embora a contaminação tenha sido detectada em baixos níveis, deve ser levado em consideração que grãos de soja são matéria prima para produção de diversos alimentos, além da contaminação que pode ocorrer por parte de outras matérias primas consumidas frequentemente pela população.

Os baixos níveis de contaminação detectados, bem como a baixa frequência, reforçam a hipótese inicial deste trabalho de que na soja estão presentes compostos com a ação antifúngica e que estes impedem a invasão por espécies toxigênicas de *Aspergillus*. A atividade antioxidante de compostos fenólicos também foi avaliada e associada à inibição da biossíntese de aflatoxinas por Kim et al. (2008), que verificaram inibição no crescimento de *Aspergillus flavus* em 95% dos cultivos onde foram adicionados compostos fenólicos.

A ACP foi realizada para correlacionar as frações fenólicas e suas atividades funcionais com a ausência de AFLAB₁ nas amostras de soja. Esta ferramenta permite correlacionar os resultados e neste estudo foram correlacionados os conteúdos fenólicos totais das frações etanólica, metanólica, insolúvel e isoflavonas, suas atividades biológicas antioxidante (método de DPPH e peroxidase) e antifúngica (inibição de amilase fúngica) com a ausência de AFLAB₁, para avaliar quais frações e atividades tiveram maior efeito sobre a aflatoxina.

Os ensaios de atividades antioxidante e antifúngica das frações fenólicas mostraram a que o perfil das frações é determinante na ação biológica e nem sempre é possível afirmar com certeza qual composto presente é responsável por tal efeito, tendo em vista a complexidade de compostos presentes nos extratos estudados, como pôde ser verificado pela determinação do conteúdo fenólico total. Sendo assim, em termos de fração fenólica, foi verificado através da plotagem dos resultados de cada variável (Figura 11) que o efeito das frações fenólicas insolúveis em etanol de inibição da amilase e de sequestro do radical DPPH apresentaram correlação de 0,92 com a ausência de AFLAB₁, mostrando que as frações fenólicas das cultivares de soja analisadas possuem mecanismos diferentes de atuação como inibidores enzimáticos e antioxidantes, principalmente devido a outros compostos não identificados presentes nos extratos.

As componentes principais 1 e 2 explicam 29,1e 21,6% da variância respectivamente, sendo as variáveis inibição de amilase (Amilase_FFI) e atividade antioxidante pelo método de

6. CONCLUSÃO

As cultivares de soja foram caracterizadas quanto aos seus componentes majoritários e foi verificado que a soja BRS 284 apresenta semelhança com as cultivares OGM quanto a composição proximal. As cultivares foram caracterizadas bioquimicamente e Louis Dreyfus e Monsoy 8490 se destacaram pela atividade de peroxidase (339,2 e 523 U mg proteína⁻¹, respectivamente).

Foram validados métodos para caracterizar frações fenólicas em cultivares de soja, que se mostraram boas fontes de frações etanólicas, metanólicas, insolúveis ou ligadas e isoflavonas. O perfil de ácidos fenólicos nas cultivares de soja estudadas mostrou que os mais frequentes foram ácido protocatecólico, vanilina, gálico, clorogênico e serínico. Quanto as isoflavonas, a validação do método otimizado por planejamento experimental indicou efeito da matriz na extração, maior para daidzeína, e os percentuais de recuperação estimados a partir da curva de matriz foram de 98% para daidzeína e 99,3% para genisteína. A soma do conteúdo das isoflavonas daidzeína e genisteína variou entre 707 a 4661 µg g⁻¹, diferenciando principalmente em função da região onde os grãos foram produzidos.

As frações fenólicas das cultivares de soja mostraram-se capazes de inibir a amilase fúngica de *Aspergillus oryzae* em baixas concentrações. A análise de componentes principais, considerando o perfil fenólico de cada fração e a inibição percentual da atividade de amilase promovida por elas mostrou que na fração solúvel em etanol e fração insolúvel em etanol os ácidos fenólicos que apresentaram maior correlação com a inibição foram vanilina (0,93) e hidróxibenzóico (0,84), respectivamente; e na fração de isoflavonas, a genisteína inibiu a amilase em concentrações menores que daidzeína, na ordem de 0,5 µg mL⁻¹.

Foram comparados os efeitos de matriz dos métodos de QuEChERS e Soares, Rodrigues-Amaya para extrair as aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ da matriz soja. O método de QuEChERS foi escolhido para determinar apenas AFLAB₁ por apresentar percentuais de recuperação entre 105 e 117% e limite de quantificação de 0,06 ng g⁻¹.

Quando a quantificação das aflatoxinas foi realizada em CLAE-FL verificou-se a presença de AFLAB₁ nas variedades Monsoy 6972, Monsoy 8490, Monsoy 7639, Tornado e BRS 284, em níveis variando de 0,9 a 2,3 ng g⁻¹, inferiores a legislação brasileira para outras leguminosas. A confirmação da contaminação foi feita por CLAE-MS que não corroborou com esse resultado, pois o limite de quantificação deste método (0,06 ng g⁻¹) foi superior ao encontrado com fluorescência (0,03 ng g⁻¹).

A baixa frequência e de nível de contaminação por AFLAB₁ e a capacidade inibidora de amilase fúngica das frações fenólicas da soja indicam que estes compostos tem ação protetora contra contaminação fúngica e a manifestação do potencial toxigênico deles. Não foi possível verificar de forma conclusiva esta relação com as modificações genéticas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHOURI, A.; BOYE, J. I.; BELANGER, D. Soybean isoflavones : Efficacy of extraction conditions and effect of food type on extractability. **Food Research International**, v. 38, p. 1199–1204, 2005.

ACOSTA-ESTRADA, B. A.; GUTIÉRREZ-URIBE, J. A.; SERNA-SALDÍVAR, S. O. Bound phenolics in foods: a review. **Food Chemistry**, v. 152, p. 46–55, 2014.

ADEMILUYI, A. O.; OBOH, G.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L. Effect of fermented soybean condiment supplemented diet on α -amylase and α -glucosidase activities in Streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Functional Foods**, v. 9, p. 1-9, 2014.

AGELET, L. E.; Armstrong, P. R., Tallada, J. G.; Hurburgh Jr. C. R. Differences between conventional and glyphosate tolerant soybeans and moisture effect in their discrimination by near infrared spectroscopy. **Food chemistry**, v. 141, n. 3, p. 1895-1901, 2013.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução – RDC N° 889, de 29 de maio de 2003. **Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos**, 2003.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Resolução – RDC N° 7, de 18 de fevereiro de 2011**. Limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Diário Oficial da União – Seção 1, n. 37, ISSN 1677-7042, 2011.

AGOSTINETTO, D.; DALMAGRO, T.; GALON, L.; MORAES, P.V.D.; TIRONI, S.P. Respostas de cultivares de soja transgênica e controle de plantas daninhas em função de épocas de aplicação e formulações de glyphosate. **Planta Daninha**, v. 27, n. 4, p. 739-746, 2009.

AGUIAR, C. L. Isoflavonas de soja e propriedades biológicas. **B.CEPPA**, Curitiba, v. 20, n. 2, p. 323-334, 2002.

ALU'DATT, M. H.; RABABAH, T.; EREIFEJ, K.; ALLI, I. Distribution, antioxidant and characterisation of phenolic compounds in soybeans, flaxseed and olives. **Food Chemistry**, v. 139, n. 1-4, p. 93–99, 2013.

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F.J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide in produce. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**. v.83, p. 412-431, 2003.

ARANGO, L.; BUDDRUS-SCHIEMANN, K.; OPELT, K.; LUEDERS, T.; HAESLER, F.; SCHMID, M.; ERNST, D.; HARTMANN, A. Effects of glyphosate on the bacterial community associated with roots of transgenic Roundup Ready® soybean. **European Journal of Soil Biology**, v. 63, p. 41-48, 2014.

ASHIQ, S.; HUSSAIN, M.; AHMAD, B. Natural occurrence of mycotoxins in medicinal plants: A review. **Fungal Genetics and Biology**, v. 66, p. 1–10, 2014.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official Methods of Analysis**. Horwitz, W. (Ed.). 17 th ed. Gaithersburg, 2000.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Validation of chemical methods for dietary**. Horwitz, W. (Ed.). 17 th ed. Gaithersburg, 2002.

BADIALE-FURLONG, E. Técnicas cromatográficas acessíveis para determinação de contaminantes fúngicos. **Scientia Chromatographica**, v. 7, p. 1-13, 2015

BALISTEIRO, D. M.; ROMBALDI, C. V.; GENOVESE, M. I. Protein, isoflavones, trypsin inhibitory and in vitro antioxidant capacities: Comparison among conventionally and organically grown soybeans. **Food Research International**, v. 51, n. 1, p. 8-14, 2013.

BARNES, S.; PRASAIN, J.; D’ALESSANDRO, T.; WANG, C.; ZHANG, H.; KIM, H. Preclinical Experiments Exploring the Soy–Cancer Prevention Hypothesis – Chapter 5: Soy Isoflavones, **Nutritional Oncology**, p. 559-571, 2006.

BARROS, N. E. F.; OLIVEIRA, E. M. M.; SILVA, O. F.; SILVA, J. T.; PASCHOALIN, V. F. M. Qualitative and quantitative assessment of genetically modified soy in enteral nutrition formulas by polymerase chain reaction based methods. **Revista Nutrição**, v. 23, n.1, p. 49-55, 2010.

BEHLING, E. B.; SENDÃO, M. C. Flavonóide quercetina : aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentos e Nutrição**, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.

BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16 n. 3, p. 497-516, 2003.

BERTIN, R. L.; GONZAGA, L. B.; BORGES, G. L. C.; AZEVEDO, M. S.; MALTEZ, H. F.; HELLER, M.; MICKE, G. A.; TAVARES, L. B. B.; FETT, R. Nutrient composition and, identification/quantification of major phenolic compounds in *Sarcocornia ambigua* (Amaranthaceae) using HPLC-ESI-MS/MS. **Food Research International**, v. 55, p. 404–411, 2014.

BHATNAGAR, D.; EHRLICH, K. C.; CLEVELAND, T. E. Molecular genetic analysis and regulation of aflatoxin biosynthesis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 61, p. 83-93, 2003.

BIEHL M.L.; BUCK, W.B. Chemical contaminants: their metabolism and their residues. **J. Food Nutr.**, v. 50, p.1058-1073, 1987

BOHN, T.; CUHRA, M.; TRAAVIK, T.; SANDEN, M.; FAGAN, J.; PRIMICERIO, R. Compositional differences in soybeans on the market : Glyphosate accumulates in Roundup Ready GM soybeans. **Food Chemistry**, v. 153, p. 207–215, 2014.

BOLANHO, B. C.; BELÉIA, A. D. P. Bioactive compounds and antioxidant potential of soy products. **Alimentos e nutricao**, v. 22, n. 4, p. 539-546, 2011.

CALORI-DOMINGUES, M. A.; RECHDAN, R. C.; MORETTI, A.; GLORIA, E. M.; ZAMBELLO, I. V.; CORRENTE, J. E.; DIAS, C. T. S. Evaluation of sample preparation procedures for aflatoxin analysis in raw peanut. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1409-1495, 2010.

CANÇADO, R. A. **Avaliação microbiológica e micotoxicológica de grãos de milho e soja (*Glycine max.* (Linné) Merrill) provenientes de cultivo convencional das sementes naturais e geneticamente modificadas.** 166 F. 2004. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

CAPRIOTTI, A. L.; CARUSO, G.; CAVALIERA, C.; SAMPERI, R.; VENTURA, S.; CHIOZZI, R.; LAGANA, A. Identification of potential bioactive peptides generated by simulated gastrointestinal digestion of soybean seeds and soy milk proteins. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 44, p. 205–213, 2015.

CARRÃO-PANIZZI, M. C. BELÉIA, A. D. P.; KITAMURA, K., OLIVEIRA, M. C. N. Effects of genetics and environment on isoflavone content of soybean from different regions of Brazil. **Pesq. agropec. bras.**, v.34, n.10, p. 1787–1795, 1999.

CARRERA, C. S.; REYNOSO, C. M.; FUNES, G. J.; MARTÍNEZ, M. J.; DARDANELLI, J.; RESNIK, S.L. Amino acid composition of soybean seeds as affected by climatic variables. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, n.12, p. 1579-1587, 2011.

CASTRO, M. D. L.; CAPOTE, F. P. Ultrasound-assisted crystallization (sonocrystallization). **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 14, p. 717–724, 2007.

CASTRO, R. J. S.; SOARES, M. H.; ALBERNAZ, J. R. M.; SATO, H. H. Biochemical characterization of solvent, salt, surfactant and oxidizing agent tolerant proteases from *Aspergillus niger* produced in different agroindustrial wastes. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 5, p.94–98, 2016.

CEDERROTH, C. R.; NEF, S. Soy, phytoestrogens and metabolism: A review. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 304, p. 30–42, 2009.

CESAR, I. C.; BRAGA, F. C.; SOARES, C. D. V.; NUNAN, E. A.; PIANETTI, G. A.; CONDESSA, F. A.; BARBOSA, T. A. F.; CAMPOS, L. M. M. Development and validation of a RP-HPLC method for quantification of isoflavone aglycones in hydrolyzed soy dry extracts. **Journal of Chromatography B**, v. 836, n. 1, p. 74-78, 2006.

CHEN, P. X.; BOZZO, G. G.; FREIXAS-COUTIN, J; J. A.; MARCONE, M. F.; PAULS, P. K.; TANG, Y.; ZHANG, B.; LIU, R.; TSAO, R. Free and conjugated phenolic compounds and their antioxidant activities in regular and non-darkening cranberry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seed coats. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 1047–1056, 2015.

CHIANG, W.; SHIH, C.; CHU, Y. Optimization of acid hydrolysis conditions for total isoflavones analysis in soybean hypocotyls by using RSM. **Food chemistry**, v. 72, n. 4, p. 499-503, 2001.

CHUNG, I.; SEO, S. H.; AHN, J. K.; KIM, S. H. Effect of processing, fermentation, and

aging treatment to content and profile of phenolic compounds in soybean seed, soy curd and soy paste. **Food Chemistry**, v. 127, n. 3, p. 960–967, 2011.

CIABOTTI, S.; BARCELLOS, M. F. B.; MANDARINO, J. M. G.; TARONE, A. G. Avaliações químicas e bioquímicas dos grãos, extratos e tofus de soja comum e de soja livre de lipoxigenase. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 5, p. 920-929, 2006.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Perspectivas para a agropecuária – Produtos de Verão**, Brasília, v.3, p. 1-130, fev. 2016. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_09_24_11_44_50_perspectivas_agropecuaria_2015-16_-_produtos_verao.pdf

COSTA, N. P.; PEREIRA, FERREIRA, L. A. G.; NETO, J. B. F. Método da peroxidase para identificação de cultivares de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 1, n. 1, p. 89-91, 1979.

DELARMELINO-FERRARESI, L. M.; VILLELA, F. M.; AUMONDE, T. Z. Desempenho fisiológico e composição química de sementes de soja. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 9, n.1, p. 14-18, 2014.

DEVAIAH, S. P.; SHETTY, H. S. Purification of an infection-related acidic peroxidase from pearl millet seedlings. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 94, n. 2, p. 119-126, 2009.

DIAS, M. I.; SOUSE, M. J.; ALVES, R. C.; FERREIRA, I. C. R. F. Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds : A review. **Industrial Crops & Products**, v. 82, p. 9–22, 2016.

DJERIDANE, A.; HAMDY, A.; BENSANIA, W.; CHEIFA, K.; LAKHDARI, I.; YOUSFI, M. The in vitro evaluation of antioxidative activity, α -glucosidase and α -amylase enzyme inhibitory of natural phenolic extracts. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 9, p.324–331, 2015.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Tecnologias de produção de soja na região central do Brasil**, 2000. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/producaosoja/SojanoBrasil.htm>. Acesso em: 14/12/2015.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Soja transgênica no Brasil: situação atual e perspectivas para os próximos anos**, 2004. Disponível em <http://www.sober.org.br/palestra/2/186.pdf>. Acesso em: 12/12/2015.

ESCRIVÁ, L.; FONT, G.; MANYES, L. In vivo toxicity studies of fusarium mycotoxins in the last decade : A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 78, p. 185–206, 2015.

ESTEVES, E. A.; MARTINO, H. S. D.; OLIVEIRA, F. C. E.; BRESSAN, J.; COSTA, N. M. B. Chemical composition of a soybean cultivar lacking lipoxygenases (LOX2 and LOX3). **Food chemistry**, v. 122, n. 1, p. 238-242, 2010.

FAO (Food and Agriculture Organization of United Nations). FAO corporate repository. Economic and Social Department Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. **Mycotoxin regulations in 2003 and current developments**, p. 1–20, 2003.

FELIX, M. A.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G. Disponibilidade de ferro *in vitro* de grãos de soja tostados por diferentes tratamentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 78-83, 2008.

FELTRIN, A. C. P. **Obtenção de peroxidase e avaliação de ação biodegradativa de Deoxinivalenol**. 2013. Dissertação (Mestrado em Química Tecnológica Ambiental), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2013.

FENG, G. H.; RICHARDSON, M.; CHEN, M. S.; KRAMER, K. J.; MORGAN, T. D.; REECK, G. R. α -Amylase inhibitors from wheat: amino acid sequences and patterns of inhibition of insect and human α -amylases. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 26, n. 5, p. 419-426, 1996.

FERREIRA, D. S.; PALLONE, J. A. L.; POPPI, R. J. Fourier transform near-infrared spectroscopy (FT-NIRS) application to estimate Brazilian soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] composition. **Food Research International**, v. 51, n. 1, p. 53-58, 2013.

FIGUEIRA, E. L. Z.; BLANCO-LABRA, A.; GARAGE, A. C.; ONO, E. Y. S.; MENDIOLA-OLAYA, E.; UENO, Y.; HIROOKA, E. Y. New amylase inhibitor present in corn seeds active *in vitro* against amylase from *Fusarium verticillioides*. **Plant disease**, v. 87, n. 3, p. 233-240, 2003.

FORTI, V. A.; CICERO, S. M.; PINTO, T. L. F. Avaliação da evolução de danos por “umidade” e redução do vigor em sementes de soja, cultivar tmg113-rr, durante o armazenamento, utilizando imagens de raios x e testes de potencial fisiológico. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 3 p. 123-133, 2010.

GARCIA, D.; RAMOS, A. J.; SANCHIS, V.; MARÍN, S. Predicting mycotoxins in foods : A review. **Food Microbiology**, v. 26, p. 757–769, 2009.

GARCIA-SALAS, P., MORALES-SOTO, A., SEGURA-CARRETERO, A., FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. **Molecules**, v. 15, n. 12, p. 8813–8826, 2010.

GREGORI, R.; MERIGGI, P.; PIETRO, A.; FORMENTI, S.; BACCARINI, G.; BATTILANI, P. Dynamics of fungi and related mycotoxins during cereal storage in silo bags. **Food Control**, v. 30, p. 280-287, 2013.

GROSS-STEINMEYER, K.; EATON, D. L.; Dietary modulation of the biotransformation and genotoxicity of aflatoxin B₁. **Toxicology**, v. 299, p. 69– 79, 2012.

HACKBART, H. C. S. **Biodegradação de aflatoxinas**. 2013. 169 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande, 2013.

HACKBART, H. C. S.; PRIETTO, L.; PRIMEL, E. G.; GARDA-BUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E. Simultaneous extraction and detection of ochratoxin A and citrinin in rice. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 1, p. 103-109, 2012.

HARRIS, D.C. **Análise química quantitativa**. 6ed. Rio de Janeiro: LTC Editora, p.876,

2003.

HEIDTMANN-BEMVENUTI, R.; HACKBART, H. C. S.; SOUZA, M. M.; BADIALE-FURLONG, E. Determinação de deoxinivalenol e zearalenona em arroz natural e parboilizado e suas frações utilizando QuEChERS e HPLC/UV-FL. **Química Nova**, v, 35, p. 1-6, 2012.

HEIDTMANN-BEMVENUTI, R.; MENDES, G. L.; SCAGLIONI, P. T.; BADIALE-FURLONG, E.; SOUZA-SOARES, L. A. Biochemistry and metabolism of mycotoxins : A review. **African Journal of Food Science**, v. 5, n. 16, p. 861–869, 2011.

HEMALATHA, P.; BOMZAN, D. P.; RAO, B. V. S.; SREERAMA, Y. N. Distribution of phenolic antioxidants in whole and milled fractions of quinoa and their inhibitory effects on α -amylase and α -glucosidase activities. **Food Chemistry**, v. 199, p. 330-338, 2016.

HOELTZ, M.; FAFUNDES, C. A.; ALCAYAGA, E. A. L.; NOLL, I. B. Micobiota e micotoxinas em amostras de arroz coletadas durante o sistema estacionário de secagem e armazenamento. **Ciência Rural**, v. 39, p. 803-808, 2009.

HOUX, J. H.; WIEBOLD, W. J.; FRITSCHI, F. B. Field Crops Research Rotation and tillage affect soybean grain composition , yield , and nutrient removal. **Field Crops Research**, v. 164, p. 12–21, 2014.

HUBER, D. A; FERRARESE, M. L. L.; DOBLINSKY, P. M. F.; FERRARESE-FILHO, O. Individual and interactive effects of phenolic acids on peroxidase and lipid peroxidation in soybean , soybean , Glycine max (L .) Merr . roots (Leguminosae - Faboidae). **Acta Scientiarum**, v. 24, n. 2, p. 625-629, 2002.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO); **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos**, DOQ-CGCRE-008. Revisão: 01, 2003.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Some naturally occurring substances, food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins, Lyon France: **World Health Organization**, v. 56, 1993.

KAMAL, J. K. A.; BEHERE, D. V. Kinetic stabilities of soybean and horseradish peroxidases. **Biochemical Engineering Journal**, v. 38, p. 110–114, 2008.

KIM., J. H.; YU, J.; MAHONEY, N.; CHAN, K. L.; MOLYNEUX, R. J.; VARGA, J.; BHATNAGAR, D.; CLEVELAND, T. E.; NIERMANN, W. C.; CAMPBELL, B. C. Elucidation of the functional genomics of antioxidant-based inhibition of aflatoxin biosynthesis. **International Journal of Food Microbiology**. v. 122., p. 49-60, 2008.

KLEJDUS, B.; MIKELOVÁ, R.; ADAM V.; ZEHNÁLEK, J.; VACEK J.; KIZEK, R.; KUBÁN, V. Liquid chromatographic–mass spectrometric determination of genistin and daidzin in soybean food samples after accelerated solvent extraction with modified content of extraction cell. **Analytica Chimica Acta**, v. 517, p. 1–11, 2004.

KRÄMER, R. F.; HINDORF, H.; JHA, H. C.; KALLAGE, J.; ZILLIKEN, F. Antifungal activity of soybean and chickpea isoflavones and their reduced derivatives. **Phytochemistry**,

v. 23, n. 10, p. 2203-2205, 1984.

KRUVE, A.; KUNNAPAS, A.; HERODES, K.; LEITO, I. Matrix effects in pesticide multi-residue analysis by liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1187, n. 1-2, p. 58-66, 2008.

KUMAR, V.; RANI, A.; DIXIT, A. K.; PRATAP, D.; BHATNAGAR, D. A comparative assessment of total phenolic content , ferric reducing-anti-oxidative power , free radical-scavenging activity , vitamin C and isoflavones content in soybean with varying seed coat colour. **Food Research International**, v. 43, n. 1, p. 323–328, 2010.

KUMAR, V.; RANI, A.; SOLANKI, S.; HUSSAIN, S.M. Influence of growing environment on the biochemical composition and physical characteristics of soybean seed. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 188–195, 2006.

KUPSKI, L.; BADIÁLE-FURLONG, E. Principal components analysis: An innovative approach to establish interferences in ochratoxin A detection. **Food chemistry**, v. 177, p. 354-360, 2015.

LABANCA, e. r. g. **Purificação parcial de elicitores presentes em *Saccharomyces cerevisiae* :atividade como indutores de resistência em pepino (*Cucumis sativus*) contra *Colletotrichum lagenarium* e da síntese de glicolinas em soja (*Glycine max*).** 2002, 118 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

LEE, J. H.; HWANG, S.; LEE, Y.; KIM, K.; CHO, K. M.; LEE, Y. B. Changes occurring in compositions and antioxidant properties of healthy soybean seeds [*Glycine max* (L.) Merr.] and soybean seeds diseased by *Phomopsis longicolla* and *Cercospora kikuchii* fungal pathogens. **Food chemistry**, v. 185, p. 205-211, 2015.

LI, H.; PORDESIMO, L.; WEISS, J. High intensity ultrasound-assisted extraction of oil from soybeans. **Food Research International**, v. 37, p. 731–738, 2004.

LIU D., HUANG Y., CHEN M., WANG S., LIU K.; LAI W. Rapid detection method for aflatoxin B₁ in soybean sauce based on fluorescent microspheres probe, **Food Control**, v. 50, p. 659-662, 2014.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin-phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MARDEGAN, F. U.; CARRÃO-PANIZZI, M.C.; MANDARINO, J.M.G.; OLIVEIRA, E.F.; SILVA, J.A.V. Comparação da composição química entre cultivares de soja isogênicas convencionais e transgênicas. **III Jornada Acadêmica da Embrapa Soja**, Embrapa Soja. Documentos, 297, p. 140-145, 2004.

MARKOVIC, R.; BALTIC, M. Z.; PAVLOVIC, M.; GLISIC, M.; RADULOVIC, S.; DJORDJEVIC, V.; SEFER, D. Isoflavones - from biotechnology to functional foods. **Procedia Food Science**, v. 5, p. 176–179, 2015.

- MARROQUÍN-CARDONA, A.G.; JOHNSON, N.M.; PHILLIPS, T.D.; HAYES, A.W. Mycotoxins in a changing global environment – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 69, p. 220–230, 2014.
- MARTINEZ, A. P. C.; MARTINEZ, P. C. C; SOUZA, M. C.; BRAZACA, S. G. C. Alteracoes quimicas em graos de soja com a germinação. **Ciência e Tecnologia Alimentos**, v. 31, n. 1, p. 23-30, 2011.
- MATUSZEWSKI, B. K.; CONSTANZER, M. L.; CHAVEZ-ENG, C. M. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 13, p. 3019-3030, 2003.
- MILAZZO, M. F.; SPINA, F.; CAVALLARO, S.; BART, J. C. J. Sustainable soy biodiesel. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 806–852, 2013.
- MIRA, N. V. M.; BARROS, R. M. C.; SCHIOCCHET, M. A.; NOLDIN, J. A.; LANFER-MARQUEZ, U. M. Extração, análise e distribuição dos ácidos fenólicos em genótipos pigmentados e não pigmentados de arroz (*Oryza sativa* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 4, p. 994–1002, 2008.
- MOJICA, L., MEYER, A., BERHOW, M. A., MEJÍA, E. G. Bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.) have similar high antioxidant capacity, *in vitro* inhibition of α -amylase and α glucosidase while diverse phenolic composition and concentration. **Food Research International**, v. 69, p. 38–48, 2015.
- MOLDES, C. A.; CAMIÑA, J. M.; MEDICI, L. O.; TSAI, S. M.; AZEVEDO, R. A. Physiological effects of glyphosate over amino acid profile in conventional and transgenic soybean (*Glycine max*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 102, p. 134–141, 2012.
- NAIM, M.; GESTETNER, B.; ZILKAH, S.; BIRK, Y.; BONDI A. Soybean isoflavones. Characterization, determination, and antifungal activity. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 22, n. 5, 1974.
- NAM, K.; KIM, D. Y.; PACK, I.; PARK, J.; SEO, J. S.; CHOI, Y. D.; CHEONG, J.; KIM, C. H.; KIM, C. G. Comparative analysis of chemical compositions between non-transgenic soybean seeds and those from plants over-expressing AtJMT, the gene for jasmonic acid carboxyl methyltransferase. **Food Chemistry**, v. 196, p. 236–241, 2016.
- NARITA, Y.; INOUE, K. Inhibitory effects of chlorogenic acids from green coffee beans and cinnamate derivatives on the activity of porcine pancreas α -amylase isozyme. **Food Chemistry**, v. 127, p. 1532–1539, 2011.
- NEMITZ, M. C.; TEIXEIRA, H. F.; POSER, G. L. VON. A new approach for the purification of soybean acid extract: Simultaneous production of an isoflavone aglycone-rich fraction and a furfural derivative-rich by-product. **Industrial Crops & Products**, v. 67, p. 414–421, 2015.
- NEVES, M. A.; V. A.; LOURENÇO, SILVA, E. J. Protein fractions and major globulin from chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Alimentos e Nutrição**, v. 12, p. 131-149, 2001.

- NEVES, J. A.; SILVA, R. A.; OLIVEIRA, L. R.; BATISTA, R. D. S. R. Determinação da presença de aflatoxinas em castanhas de caju. **Ciências Exatas e da Terra**, v. 15, n.1, p. 39-44, 2009.
- NISHINARI, K.; FANG, Y.; GUO, S.; PHILLIPS, G. O. Soy proteins: A review on composition, aggregation and Emulsification. **Food Hydrocolloids**, v. 39, p. 301-318, 2014.
- NORA, N. S. **Redução dos níveis de ocratoxina A por ação da enzima peroxidase**. 2015. 62 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2015.
- NOVELLI, P. K.; BARROS, M. M.; FLEURI, L. F. Novel inexpensive fungi proteases: Production by solid state fermentation and characterization. **Food Chemistry**, v. 198, p. 119-124, 2016.
- OLIVEIRA, M. A.; LORINI, I.; MALLMANN, C. A. As micotoxinas e a segurança alimentar na soja armazenada. In: Brazilian Journal Food Technology, III SSA, 2010, Florianópolis, SC, **Anais: As micotoxinas e a segurança alimentar na soja armazenada**. 2010.
- OLIVEIRA, M. S.; CIPOLATTI, E. P.; BADIALE-FURLONG, E.; SOARES, L. S. Phenolic compounds and antioxidant activity in fermented rice (*Oryza sativa*) bran. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 32, n. 3, p. 531–537, 2012.
- OSBORNE, T.B. The vegetable proteins. 2 ed. London: **Longmans**, 154 p. 1924.
- OVEISI, M.; JANNAT, B.; SADEGHI, N.; HAJIMAHMOODI, M.; NIKZAD, A. Presence of aflatoxin M₁ in milk and infant milk products in Tehran, Iran. **Food Control**, v. 18, p. 1216–1218, 2007.
- PAGNUSSATT, F. A.; DEL PONTE, E.; GARDA-BUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E. Inhibition of *Fusarium graminearum* growth and mycotoxin production by phenolic extract from *Spirulina* sp . **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 108, p. 21–26, 2014.
- PAGNUSSATT, F. A.; MEZA, S. L. V.; GARDA-BUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E. Procedure to Determine Enzyme Inhibitors Activity in Cereal Seeds. **Journal of Agricultural Science**, v. 4, n. 12, p. 85–92, 2012.
- PAGNUSSATT, F. A.; KUPSKI, L.; DARLEY, F. T.; FILODA, P. F.; DEL PONTE, E. M.; GARDA-BUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E. *Fusarium graminearum* growth inhibition mechanism using phenolic compounds from *Spirulina* sp, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 33, p. 75–80, 2013.
- PANANUN, T.; MONTALBO-LOMBOY, M.; NOOMHORM, A.; GREWELL, D.; LAMSAL, B. High-power ultrasonication-assisted extraction of soybean isoflavones and effect of toasting. **LWT - Food Science and Technology**, v. 47, n. 1, p. 199–207, 2012.
- PANOFF, B. **DETECÇÃO DO GENE DE PEROXIDASE EM SEMENTES DE SOJA**. 2013. 59 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, 2013.

- PARK, Y. K.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; MASCARENHAS, H. A. A. SCAMPARINI, A. R. P. Conversão de malonil- β -glicosil isoflavonas em isoflavonas glicosiladas presentes em alguns cultivares de soja brasileira. **Ciência e Tecnologia Alimentos**, v. 22, n. 2, p. 130-135, 2002.
- PAUCAR-MENACHO, L. M.; AMAYA-FARFÁN, J.; BERHOW, M. A.; MANDARINO, J. M. G.; MEJIA, E.G.; CHANG, Y.K. A high-protein soybean cultivar contains lower isoflavones and saponins but higher minerals and bioactive peptides than a low-protein cultivar. **Food Chemistry**, v. 120, p. 15–21, 2010a.
- PAUCAR-MENACHO, L. M.; BERHOW, M. A.; MANDARINO, J. M. G.; CHANG, Y. K.; MEJIA, E. G. Effect of time and temperature on bioactive compounds in germinated Brazilian soybean cultivar BRS 258. **Food Research International**, v. 43, n. 7, p. 1856–1865, 2010b.
- PEÑALVO, J. L.; NURMI, T.; ADLERCREUTZ, H. A simplified HPLC method for total isoflavones in soy products. **Food Chemistry**, v. 87, n. 2, p. 297-305, 2004.
- PENHA, L. A. O. **Análise comparativa da composição de soja orgânica e não orgânica**. 2003. 79 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2003.
- PEREIRA, V. L.; FERNANDES, J. O.; CUNHA, S. C. Mycotoxins in cereals and related foodstuffs: A review on occurrence and recent methods of analysis. **Trends in Food Science & Technology**, v. 36, p. 96 e 136, 2014.
- PICO, Y. Ultrasound-assisted extraction for food and environmental samples. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 43, p. 84-99, 2013.
- PRESTES, O. D.; FRIGGI, C. A.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS – um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1620-1634, 2009.
- PRIETTO, L.; MORAES, P. S.; KRAUS, R. B.; MENEGHETTI, V.; FAGUNDES, C. A. A.; BADIALE-FURLONG, E. Post-harvest operations and aflatoxin levels in rice (*Oryza sativa*). **Crop Protection**, v. 78, p. 172-177, 2015.
- REDONDO-CUENCA, A.; VILLANUEVA-SUÁREZ, M. J.; RODRÍGUEZ-SEVILLA, M. D.; MATEOS-APARICIO, I. Chemical composition and dietary fibre of yellow and green commercial soybeans (*Glycine max*). **Food Chemistry**, v. 101, p. 1216–1222, 2006.
- REZENDE, D. F. **Estudo comparativo de características físico-químicas e nutricionais da soja preta e amarela**. 2010. 135 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- RIBANI, M.; COLLINS, C.; BOTTOLI, C. B. G. Desenvolvimento e validação de método para separação de isoflavonas em extrato seco de soja. **Ciência e Natura**, v. 36, n. 3, p. 501-510, 2014.

ROSTAGNO, M. A.; PALMA, M.; BARROSO, C. G. Microwave assisted extraction of soy isoflavones. **Analytica Chimica Acta**, v. 588, n. 2, p. 274-282, 2007.

ROSTAGNO, M.A.; VILLARES, A.; GUILLAMON, E.; GARCIA-LAFUENTE, A.; MARTINEZ, J.A. Sample preparation for the analysis of isoflavones from soybeans and soy foods. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 2–29, 2009.

ROSTAGNO, M. A.; PALMA, M.; BARROSO, C. G. Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. **Journal of Chromatography**. v. 1012, p. 119-128, 2003.

SALDIVAR, X.; WANG, Y.; CHEN, P.; HOU, A. Changes in chemical composition during soybean seed development. **Food Chemistry**, v. 124, p. 1369–1375, 2011.

SANTOS, J.B.; FERREIRA, E.A.; OLIVEIRA, J.A.; SILVA, A. A.; FIALHO, C.M.T. Efeito de formulações na absorção e translocação do glyphosate em soja transgênica. **Planta Daninha**, v. 25, n. 2, p. 381-388, 2007.

SASSAHARA, M.; YANAKA, E. K.; NETTO, D. P. Occurrence of aflatoxins and zearalenone in feedstuffs destined to dairy cattle consumption in Northern Parana , Brazil. **Ciências Agrárias**, v. 24, n. 1, p. 63–72, 2003.

SBARDELOTTO, A.; LEANDRO, G. L. Escolha de cultivares de soja com base na composição química dos grãos como perspectiva para maximização dos lucros nas indústrias processadoras. **Ciência Rural**, v.38, n.3, p.614-619, 2008.

SCAGLIONI, P. T.; SOUZA, T. D.; SCHIMIDT, C. G.; BADIALE-FURLONG, E. Availability of free and bound phenolic compounds in rice after hydrothermal treatment. **Journal of Cereal Science**, v. 60, p. 526-532, 2014.

SCHMIDT, C. G.; GONÇALVES, L. M.; PRIETTO, L.; HACKBART, H. S.; BADIALE-FURLONG, E. Antioxidant activity and enzyme inhibition of phenolic acids from fermented rice bran with fungus *Rizhopus oryzae*. **Food Chemistry**, v. 146, p. 371–377, 2014.

SHAO, S., DUNCAN, A. M., YANG, R., MARCONE, M. F., RAJCAN, I., TSAO, R. Systematic evaluation of pre-HPLC sample processing methods on total and individual isoflavones in soybeans and soy products. **Food Research International**, v. 44, p. 2425–2434, 2011.

SHUTOV, A.; RUDAKOVA, A.; KAKHOVSKAYA, I.; SCHALLAU, A.; MARUYAMA, N.; WILSON, K. Limited proteolysis regulates massive degradation of glycinin, storage 11S globulin from soybean seeds: An in vitro model. **Journal of plant physiology**, v. 169, n. 13, p. 1227-1233, 2012.

SILVA, F. O.; PERRONE, D. Characterization and stability of bioactive compounds from soybean meal. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, p. 992-1000, 2015.

SILVA, M. R.; SILVA, M. A. P. Fatores antinutricionais : inibidores de proteases e lectinas. **Revista de nutrição**, v. 13, n. 2, p. 3–9, 2000.

SOARES, L. M. V. Curso Básico de Instrumentação para Analistas de Alimentos e Fármacos.

São Paulo: **Manole**, v. 1, 337 p., 2006.

SOARES, S. E. Phenolic acids as antioxidants. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71–81, 2002.

SOARES, L. M. V., RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic method. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 72, p. 22-6, 1989.

SOUZA, M. M.; RECARTE, V. M.; ROCHA, M.; CIPOLATTI, E. P.; BADIALE-FURLONG, E. Study on the extracting conditions of phenolic compounds from onion (*Allium cepa* L.). **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 68, n. 2, p. 192–200, 2009.

SOUZA, M. M.; PRIETTO, L.; RIBEIRO, A. C.; SOUZA, T. D.; BADIALE-FURLONG, E. Assessment of the antifungal activity of *Spirulina platensis* phenolic extract against *Aspergillus flavus*. **Ciência e agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1050–1058, 2011.

SOUZA, M. M.; ROCHA, M.; OLIVEIRA, M. S.; BADIALE-FURLONG, E. Evaluation of antifungal and antimycotoxin activities of phenolic extracts from rice bran. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 3, p. 437–441, 2012.

SOUZA, M. M.; OLIVEIRA, M. S.; ROCHA, M.; BADIALE-FURLONG, E. Avaliação da atividade antifúngica de extratos fenólicos de cebola, farelo de arroz e microalga *Chlorella pyrenoidosa*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 3, p. 680-685, 2010.

SOUZA, L. C. F.; ZANON, G. D.; PEDROSO, F. F. ANDRADE, H. L. Teor de proteína e de óleo nos grãos de soja em função do tratamento de sementes e aplicação de micronutrientes. **Ciência e agrotecnologia**, v. 33, n. 6, p. 1586-1593, 2009.

TAN-WILSON, A.; BANDAK, B.; PRABU-JEYABALAN, M. The PA domain is crucial for determining optimum substrate length for soybean protease C1: Structure and kinetics correlate with molecular function. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 53, p. 27-32, 2012.

TELLES, A. C. **Feijões: características químicas e ocorrência de aflatoxinas**. 2015. 78 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2015.

TIWARI, B. K. Trends in Analytical Chemistry Ultrasound : A clean, green extraction technology. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 100–109, 2015.

TRZECIAK, M. B. **Formação de sementes de soja: aspectos físicos, fisiológicos e bioquímicos**. 2010. 131 f. Tese (Doutorado em Ciência). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

TURNER, N. W.; SUBRAHMANYAMB, S.; PILETSKY, S. A. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 632, p. 168–180, 2009.

TUOMINEN, A. Phytochemistry Defensive strategies in *Geranium sylvaticum* , Part 2 : Roles of water-soluble tannins , flavonoids and phenolic acids against natural enemies. **Phytochemistry**, v. 95, p. 408–420, 2013.

TYUG, T. S.; PRASAD, K. N.; ISMAIL, A. Antioxidant capacity, phenolics and isoflavones in soybean by-products. **Food chemistry**, v. 123, n. 3, p. 583-589, 2010.

USDA. United States Department of Agriculture. **Economic Research Service, July 15, 2015**. Disponível em: http://www.ers.usda.gov/media/1515231/er_ocs15g.pdf.

VALÁRIO, B. P.; CAVARIANI, C.; FRANÇA-NETO, J. B.; VIEIRA, E. S. N.; BRAVO, J. P.; SILVA, E. A. A. Use of “ EP ”(Peroxidase) allele in soybean varietal characterization. **Journal of Seed Science**, v.36, n.4, p. 465–470, 2014.

VERARDO, V.; RICIPUTI, Y.; GARRIDO-FRENICH, A.; CABONI, M.F. Determination of free and bound phenolic compounds in soy isoflavone concentrate using a PFP fused core column. **Food Chemistry**, v. 185, p. 239–244, 2015.

VIDAL, J. C.; BONEL, L.; EZQUERRA, A.; HERNÁNDEZ, S.; BERTOLÍN, J. R.; CUBEL, C.; CASTILLO, J. R. Electrochemical affinity biosensors for detection of mycotoxins: A review. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 49, p. 146–158, 2013.

VILKHU, K.; MAWSON, R.; SIMONS, L.; BATES, D. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry — A review. **Innovative Food Science and Emerging Technologies** ,v. 9, p. 161–169, 2008.

WANG, W.; ZHOU, J.; WANG, X.; ZHANG, N.; SUN, X.; MA, Z. Isolation, identification and antioxidant activity of bound phenolic compounds present in rice bran. **Food chemistry**, v. 171, p. 40–9, 2014.

WANYO, P.; MEESO, N.; SIRIAMORNUN, S. Effects of different treatments on the antioxidant properties and phenolic compounds of rice bran and rice husk. **Food Chemistry**, v. 157, p. 457–463, 2014.

WEI, Q.; JONE, W. W.; FANG, T. J. Study on Isoflavones Isomers Contents in Taiwan’s Soybean and GM Soybean. **Journal of Food and Drug Analysis** , v. 12, n. 4, p. 2004, 2004.

WHITE, B.L.; OAKES, A. J.; SHI, X.; PRICE, K. M.; LAMB, M. C.; SOBOLEV, V. S.; SANDERS, T. H.; DAVIS, J. P. Development of a pilot-scale process to sequester aflatoxin and release bioactive peptides from highly contaminated peanut meal. **LWT - Food Science and Technology**, v. 51, p. 492-499, 2013.

WORLD AND HEALTH ORGANIZATION (WHO). Evaluation of certain mycotoxins in food. **Technical Report Series**, v. 906, p.1–62, 2002.

WU, J.; MUIR, A. D. Isoflavone during protease hydrolysis of defatted soybean meal. **Food Chemistry**, v. 118, n. 2, p. 328–332, 2010.

YANG, M.; CHEN, J.; ZHANG, X. Immunoaffinity column clean-up and liquid chromatography with post-column derivatization for analysis of aflatoxins in traditional

Chinese medicine. **Chromatographia**, v. 62, n. 9-10, p. 499-504, 2005.

YATSU, F. K. J.; PEDRAZZA, G. P. R.; ARGENTA, D. F.; BARRETO, F.; NEMITZ, M. C.; TEIXEIRA, H. F.; KOESTER, L. S.; BASSANI, V. L. A new simplified and stability indicating liquid chromatography method for routine analysis of isoflavones aglycones in different complex matrices. **Food Analytical Methods**, v.7, p. 1881-1890, 2014.

YU, X.; YUAN, F.; FU, X.; ZHU, D. Profiling and relationship of water-soluble sugar and protein compositions in soybean seeds. **Food chemistry**, v. 196, p. 776-782, 2016.

XIE, F.; LAI, W.; SAINI, J.; SHAN, S.; CUI, X.; LIU, D. Rapid pretreatment and detection of trace aflatoxin B₁ in traditional soybean sauce. **Food Chemistry**, v. 150, p. 99–105, 2014.

ZERAIK, A. E.; SOUZA, F. S.; FATIBELLO-FILHO, O.; LEITE, O. D. Desenvolvimento de um spot test para o monitoramento da atividade da peroxidase em um procedimento de purificação. **Química Nova**. v. 31, n. 4, p. 731-734, 2008.

ZHAO, Z.; WANG, Q.; WANG, K.; BRIAN, K.; LIU, C.; GU, Y. Bioresource Technology Study of the antifungal activity of *Bacillus vallismortis* ZZ185 in vitro and identification of its antifungal components. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 1, p. 292–297, 2010.

ZOBIOLE, L. H. S.; OLIVEIRA, R. S.; CONSTANTIN, J.; OLIVEIRA, A.; CASTRO, C.; OLIVEIRA, F. A.; KREMER, R. J.; MOREIRA, A.; ROMAGNOLI, L.M. Acúmulo de nutrientes em soja convencional e soja RR em diferentes tipos de controle de planta daninha. **Planta Daninha**, v. 30, n. 1, p. 75-85, 2012.