UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
CURSO DE AGRONOMIA

# BIOMETRIA E ANÁLISE DA PRESENÇA DE LIPOXIGENASES EM SEMENTES DE GENÓTIPOS DE SOJA SUBMETIDAS A DIFERENTES TEMPOS DE EMBEBIÇÃO

JOÃO LUCAS COTRIM FONTANA

MONOGRAFIA DE GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

BRASÍLIA- DF
JUNHO/2017

Universidade de Brasília – UnB

Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária – FAV

Curso de Agronomia

Biometria e análise da presença de lipoxigenases em sementes de genótipos de soja submetidas a diferentes tempos de embebição

João Lucas Cotrim Fontana

Matrícula: 13/0029289

Projeto final de Estágio Supervisionado, submetido à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do grau de Engenheiro Agrônomo.

APROVADO PELA BANCA EXAMINADORA:

_____

Professor Ph.D. Carlos Roberto Spehar

Universidade de Brasília - UnB

Orientador

_____

Professora Dra. Nara Oliveira Silva Souza

Universidade de Brasília - UnB

(Examinador)

_____

Professor Dr. Ernandes, Rodrigues de Alencar

Universidade de Brasília - UnB

(Examinador)

## FICHA CATALOGRÁFICA

FONTANA, J.L.C.
Biometria e análise da presença de lipoxigenases em sementes de genótipos de soja submetidas a diferentes tempos de embebição/João Lucas Cotrim Fontana; orientação de Carlos Roberto Spehar – Brasília, 2017.
35p.; il.
Monografia - Universidade de Brasília/ Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2017.

1. *Glycine max* (L.) Merrill. 2. alimentação humana. 3. Lipoxigenases. 4. Colorimétrico. 5. Biometria. 6. soja com ausência de lipoxigenases. I. Spehar. C.R. II. Ph.D.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

FONTANA, J.L.C. **Biometria e análise da presença de lipoxigenases em sementes de genótipos de soja submetidas a diferentes tempos de embebição** 2017. 35p. Monografia (Graduação em Agronomia) – Universidade de Brasília – UnB, Brasília, 2017.

CESSÃO DE DIREITOS
**Nome dos Autores:** João Lucas Cotrim Fontana.
**Título da Monografia de Conclusão de Curso:** Biometria e análise da presença de lipoxigenases em sementes de genótipos de soja submetidas a diferentes tempos de embebição.
**Grau:** 3º **Ano:** 2017
É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta monografia e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. Os autores reservam-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta monografia pode ser reproduzida sem a autorização por escrito dos autores.

_____

João Lucas Cotrim Fontana

CPF: 005.455.941-38/Matrícula: 13/0029289

Tel.: (61) 991874392/E-mail: fontanajlc@gmail.com

## DEDICATÓRIA

*Dedico esse trabalho à minha família e a todos os meus amigos.*

## AGRADECIMENTOS

*Ao meu orientador Professor Carlos Roberto Spehar, agradeço pela imensa dedicação, profissionalismo, caráter e boa vontade, além das sempre muito bem-vindas palavras de apoio e motivação e sua grande experiência, tanto profissional quanto de vida.*

*À Professora Nara Oliveira Silva Souza, agradeço pela grande ajuda na definição da metodologia e por sua sempre grande disponibilidade nas orientações.*

*Ao Professor Ernandes Rodrigues de Alencar, agradeço pela plena disposição e ajuda nas aferições com o colorímetro e no tratamento dos dados experimentais.*

*Ao laboratorista Marcio Antônio Mendonça, que foi peça fundamental para o sucesso do experimento nas análises laboratoriais, agradeço por sua boa vontade, amizade e auxílios empregados nesse processo.*

*Aos meus colegas de curso e amigos Mariana Bohme e Robson Nunes Spies, agradeço pela ajuda e companheirismo que foram conferidas em todas as etapas do experimento.*

*Aos meus colegas de curso e amigos Amanda Regina Nunes, Clara Costa Moreira, Cristiano Vinicius Moreira, Gabriel Silva, Lucas Melo e Natália Echer, agradeço por todo o apoio e amizade que foram essenciais para o florescer deste trabalho.*

*À minha família, por todo o amor, apoio e estrutura proporcionados para que essa jornada fosse a mais agradável possível.*

*Agradeço à toda a equipe do Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura – IICA, pelo apoio e amizade conferidos. Principalmente nas pessoas de Lucia Maia, Carolina Fleury e Claudio Lima e Rodolfo Daldegan.*

*Agradeço à Universidade de Brasília, pelas oportunidades que tive durante os anos de estudo e todas as incríveis experiências que me foram proporcionadas.*

FONTANA, J.L.C. **Biometria e análise da presença de lipoxigenases em sementes de genótipos de soja submetidas a diferentes tempos de embebição.** 2017. 35p. Monografia (Graduação em Agronomia) – Universidade de Brasília – UnB, Brasília, 2017.

## RESUMO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma das culturas mais importantes à nível mundial, no ocidente normalmente é utilizada para a produção de óleo e na alimentação animal. No oriente, o consumo de soja para a alimentação humana é cotidiano, tendo vários subprodutos como: edamame (grãos verdes consumidos como hortaliça), broto, leite (extrato hidrossolúvel), shoyu (molho), natto (grãos moles fermentados cobertos por polímero viscoso) ou tofu. Devido ao seu grande potencial nutricional e efeitos benéficos à saúde o consumo de soja é muito indicado, tendo uma grande quantidade de proteínas, vitaminas e lipídios, sendo assim uma boa alternativa alimentar. Um fator que impede o mais amplo consumo de soja e seus derivados, para a alimentação humana, é o sabor desagradável "beany flavor" atribuído pelas enzimas lipoxigenases. Essas enzimas catalisam a oxigenação estereoespecífica e a hidroperoxidação de lipídios, liberando compostos voláteis de cadeias curtas como aldeídos e cetonas. Para a detecção dessas enzimas existem alguns testes que podem ser utilizados, o método bioquímico colorimétrico, é uma forma simples e rápida de se identificar a presença de lipoxigenases, porem sua utilização tem sido descrita para sementes secas, o método utilizado para a detecção em sementes embebidas é mais complexo e de difícil execução. Este trabalho teve por objetivo a caracterização biométrica e avaliação do método colorimétrico para diferentes tempos de embebição de sementes de genótipos de soja do tipo alimento. Dessa forma, foram analisadas características morfológicas e a presença de lipoxigenases de oito genótipos de soja do tipo alimento, a partir de análises laboratoriais, utilizando o método colorimétrico, e a determinação da viabilidade do uso deste para a avaliação da presença de lipoxigenases em sementes embebidas até 24 horas. As analises demonstraram que os genótipos BRS 213, BRS 257 e UFVTN 105 apresentam ausência das três enzimas lipoxigenases, enquanto BRSMG 790A, BRSMG 800A, Preta, SP e Verde apresentam reação positiva para a presença de Lox1, Lox2 e Lox3. A utilização do método bioquímico colorimétrico é suficiente para demonstrar a presença de lipoxigenases tanto em sementes de soja secas como embebidas por 24 horas.

**Palavras-chaves**: *Glycine max* (L.) Merrill, alimentação humana, lipoxigenases, colorimétrico, biometria, soja com ausência de lipoxigenases.

FONTANA, J. L. C. **Biometry and analysis of the presence of lipoxygenases in seeds of soybean genotypes submitted to different soaking times.** 2017. 35p. Monografia (Graduação em Agronomia) – Universidade de Brasília – UnB, Brasília, 2017.

## ABSTRACT

Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) is one of the most important crops in the world, in the west it is normally used for oil production and animal feed. In the east, the human consumption of soybeans is daily, with several by-products such as edamame (green grains consumed as vegetables), sprouts, milk (water soluble extract), shoyu (sauce), natto (fermented soft grains covered with viscous polymer) or tofu. Due to it's great nutritional potential and beneficial health effects, the consumption of soy is very indicated, having a great amount of proteins, vitamins and lipids, thus being a good alternative food. One factor that impedes the broader consumption of soybeans and their derivatives for human consumption is the unpleasant "beany flavor" attributed by the lipoxygenase enzymes. These enzymes catalyze stereospecific oxygenation and lipid hydroperoxidation, releasing short chain volatile compounds such as aldehydes and ketones. For the detection of these enzymes there are some tests that can be used, the biochemical colorimetric method is a simple and quick way to identify the presence of lipoxygenases. However, it's use has been described for dry seeds, the method used for detection in seeds is more complex and difficult to execute. This work aimed to the biometric characterization and evaluation of the colorimetric method for different soaking times of soybean genotypes of the food type. Thus, morphological characteristics and the presence of lipoxygenases from eight soybean genotypes of the food type were analyzed from laboratory analyzes using the colorimetric method and the feasibility of using the latter to evaluate the presence of lipoxygenases in imbibed seeds up to 24 hours. The analyzes showed that genotypes BRS 213, BRS 257 and UFVTN 105 there is absence of the three lipoxygenases enzymes, whereas BRSMG 790A, BRSMG 800A, genotypes Black, SP and Green present a positive reaction for the presence of Lox1, Lox2 and Lox3. The use of the biochemical colorimetric method is sufficient to demonstrate the presence of lipoxygenases in both dry and imbibed soybean seeds for 24 hours.

**Keywords**: *Glycine max* (L.) Merrill, human food, lipoxygenases, colorimetrics, biometry, lipoxygenase-free soybean.

**SUMÁRIO**

1. INTRODUÇÃO ..... 1
2. JUSTIFICATIVA ..... 3
3. OBJETIVOS ..... 4
3.1. Objetivo Geral ..... 4
3.2. Objetivos Específicos ..... 4
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA ..... 5
4.1. A soja no Mundo ..... 5
4.2. Soja do tipo alimento (alimentação humana) ..... 5
4.3. Qualidade Nutricional da soja ..... 6
4.4. Processos de rancificação em soja ..... 7
4.5. Lipoxigenases ..... 7
5. MATERIAL E MÉTODOS ..... 9
5.1. Genótipos Utilizados ..... 9
5.2. Caracterização e biometria ..... 9
5.2.1. Peso de 100 sementes ..... 9
5.2.2. Comprimento e largura ..... 10
5.2.3. Coloração do tegumento e do hilo ..... 10
5.3. Teste bioquímico colorimétrico ..... 10
5.3.1. Preparo das Amostras ..... 10
5.3.2. Preparo do Substrato – Linoleato de Sódio ..... 10
5.3.3. Preparo da Solução de Betacaroteno ..... 11
5.3.4. Preparo do Extrato do genótipo Kanto 102 ..... 11
5.3.5. Preparo da Solução de Azul de Metileno 0,1nM ..... 11
5.3.6. Solução tampão fosfato 0,2M ..... 11
5.3.7. Preparo da solução tampão borato 0,2M pH 9,5 ..... 11
5.3.8. Preparo das Soluções de Lox1 e Lox3 ..... 12
5.3.9. Teste para Lipoxigenases 1 e 3 ..... 12
5.4. Testes para presença de lipoxigenases em sementes submetidas a diferentes

tempos de embebição ..... 13
5.5. Análise estatística ..... 15
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO ..... 16
7. CONCLUSÕES ..... 20
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... 21

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Significado geométrico das coordenadas (L*), (a*), (b*), (h°) e (c*)(HUNTERLAB, 1978).....14

**Figura 2.** Equações de Hue° (h°) e croma (c*). .....15

**Figura 3.** Gráfico de comparação dos tratamentos de acordo com a coloração apresentada (Hue°), BRSMG 790A (Presença das três Lox) e BRS257 (Triplo nulo para lipoxigenases) .....19

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Genótipos selecionados e características morfológicas - cor do tegumento e (CT) - origem ..... 9
**Tabela 2.** Leituras de presença ou ausência de lipoxigenases ..... 13
**Tabela 3.** Genótipos de soja selecionados para o teste bioquímico colorimétrico com diferentes tempos de embebição ..... 13
**Tabela 4.** Biometria de sementes de soja do tipo alimento - cumprimento (C), largura (L) e Peso de 100 sementes (P100) ..... 16
**Tabela 5.** Características qualitativas das sementes de soja cor do tegumento (CT), cor do hilo (CH) e presença ou ausência de lipoxigenases. ..... 17
**Tabela 6.** Comparação colorimétrica dos tratamentos com presença e ausência de lipoxigenases submetidos a diferentes tempos de embebição (TE), luminosidade (L), tonalidade (°Hue) e intensidade da cor (CROMA) ..... 18

# 1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a sojicultura detém a maior área cultivada e produção entre os cultivos de grãos. Ademais, o país é o maior exportador de soja do mundo (CONAB, 2017). Em decorrência, a cultura tem se destacado pela grande importância econômica, sendo o consumo quase totalmente destinado à produção de óleo e farelo, este último destinado à alimentação animal. Há inúmeros outros subprodutos da soja, abrangendo a indústria alimentícia, de cosméticos e fármacos. Por seus vários usos, a produção de soja tem crescido de forma exponencial, passando de 51 milhões de toneladas em 1998 para 113,92 milhões de toneladas em 2017 (MIRANDA, 2005; CONAB, 2016, CONAB, 2017). Entretanto apenas cerca de 6% da produção são destinados à alimentação humana (EMBRAPA, 2011; SILVA et al., 2009)

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) apresenta em torno de 40% de proteínas, além de diversos outros nutrientes, sendo considerada alimento de excelente qualidade, tanto para a alimentação animal quanto humana (EMBRAPA, 2011). Diferentemente de outros países, principalmente os orientais, onde o consumo de soja e seus derivados está presente na dieta diária há milhares de anos, a presença da soja na alimentação do brasileiro é bastante limitada (YOKOMIZO; DUARTE, 2000). No Japão, a utilização da soja é bastante comum, com produtos derivados bastante diversificados, como: edamame (grãos verdes consumidos como hortaliça), broto, leite (extrato hidrossolúvel), shoyu (molho), natto (grãos moles fermentados cobertos por polímero viscoso, pegajoso e com aroma distinto) ou tofu (MARTINS, 2001).

Devido às suas características relacionadas à nutrição e sua disseminação como alimento promotor de saúde, o consumo de soja e seus derivados cresceu bastante nos últimos anos (DUFFY et al., 2007). Mesmo diante das vantagens, um dos fatores que levam ao baixo consumo de soja e seus derivados é a presença de sabores indesejáveis ”off-flavor”, ou sabor de feijão cru “beany flavor”. Esse sabor indesejado é causado, pela presença de enzimas lipoxigenases, que produzem compostos voláteis formados a partir da catalisação da adição de oxigênio molecular

aos ácidos graxos de reserva da soja (SILVA et al., 2009). Essas enzimas catalisam a reação de hidroperoxidação do ácido linoleico e de lipídios poliinsaturados. Os compostos que têm sido relacionados com o desenvolvimento de sabores indesejáveis em produtos de soja formam-se a partir da degradação subsequente dos hidroperóxidos (BARROS et al., 1984).

## 2. JUSTIFICATIVA

Devido às ótimas características nutricionais e sua facilidade de produção no Brasil o consumo de soja do tipo alimento tende a aumentar. Por outro lado, existe um déficit mundial crescente, principalmente nos países asiáticos que tem o consumo da leguminosa muito presente nos hábitos alimentares. Assim, o desenvolvimento de cultivares do tipo alimento, com ausência de lipoxigenases e período juvenil longo deve ser incentivado principalmente em ambiente de baixas latitudes como o Cerrado.

Com a necessidade de definir a presença dessas enzimas em sementes já germinadas ou previamente embebidas, com o intuito de se avaliarem somente sementes viáveis e com ausência de lipoxigenases, utiliza-se o método de imunofluorescência indireta, que é muito mais complexo e trabalhoso (VERNOOY-GERRITSEN et al., 1983). O Teste bioquímico colorimétrico para a aferição da presença de enzimas lipoxigenases em sementes de soja é simples e rápido, porém tem sido descrito para uso em sementes secas, havendo provável diluição dessas substâncias no decorrer do processo de embebição na germinação das sementes dificultando as análises visuais de coloração (SUDA et al., 1995; KIKUCHI; CARRÃO-PANIZZI, 2001).

A utilização de método não destrutivo, muitas vezes necessário devido à pouca disponibilidade de sementes de alguns genótipos, de detecção associada ao uso de colorímetro, pode permitir identificar diferenças na coloração das amostras nem sempre visíveis, devido à essa possível diluição ocasionada pela embebição das sementes, tornando assim o método bioquímico colorimétrico viável para sementes em fase de germinação.

# 3. OBJETIVOS

## 3.1. Objetivo Geral

Caracterização biométrica e avaliação do método colorimétrico para diferentes tempos de embebição de sementes de genótipos de soja (*Glycine Max* (L.) Merrill) do tipo alimento.

## 3.2. Objetivos Específicos

i) Avaliação da presença de enzimas lipoxigenases a partir do método colorimétrico em sementes de soja.

ii) Definição de metodologia não destrutiva para a avaliação da presença de lipoxigenases em sementes de soja submetidas a diferentes tempos de embebição com a utilização do aparelho colorímetro para possíveis diferenciações que não sejam possíveis por avaliação visual, por possível solubilização das enzimas lipoxigenases.

# 4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 4.1. A soja no Mundo

A produção mundial de soja na safra de 2016/2017 foi de 351,311 milhões de toneladas, em uma área plantada de aproximadamente 120,958 milhões de hectares (USDA, 2017). Em decorrência, a soja é a cultura oleaginosa mais importante no mundo (EMBRAPA, 2010).

Segundo o Sétimo levantamento da Safra brasileira de grãos de 2016/2017, a projeção era de crescimento de 15,4% na produção do grão, atingindo 110,16 milhões de toneladas (CONAB, 2017). Esses valores foram superados, no Brasil, a produção de soja na safra de 2016/2017 foi de 113,923 milhões de toneladas, ocupando o segundo lugar no ranking de maiores produtores, atrás apenas dos EUA, distribuídas em 33,890 milhões de hectares plantados e com uma produtividade de 3.362 kg/ha (CONAB, 2017). O Brasil também se mostra como o maior exportador de soja do mundo, com aproximadamente 61,90 milhões de toneladas exportadas. Nas últimas décadas a soja foi a cultura agrícola que mais cresceu no Brasil, alcançando 49% da área plantada com grãos (BOCATTI et al., 2013) sendo a região Centro-Oeste a região do país onde se concentra a maior parte da produção.

## 4.2. Soja do tipo alimento (alimentação humana)

No mercado interno, a falta de tradição do uso da soja como alimento e o sabor exótico ao paladar brasileiro, são os principais problemas encontrados para a popularização do consumo de soja na culinária do Brasil (CARRÃO-PANIZZI; SILVA, 2011).

De acordo com a sua utilização, a soja é classificada em dois grupos principais: tipo grão (feed) e tipo alimento (food). Na soja do tipo grão, o produto é direcionado, para indústrias de extração de óleo vegetal e outros subprodutos e indústrias de ração. No tipo alimento, pode-se dividir em dois grupos de acordo com o tamanho das sementes: i) sementes menores, com peso de 100 sementes de até 10g, destinadas

à produção de brotos e de “natto”; ii) sementes grandes, com peso de 100 sementes maior do que 20g, destinadas à produção de tofu, extrato hidrossolúvel e como hortaliça para consumo direto. Quando na forma de vagens imaturas denomina-se edamame, na fase R6. Quando madura, soja doce ou kuromame, com tegumento preto e na preparação de saladas com sementes de tegumento amarelado, verde ou variegada (FEHR & CAVINESS, 1977; YOKOMIZO & DUARTE, 2000; CHEN & BUSS, 2004; SANTOS, 2016).

O tamanho dos grãos de soja tipo alimento é uma característica importante, pois, de acordo com o tipo de alimento a ser produzido, pode ser recomendado um tamanho específico de grão. Ademais, deve ser considerado o tempo de cozimento do grão que, sendo menor, agrega característica positiva tanto do ponto de vista energético quanto prático (MENEGUCE et al., 2005).

Outras características, que são utilizados no tipo grão, como: cor do tegumento e do hilo, odor e sabor, são também empregadas no tipo alimento (VELLO, 1992). Para cultivares de soja destinados à alimentação humana devem ser recomendadas o desenvolvimento de características químicas e físicas além dos fatores sensoriais, que são de extrema importância para a aceitação dos produtos no mercado (SILVA et al., 2009).

### 4.3. Qualidade Nutricional da soja

Além de compostos como isoflavonas, riboflavina e niacina, a soja possui componentes nutricionais como proteínas, aminoácidos e lipídios (PHOMMALTH et al., 2008; KYLEN & MCCREADY 1975; MOSTAFA & RAHMA 1987). Tem propriedades antioxidantes elevadas e a presença de grandes quantidades de microelementos tais como sódio, zinco, cobre, potássio, fósforo, ferro, manganês e magnésio (PLAZA et Al. 2003; YOUN et al. 2011; PRAKASH et al., 2007). As frações de proteína e óleo da soja compreendem aproximadamente 60% do total do peso seco da semente (COSTA et al., 1973/74).

A soja apresenta alto valor nutritivo e compostos benéficos à saúde, grãos maduros de soja contêm aproximadamente 40% de proteína, 23% de óleo, 10% de açúcares totais, 6% de fibra e cerca de 6% de cinzas e 31% de carboidratos, em base seca (COSTA et al., 1973/74), além de vitaminas A, E, B1, B2 e K. Também possui a maioria dos aminoácidos necessários em quantidades aceitáveis e é uma boa substituta ao consumo de proteína animal, para pessoas que não consomem carnes e derivados (CANTO & TURATTI, 1989; BELLAVER et al., 2002).

## 4.4. Processos de rancificação em soja

Os alimentos podem sofrer transformações químicas durante seu armazenamento. Quanto aos lipídios, as transformações mais importantes são a rancidez hidrolítica e a rancidez oxidativa. A deterioração dos lipídios, seja a partir da rancidez hidrolítica ou oxidativa, é um grande problema na indústria de alimentos (BOBBIO, 2001; OSAWA, 2006).

A hidrólise de óleos e gorduras com a produção de ácidos graxos livres por motivo da ação de enzimas lipases, presentes caracteriza a rancidez hidrolítica em sementes oleaginosas (HUI, 1996).

Os processos oxidativos podem ocorrer por três mecanismos, que são: a autoxidação, a oxidação enzimática e a fotoxidação. Por meio das lipoxigenases ocorre oxidação por via enzimática, essas enzimas são dioxigenases que catalisam a adição de oxigênio molecular aos ácidos graxos poliinsaturados, formando hidroperóxidos (SILVA et al*.,* 2001*).*

## 4.5. Lipoxigenases

As enzimas lipoxigenases estão entre os componentes mais indesejáveis na soja do tipo alimento e limitam, de forma bastante expressiva, sua mais ampla

utilização para a alimentação humana. Os sabores desagradáveis ”off-flavor” na soja popularmente conhecido como feijão cru “beany flavor” são causados principalmente por essas enzimas. Ao catalisar a oxigenação estereoespecífica e a hidroperoxidação de lipídios, que contém a dupla ligação do tipo cis,cis-1,4-pentadieno em suas estruturas, liberam compostos voláteis de cadeias curtas como aldeídos e cetonas (SILVA et al., 2009; RACKIS,HONIG & SESSA, 1979).

As lipoxigenases podem catalisar a cooxidação de carotenoides, incluindo β-caroteno, resultando na perda de nutrientes essenciais. Tem também a capacidade de formar radicais livres que podem atacar outros constituintes, como: vitaminas, cor, compostos fenólicos e proteínas (ROBINSON et al., 1995).

Nas sementes de soja, as lipoxigenases estão presentes na forma de 3 isoenzimas: Lox1, Lox2 e Lox3. A Lox1 é ligada à Lox2, a Lox3 é independente. Os alelos que determinam a ausência dessas isoenzimas possuem herança mendeliana simples e são recessivos (KITAMURA et al., 1983).

Além de prejuízos relacionados ao sabor, a presença de lipoxigenases também pode influenciar aspectos fisiológicos da semente. Segundo Lima (2007), genótipos de soja que não possuem lipoxigenases em sua constituição apresentam melhor qualidade fisiológica de sementes.

Por prejudicar as proteínas presentes no grão, o tratamento térmico utilizado para desativar as isoenzimas lipoxigenases não é o ideal. A forma mais eficiente para a inativação das lipoxigenases, com o intuito de diminuir o sabor desagradável “beany flavor”, é a inativação genética. A utilização de cultivares de soja livres de lipoxigenases tem se mostrado como o método mais viável, mantendo as propriedades nutricionais melhorando o sabor e, em consequência, a aceitabilidade (MONTEIRO et al., 2004).

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1. Genótipos Utilizados

Para o desenvolvimento do experimento foram selecionados oito genótipos de soja com aptidão para a alimentação humana (Tabela 1).

**Tabela 1**. Genótipos selecionados e características morfológicas - cor do tegumento e (CT) - origem

| GENÓTIPO | CT | ORIGEM |
|---|---|---|
| SP[5] | Amarelo | - |
| Preta (UnB 1125)[1] | Preto | UnB |
| Verde (Edamame)[2] | Verde | - |
| BRS 213[4] | Amarelo | Embrapa |
| BRSMG 800A[3] | Marrom | Embrapa |
| BRSMG 790A[3] | Amarelo | Embrapa |
| BRS 257[4] | Amarelo | Embrapa |
| UFVTN105[4] | Amarelo | UFV |

[1] Genótipo com tegumento preto e período juvenil longo (PJL), selecionado na UnB; [2] Genótipo com tegumento verde destinada ao consumo na vagem na fase R6/R7; [3] Soja destinada a alimentação humana, indicadas ao cultivo em MG, SP, GO e DF; [3] Soja para alimentação humana, com alelos recessivos para as três enzimas lipoxigenases (TN); Soja destinada à alimentação humana, indicada ao cultivo em SP.

### 5.2. Caracterização e biometria

Esta etapa foi realizada no Laboratório de Sementes da Universidade de Brasília – UnB, em Brasília – DF, no período de 15 a 30 de maio de 2017.

#### 5.2.1. Peso de 100 sementes

Utilizou-se amostras de 10 sementes com 10 repetições que foram pesadas em balança de precisão. Para o cálculo do peso de 100 sementes extrapolou-se o peso da média das repetições, multiplicando-se por 10.

### 5.2.2. Comprimento e largura

Com o auxílio de um paquímetro digital com precisão de 0,01mm, foram medidos a largura e o comprimento das sementes.

### 5.2.3. Coloração do tegumento e do hilo

Para a definição da coloração do tegumento e do hilo das sementes, foram feitas analises visuais das sementes dos genótipos.

## 5.3. Teste bioquímico colorimétrico

Essa etapa foi realizada no Laboratório de Análise de Alimentos da Universidade de Brasília (UnB), durante os meses de abril e maio de 2017. O teste bioquímico colorimétrico foi utilizado para determinar a atividade das enzimas lipoxigenases conforme Suda et al. (1995) e Kikuchi; Carrão-Panizzi (2001). O teste consiste na descoloração das isoenzimas Lox-1, Lox-2 e Lox-3 sob a cooxidação com azul de metileno das Lox 1 e 2 e do β-caroteno da Lox-3. A partir de produtos formados pela reação enzima-substrato com a formação de radicais peroxil que interagem com os indicadores azul de metileno e β-caroteno ocorre o descoramento (SANTOS, 2016).

### 5.3.1. Preparo das Amostras

Para o preparo das amostras, triturou-se até ao ponto de farinha, um grão de soja, de cada genótipo com auxílio de almofariz e pistilo. Aproximadamente 2,5 mg desta farinha foi colocada em um tubo de ensaio e devidamente identificado.

### 5.3.2. Preparo do Substrato – Linoleato de Sódio

Para a preparação do Linoleato de sódio, foram pesados 70 mg de ácido linoleico e 70 mg de Tween 20 que foram homogeneizados com 4 mL de água destilada livre de oxigênio (desgaseificada) (banho de ultrassom sob vácuo por 20 min) com auxílio de espátula de plástico. Aos poucos foram adicionados NaOH 0,1N

até a solução ficar incolor. Essa solução foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL e o volume foi completado com água destilada livre de oxigênio (desgaseificada). A solução final foi dividida em alíquotas de 5 mL e mantidas sob refrigeração a 4 ºC, sendo recoberto por papel alumínio até o momento de uso.

### 5.3.3. Preparo da Solução de Betacaroteno

Dissolveu-se o β-caroteno em 5 mL de acetona até saturação, depois de homogeneizada, a solução foi centrifugada à 2.000 rpm por quatro minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi diluído em igual volume de acetona e acondicionado em um frasco âmbar recoberto com papel alumínio e armazenado a 4 ºC até o momento de sua utilização. Esta solução foi preparada diariamente.

### 5.3.4. Preparo do Extrato do genótipo Kanto 102

As sementes do genótipo “Kanto 102”, que apresentam presença de lipoxigenase Lox2, foram maceradas ao ponto de farinha. A cada mg da farinha de “Kanto 102”, foram misturados um ml de água destilada. Fez-se a homogeneização da solução e a mesma foi mantida em repouso por cinco minutos (SANTOS, 2016).

### 5.3.5. Preparo da Solução de Azul de Metileno 0,1nM

Para a preparação da solução de Azul de Metileno 0,1nM, solubilizou-se 8,26 mg de azul de metileno em 100 mL água destilada deionizada. Armazenou-se em um frasco âmbar recoberto com papel alumínio (SANTOS, 2016).

### 5.3.6. Solução tampão fosfato 0,2M

O Fosfato de Sódio, buffer (tamponado) pH 6,8 a 0,2M foi adquirido previamente preparados pelo fabricante (Dinâmica).

### 5.3.7. Preparo da solução tampão borato 0,2M pH 9,5

Soluções estoque: (A) – Solução de ácido bórico 0,2 M: Solubilizaram-se 12,4g

em 1 litro de água; (B) – Solução de bórax 0,05 M: Solubilizaram-se 19,05g em 1 litro de água.

Para o preparo da solução tampão de borato de sódio, misturaram-se 50 ml da solução (A) com 59 ml da solução (B), completando-se o volume para 200 ml.

### 5.3.8. Preparo das Soluções de Lox1 e Lox3

Lox3: Foram adicionados 12,5 mL de tampão fosfato de sódio 0,2M em um frasco de âmbar recoberto com papel alumínio; 5,0 mL do substrato linoleato de sódio 10 mM; 17,5 mL de água destilada ultrassonificada a vácuo e 5,0 mL da solução saturada de β-caroteno.

Lox1: Em um frasco de âmbar recoberto com papel alumínio foram adicionados 25,0 mL de tampão borato de sódio 0,2M; 5,0 mL do substrato linoleato de sódio 10 mM; 5,0 mL de água destilada ultrassonificada e 5,0 de azul de metileno 100 mM.

### 5.3.9. Teste para Lipoxigenases 1 e 3

Dividiram-se as amostras de cada um dos genótipos em tubos de ensaio, com a utilização de uma micropipeta foram adicionados respectivamente 20 µL da solução de “Kanto 102”, 250 µL da solução Lox3 e 250 µL da solução Lox1. Espera-se 5 minutos para a realização das leituras.

A determinação da presença ou ausência de lipoxigenases foi determinada a partir da coloração da mistura final. Na presença das três lipoxigenases, ausência da isoenzima Lox3, ausência das isoenzimas Lox1 e Lox2 e ausência das três isoenzimas (Lox1, Lox2 e Lox3), a mistura apresentou respectivamente coloração incolor, amarela, azul e verde (Tabela 2).

**Tabela 2**. Leituras de presença ou ausência de lipoxigenases

| RESULTADO | COLORAÇÃO |
|---|---|
| Ausência de Lox1, Lox2 e Lox3 | Verde |
| Ausência de Lox3 | Amarelo |
| Ausência de Lox1 e Lox2 | Azul |
| Presença de Lox1, Lox2 e Lox3 | Incolor |

Uma vez que as isoenzimas Lox1 e Lox3 se encontram ligadas, não foi necessário analisar a isoenzima Lox2 para detecção de lipoxigenases (SANTOS, 2016).

### 5.4. Testes para presença de lipoxigenases em sementes submetidas a diferentes tempos de embebição

Foram escolhidos dois genótipos de soja do tipo alimento para essa etapa do experimento, o genótipo BRSMG 790A que tem sabor suave, porem apresenta lipoxigenases e o BRS 257 Triplo-nulo para lipoxigenases (Tabela 3), todas desenvolvidas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA.

**Tabela 3.** Genótipos de soja selecionados para o teste bioquímico colorimétrico com diferentes tempos de embebição

| Genótipo | Lipoxigenases |
|---|---|
| BRS 257 | Triplo-Nulo |
| BRS MG 790ª | Lox1, Lox2 e Lox3 |

As sementes foram embebidas em intervalos de quatro horas em papel toalha especial para germinação (GERMITEST), umedecidos previamente com água destilada na proporção de 2,5 vezes o peso do substrato seco e mantidas a 25°± 3°C. Os tratamentos foram: sementes secas e em sementes embebidas com 4, 8, 12, 16,

20 e 24 horas. Após o tempo definido as sementes foram retiradas do papel de germinação separadas, cortadas no sentido oposto ao embrião, maceradas e devidamente identificados.

Para a utilização do colorímetro foi necessário o aumento da quantidade usada de reagentes e substratos, para que o volume da solução fosse suficiente à aferição do aparelho. As quantidades foram aumentadas em três vezes, dessa forma utilizaram-se 7,5 mg de sementes trituradas, 60 µL da solução de Kanto 102, 750 µL da solução Lox3 e 750 µL da solução Lox1.

Foram efetuadas três repetições de cada tratamento, esperando-se aproximadamente cinco minutos para a reação. As soluções finais foram colocadas em cubetas e submetidas a avaliações de cor no colorímetro e cada repetição foi aferida duas vezes.

A cor das amostras foi expressa com a utilização do colorimetro ColorQuest XE da marca Hunterlab, com leitura direta da reflectância das coordenadas a partir do sistema CIE L*a*b* e a partir desses valores foi calculado também para o sistema CIE L*c*h°.

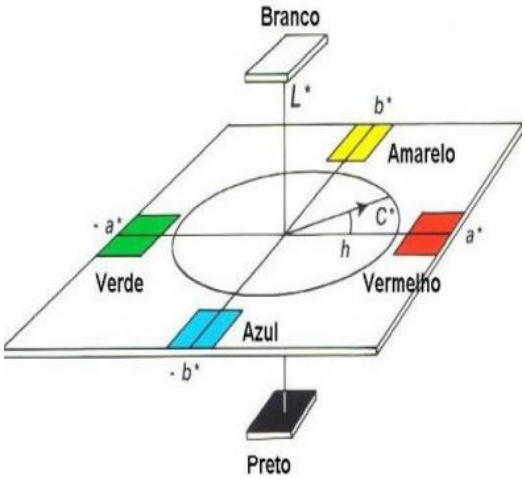


**Figura 1.** Significado geométrico das coordenadas (L*), (a*), (b*), (h°) e (c*) (HUNTERLAB, 1998).

A coordenada L* expressa valores que variam com a luminosidade, 0 (branco) a 100 (preto), as coordenadas a* e b* expressam valores de -100 a 100 (coordenadas de cromaticidade) indicam a direção das cores, em que +a* indica cor vermelha, -a* verde, +b* amarela e –b* azul (ROMÃO, et al.,2006). O croma (c*), fornece a saturação da cor ou a sua intensidade, e a coordenada h°, corresponde à tonalidade (MCGUIRE, 1992). Os valores de a* e b* foram convertidos em ângulo Hue e Croma (Figura 1).

$$h° = tan^{-1}(\frac{b^*}{a^*})$$

$$c^* = \sqrt{(a^*)^2(b^*)^2}$$

**Figura 2.** Equações de Hue° (h°) e croma (c*).

### 5.5. Análise estatística

O delineamento experimental adotado para a biometria das sementes de soja com o intuito de analisar características morfológicas e na análise dos valores de cor do colorímetro, foi o inteiramente casualizado (DIC), sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade. Os dados foram analisados pelo software “ASSISTAT”, versão 7.7 beta (SILVA, 2014).

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo os dados biométricos dos genótipos de soja do tipo alimento (Tabela 4) os genótipos Verde e BRSMG 800A, apresentaram peso e tamanho de sementes semelhantes, sementes grandes com peso de 100 sementes superior à 20 g. O genótipo BRSMG 790A também apresenta sementes grandes e com peso de cem sementes ligeiramente inferior a 20 g. Os genótipos BR257, UFVTN105 e Preta se enquadram em sementes de tamanho pequeno com peso de 100 sementes inferior a 10 g, isso pode ter ocorrido devido à forma de propagação em vasos dentro de estufas (controlada). Os genótipos BRS 213 e SP apresentaram tamanho de sementes mediano e peso de 100 sementes entre 10 e 20 g.

**Tabela 4.** Biometria de sementes de soja do tipo alimento - cumprimento (C), largura (L) e Peso de 100 sementes (P100)

| GENÓTIPO | C | L | P100 |
|---|---|---|---|
| | ----mm---- | ----mm---- | |
| BRS 213 | 6.980 b | 5.505 c | 10,700d |
| BRS 257 | 6.096 d | 4.938 e | 8,820e |
| BRSMG 790A | 8.218 a | 7.179 a | 19,880b |
| BRSMG800A | 8.169 a | 7.340 a | 23,330a |
| Preta (UnB 1125) | 6.167 d | 5.411 c | 9,360de |
| SP | 7.126 b | 6.280 b | 14,260c |
| Verde | 8.343 a | 7.212 a | 21,740d |
| UFVTN 105 | 6.433 c | 5.208 d | 9,790de |
| DMS (Tukey 5%) | 0,24689 | 0.19497 | 0,18015 |
| CV (%) | 8,00 | 8,00 | 8,76 |

[1]Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os genótipos SP, Preta, BRS 213, BRS 800A e BRSMG 790A apresentaram o hilo de coloração igual à coloração do tegumento. Enquanto BRS 257 de UFVTN 105

apresentaram diferença de coloração entre o hilo e o tegumento. Porém, devido ao tamanho das sementes, o processamento para a alimentação não é o mais indicado, reduzindo a importância da diferença de coloração. O genótipo Verde também, com diferença entre o hilo e o tegumento, tem tamanho apropriado para o processamento, mas seu consumo basicamente é na forma de vagem, logo, esse fator também não diminui a qualidade do material. O genótipo Preta e BRS 800A, por terem a coloração que pode ser confundida com a do feijão preto ou carioca, podem ser mais adaptadas aos hábitos alimentares dos brasileiros (Tabela 5).

**Tabela 5**. Características qualitativas das sementes de soja cor do tegumento (CT), cor do hilo (CH) e presença ou ausência de lipoxigenases.

| GENÓTIPO | CT | CH | LIPOXIGENASE |
|---|---|---|---|
| | ---cor--- | ----cor---- | |
| BRS 213 | Amarelo | Amarelo | TN |
| BRS 257 | Amarelo | Marrom | TN |
| BRSMG 790ª | Amarelo | Amarelo | P |
| BRSMG 800ª | Marrom | Marrom | P |
| Preta (UnB 1125) | Preto | Preto | P |
| SP | Amarelo | Amarelo | P |
| Verde | Verde | Preto | P |
| UFVTN 105 | Amarelo | Marrom | TN |

TN: Triplo-nulo para as três enzimas lipoxigenases; P: presença das três enzimas lipoxigenases (Lox1, Lox2 e Lox3).

Quanto à presença de lipoxigenases (Tabela 5), somente os genótipos BRS 213, BRS 257 e UFVTN 105 apresentaram ausência das três enzimas lipoxigenases. Os demais apresentaram todas as três enzimas lipoxigenases a partir do teste bioquímico colorimétrico.

Em todos os tempos de embebição foi possível detectar visualmente a presença ou ausência das enzimas lipoxigenases a partir do método bioquímico colorimétrico a partir da coloração das soluções. Sendo o genótipo BRS257 triplo-nulo para as três isoenzimas lipoxigenases e o BRSMG 790A com presença das três isoenzimas lipoxigenases. As sementes com 24 horas de embebição já haviam começado o processo de germinação, com o rompimento do tegumento e a protusão da radícula.

**Tabela 6.** Comparação colorimétrica dos tratamentos com presença e ausência de lipoxigenases submetidos a diferentes tempos de embebição (TE), luminosidade (L), tonalidade (°Hue) e intensidade da cor (CROMA)

| TE (h) | BRSMG 790A | | | BRS 257 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | **L** | **°HUE** | **CROMA** | **L** | **°HUE** | **CROMA** |
| 0 | 42,97bc | 84,97bc | 8,56c | 38,39cd | 120,79b | 12,36d |
| 4 | 44,45ab | 86,63ab | 11,59b | 41,67a | 120,98b | 19,75a |
| 8 | 46,64a | 87,17ab | 12,90ab | 41,83a | 122,06b | 19,41ab |
| 12 | 43,66bc | 86,27ab | 12,69ab | 40,91ab | 129,00b | 16,05bc |
| 16 | 41,42c | 83,00c | 8,69c | 38,09cd | 146,09a | 13,24cd |
| 20 | 46,43a | 88,12a | 14,73a | 37,34d | 131,77b | 12,23d |
| 24 | 41,78c | 83,82c | 7,62c | 39,59c | 131,26b | 13,55cd |
| DMS (Tukey 5%) | 2,3 | 2,37 | 2,50 | 1,63 | 11,23 | 3,52 |
| CV (%) | 2,91 | 1,54 | 12,65 | 2,29 | 4,83 | 12,81 |

[1]Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os valores obtidos a partir do uso do colorímetro, da coloração das soluções finais, dos diferentes tempos de embebição, apresentaram diferença estatística (Tabela 6), porem o teste bioquímico colorimétrico funcionou para todos os tempos de embebição, ou seja, conseguiu-se detectar lipoxigenases pelo teste a visualmente sem a utilização do colorímetro.

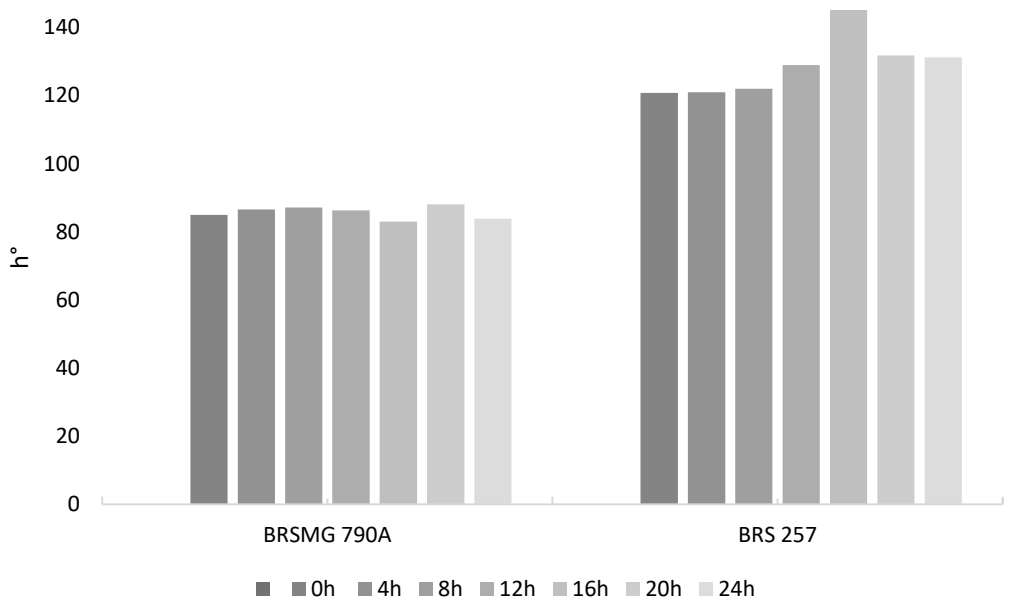


**Figura 3.** Gráfico de comparação dos tratamentos de acordo com a coloração apresentada (Hue°), BRSMG 790A (Presença das três Lox) e BRS257 (Triplo nulo para lipoxigenases)

Foi demonstrado que os tratamentos com e sem lipoxigenases tiveram diferença de coloração (Hue°), nos diversos tempos de embebição (Figura 3), desta forma o genótipo BRSMG 790A apresentou valor de h° próximo de 90 (amarelo), enquanto que os tratamentos BRS257 apresentaram valor de h° entre 120 e 140 (coloração entre o amarelo e o verde).

## 7. CONCLUSÕES

Os genótipos BRS 213, BRS 257 e UFVTN 105 apresentam ausência das três enzimas lipoxigenases, enquanto BRSMG 790A, BRSMG 800A, Preta, SP e Verde apresentam reação positiva para a presença de Lox1, Lox2 e Lox3.

O aumento de três vezes na relação de quantidades de reagentes, para o aumento da quantidade de solução final, não altera resultados do teste para presença ou ausência de lipoxigenases a partir do método bioquímico colorimétrico.

O teste bioquímico colorimétrico é eficiente para detectar a presença de enzimas lipoxigenases em sementes de soja com 24 horas de embebição, não foram testadas sementes embebidas com tempo superior à 24 horas.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS


BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. & FONTES, E.P.B. Atividade de lipoxigenases L1 e L3 em cultivares comerciais de soja. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v.27, n.3, p.381-386, 1984.

BELLAVER, C.; COTREFAL, G.; GRECCO, M. Soja integral: processamento e uso. **Alimento Animal**, v.7, p. 28-30, 2002.

BOCATTI, C. R. et al. Evolução dos defeitos da soja comercial durante o armazenamento em função da infestação de percevejos na lavoura. In: **Embrapa Soja-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: JORNADA ACADÊMICA DA EMBRAPA SOJA, 8., 2013, Londrina. Resumos expandidos. Londrina: Embrapa Soja, 2013. p. 60-64.

BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O.; **Química do Processamento de Alimentos**, 3ª ed., Varela: São Paulo, 2001, cap. 3.

CANTO, W.L.; TURATTI, J.M. Produção e mercado de produtos intermediários protéicos de soja no Brasil. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v.7, n.2, p.111-139, 1989

CARRÃO-PANIZZI, M. C.; SILVA, J. B. **Soja na alimentação humana: qualidade na produção de grãos com valor agregado**. In: Congreso De La Soja Del Mercosur, 5., 2011. Resumos. Rosário: Asociaciones de la Cadena de la Soja Argentina, p. 1-3, 2011.

CHEN, P.; BUSS, G. R. Breeding soybean for the soyfoods market: specific traits and strategies for selection. In: PROCEEDINS. III World Soybean Research Conference, IV 44 International Soybean Processing and utilization and III Congresso Mundial de Soja. Foz do Iguaçu, Embrapa Soja, p. 830 - 835, 2004.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira**. grãos, v. 12 Safra 2015/16 - Décimo Segundo levantamento, Brasília, p. 1-182, setembro de 2016.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira**. grãos, v. 4 Safra 2016/17 - Sétimo levantamento, Brasília, p. 1-160 abril de 2017.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira**. grãos, v. 4 Safra 2016/17 - Nono levantamento, Brasília, p. 1-161, junho de 2017.

COSTA, S.I.; MIYA, E.E.; FUJITA, J.T. Composição química e qualidades organolépticas e nutricionais das principais variedades de soja cultivadas no Estado de São Paulo. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.5, p.305- 319, 1973/74.

DUFFY, C.; PEREZ, K.; PARTRIDGE, A. Implications of phytoestrogen intake for

breast cancer. **CA Cancer J Clin**., v. 57, p. 260-277, 2007.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Desenvolvimento, Mercado e Rentabilidade da Soja Brasileira**. Londrina: Embrapa Soja, 2010. 20p. (Circulação Técnica, 74).

EMBRAPA. Evolução e perspectivas de desempenho econômico associadas com a produção de soja nos contextos mundial e brasileiro. **Documentos 319**. 2011. Disponível. Acesso: 28 de maio de 2017.

FEHR, W.R.; CAVINESS, C.E. **Stages of soybean development**. Ames: Iowa State University of Science and Technology, 1977. 12p. (Special Report, 80).

HUI, Y. H. **Bailey's Industrial Oil and Fat Products. V. 4 Edible Oil and Fat ProductsProcessing Technology**. John Wiley and Sons, 1996.

HUNTERLAB. **User´s manual with universal software versions 3.5**. Reston: HunterLab, 1998. Paginação irregular.

KIKUCHI, A; CARRÃO-PANIZZI, M. C. Simple and rapid method for the detection of lipoxigenase isozymes in soybean seeds. **JIRCAS Anual Report 2001**, n. 8, p. 47-48, 2001.

KITAMURA, K.; DAVIES, C.S.; KAIZUMA, N.; NIELSEN, N.C. Genetic analysis of a null-allele for lipoxygenase-3 in soybean seeds. **Crop Science**, Madison, v.23, p.924-927, 1983.

KYLEN, A. M.; MCCREADY, R. M. Nutrients in seeds and sprouts of alfalfa, lentils, mung beans and soybeans. **Journal of Food Science**, v. 40, n. 5, p. 1008-1009, 1975.

LIMA, W. A. A. et al. Retardamento de colheita como método de diferenciação de genótipos de soja para qualidade de sementes. **Revista Brasileira de Sementes**, 2007.

MARTINS, C. A. O. **Avaliação de caracteres agronômicos de linhagens com ou sem lipoxigenases nas sementes**. 2001. 188 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa

MCGUIRE, R. G. Reporting of objective color measurements. **HortScience**, v. 27, n. 12, p. 1254-1255, 1992.

MENEGUCE, B. et al. Interação genótipo x ano para tempo de cozimento e sua correlação com a massa e percentagem de embebição em soja tipo alimento. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 26, n. 4, p. 463-476, 2005.

MIRANDA, Z. F. S**. Base genética de cultivares de soja no Brasil**. Londrina:

Universidade Estadual de Londrina, 2005. 80 p. Tese Doutorado.

MONTEIRO, M. R. P. et al. Qualidade protéica de linhagens de soja com ausência do Inibidor de Tripsina Kunitz e das isoenzimas Lipoxigenases. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 2, p. 195-205, 2004

MOSTAFA, M. M.; RAHMA, E. H.; RADY, A. H. Chemical and nutritional changes in soybean during germination. **Food Chemistry**, v. 23, n. 4, p. 257-275, 1987.

OSAWA, C. C. et al. Titulação potenciométrica aplicada na determinação de ácidos graxos livres de óleos e gorduras comestíveis. **Química Nova**, 2006.

PHOMMALTH, S. et al. Effects of light treatment on isoflavone content of germinated soybean seeds. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 56, n. 21, p. 10123-10128, 2008.

PLAZA, L.; DE ANCOS, B.; CANO, P. M. Nutritional and health-related compounds in sprouts and seeds of soybean (*Glycine max*), wheat (Triticum aestivum. L) and alfalfa (Medicago sativa) treated by a new drying method. **European Food Research and Technology**, v. 216, n. 2, p. 138-144, 2003.

PRAKASH, D. et al. Antioxidant and free radical-scavenging activities of seeds and agri-wastes of some varieties of soybean (*Glycine max*). **Food Chemistry**, v. 104, n. 2, p. 783-790, 2007.

RACKIS, J. J.; SESSA, D. J.; HONIG, D. H. Flavor problems of vegetable food proteins. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 56, n. 3, p. 262-271, 1979.

ROBINSON, D. S.; WU, Z.; DOMONEYB, C.; CASEY, R. Lipoxygenases and the quality of foods. **Food Chemistry**, v. 54, p. 33-43, 1995.

ROMÃO, R.B.M.; YAMASHITA, F.; BENASSI, M.T. Nota Prévia – Metodologia para avaliação de cristalização de balas duras por imagem digitalizada. **Brazilian Journal Food Technology**. 9 (2); 151-155, abr/jun 2006.

SANTOS, E. R. Parâmetros genéticos e obtenção de genótipos de soja com ausência de lipoxigenase e características agronômicas em baixas latitudes. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2016, 160 p. Tese de Doutorado.

SILVA, M. D. et al. Caracterização da via das lipoxigenases em plantas de soja resistentes e susceptíveis a diaphorte phaseolorum f. Sp. Meridionalis, agente causal do cancro-da-haste. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, n. 3, p. 316-328, 2001.

SILVA, F.A.S. **ASSISTAT versão 7.7 beta**. Campina Grande: DEAG/CTRN/UFCG, 2014. (Homepage http://www.assistat.com).

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

SUDA, I.; HAJIKA, M.; NISHIBA, Y.; FURUTA, E.; IGITA, K. Simple and rapid method for the selective detection of individual lipoxygenase isozymes in soybean seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 742-747, 1995.

USDA - UNITED STATE DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Economic research service**. 2017. Disponível em: http://www.ers.usda.gov. Acesso em: 28 Jun 2016.

VELLO, N.A. Ampliação da base genética do germoplasma e melhoramento da soja na ESALQUSP. In: SIMPÓSIO SOBRE CULTURA E PRODUTIVIDADE DA SOJA, 1., 1991, Piracicaba. **Anais**. Piracicaba : FEALQ, 1992. p.60-81

VERNOOY-GERRITSEN, M. et al. Localization of lipoxygenases 1 and 2 in germinating soybean seeds by an indirect immunofluorescence technique. **Plant physiology**, v. 73, n. 2, p. 262-267, 1983.

YOKOMIZO, G. K.; DUARTE, J. B.; VELLO, N. A. Correlações fenotípicas entre tamanho de grãos e outros caracteres em topocruzamentos de soja tipo alimento com tipo grão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 11, p. 2235-2241, 2000.

YOUN, Jung-Eun et al. Contents of minerals and vitamines in soybean sprouts. **Korean Journal of Crop Science**, v. 56, n. 3, p. 226-232, 2011.