UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

ESTUDO DE LIPOXIGENASES EM EXTRATO HIDROSSOLÚVEL DE SOJA (*Glycine max* (L.) MERR.) SUBMETIDO A DIFERENTES TRATAMENTOS

ÉRICA AMANDA DE BARROS

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp – Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Agronomia (Energia na Agricultura).

BOTUCATU – SP
Agosto – 2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

ESTUDO DE LIPOXIGENASES EM EXTRATO HIDROSSOLÚVEL DE SOJA (*Glycine max* (L.) MERR.) SUBMETIDO A DIFERENTES TRATAMENTOS

ÉRICA AMANDA DE BARROS

Orientador: Prof. Dr. Fernando Broetto

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp – Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Agronomia (Energia na Agricultura).

BOTUCATU – SP
Agosto – 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO – SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

Barros, Érica Amanda de, 1987-
B277e Estudo de lipoxigenases em extrato hidrossolúvel de soja (*Glycine max* (L.) Merr.) submetidos a diferentes tratamentos / Érica Amanda de Barros. – Botucatu : [s.n.], 2012
xi, 75 f. : il., tabs.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 2012
Orientador: Fernando Broetto
Inclui bibliografia

1. Extrato hidrossolúvel de soja. 2. Leite de soja. 3. Lipoxigenase. 4. Soja. I. Broetto, Fernando. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agronômicas. III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS

CAMPUS DE BOTUCATU

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "ESTUDO DE LIPOXIGENASES EM EXTRATO HIDROSSOLÚVEL DE SOJA (Glycine max (L.) Merr.) SUBMETIDO A DIFERENTES TRATAMENTOS"

ALUNA: ÉRICA AMANDA DE BARROS

ORIENTADOR: PROF. DR. FERNANDO BROETTO

Aprovado pela Comissão Examinadora

Fernando Broetto

PROF. DR. FERNANDO BROETTO

PROF. DR. JOSÉ PEDRO SERRA VALENTE

PROF. DR. MARCELO ALVARES DE OLIVEIRA

Data da Realização: 29 de junho de 2012.

DEDICO

Ao meu marido Vladimir que contribuiu com o esclarecimento de várias etapas desse estudo, pelo carinho, por transmitir segurança e ter paciência comigo mesmo nos dias mais complicados.

A minha avó Rosa e aos meus pais, Ademir e Márcia, que me educaram e me ajudaram com amor e sabedoria para que eu conquistasse meus sonhos.

Toda a nossa ciência comparada com a realidade é primitiva e infantil e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos.

Albert Einstein (1879-1955)

AGRADECIMENTOS

A meu orientador Prof Dr. Fernando Broetto pelos ensinos, pela oportunidade de realizar esse estudo, amizade e conselhos.

Aos professores Dr. Pedro de Magalhães Padilha, José Pedro Serra Valente, Luis Artur Loyola Chardulo (Departamento de Química e Bioquímica-IBB), Magali Loenel (CERAT-FCA), Maria Regina Barbieri (FCAV-UNESP, Câmpus de Jaboticabal), Maria Márcia P. Sartori (Centro de Isótopos Estáveis-IBB) que colaboraram com a concretização desse experimento.

A Juliana Eburneo que me ensinou como realizar várias análises no CERAT e também pela sua amizade, da Thais Paes e Alessandra Luiza.

A amiga Verônica Ramos e prima Noéli Gonçalves que sempre se importaram em saber como caminhava minha pesquisa. Obrigada pelos conselhos, carinho e pelas conversas descontraídas. Adoro vocês.

A Dayanne F. Bressan e a Renata Coscolin pela amizade e por me ajudarem sempre quando eu precisava.

Ao Vladimir que além de marido é meu amigo, pelas palavras certas para cada momento, pela paciência, respeito e risadas. Agradeço por tê-lo ao meu lado. Obrigada por tudo e te amo!

A minha segunda mãe, Nilza, que me acompanhou diversas vezes ao laboratório para me ajudar na fase mais turbulenta. Através de palavras não consigo resumir o quão agradecida estou por todas suas atitudes, e conselhos. Você e minha avó foram maravilhosas e essenciais no decorrer do desenvolvimento desse estudo. *Nilza, Muito Obrigada*.

A minha mãe, Márcia, meu pai, Ademir, e minha avó, Rosa pelas oportunidades oferecidas, atenção, compreensão, aprendizagem, confiança, apoio e amor. *Amo vocês!*

Aos familiares que torceram por mim.

Desculpe se deixei de citar alguns nomes, pois foram muitas pessoas que me acompanharam nessa caminhada. Mas quero deixar claro que sou sinceramente grata a todos que contribuíram na realização desse sonho.

SUMÁRIO

Página

LISTA DE TABELAS.....VIII
LISTA DE FIGURAS.....X
LISTA DE ABREVIATURAS.....XI
1- RESUMO.....01
2- SUMMARY.....03
3- INTRODUÇÃO.....05
4- REVISÃO DE LITERATURA.....07
4.1- Soja: Origem e Histórico.....07
4.2- Botânica.....08
4.3- Agronomia.....09
4.4- Composição Química.....10
4.5- Fatores Nutricionais.....11
4.6- Fatores Antinutricionais.....13
4.7- Mercado.....14
4.8- Potencial de Aproveitamento.....15
4.9- Enzima lipoxigenase (LOX).....15
4.10- Extrato hidrossolúvel de soja (EHS).....17
4.11-Irradiação.....20
4.12- Temperatura.....21
4.13- Oxidação.....22
4.14- Valor energético.....23
5- MATERIAL E MÉTODOS.....25
5.1- Material.....25
5.2- Métodos.....25
5.2.1- Processamento.....25
5.2.2- Planejamento experimental.....25
5.2.2.1- Tratamentos- Físicos.....27
5.2.2.2- Tratamentos- Antioxidantes.....28
5.2.2.3- Tratamentos- Físicos + Antioxidante.....30

5.2.3- Análises químicas 31
5.2.4- Análise bioquímica 35
5.2.5- Análise estatística.....36
6- RESULTADOS E DISCUSSÃO 37
6.1- Análises químicas 37
6.1.1- Composição química centesimal dos grãos de soja irradiados 37
6.1.2- Minerais 39
6.1.3- Valor energético.....42
6.1.4- Composição química centesimal dos EHS (Fase 1) 45
6.1.5- Composição química centesimal dos EHS (Fase 2) 47
6.2- Análise bioquímica 49
6.2.1- Atividade específica de LOX em grão de soja.....50
6.2.2- Atividade específica de LOX em EHS (Fase 1) 52
6.2.3- Atividade específica de LOX em EHS (Fase 2) 57
7- CONCLUSÃO 62
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 63

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1. Composição química do EHS comparado com o leite de vaca e humano.....19

Tabela 2. Antioxidantes (Aditivo) permitidos para se adicionar em alimentos da categoria produtos protéicos, da subcategoria bebida não alcoólica a base de soja, ou seja, EHS 28

Tabela 3. Concentrações centesimais dos grãos de soja irradiados a 2,5 / 5,0 e 10 kGy e dos respectivos controle.....38

Tabela 4. Concentrações dos minerais presentes em cultivares de soja.....40

Tabela 5. Concentrações dos minerais presentes em EHS produzido com três cultivares de soja. 41

Tabela 6. Resultados médios da energia bruta do grão de soja, do okara, do EHS e EHS liofilizado. 42

Tabela 7. Comparação entre o valor energético obtido pelos valores estimados do cálculo centesimal (energia metabolizável), energia bruta e Tabela de composição química de alimentos e bebidas (energia metabolizável), dos EHS e grãos de soja 44

Tabela 8. Energia metabolizável dos EHS controle e submetidos a tratamentos físicos e dos grãos de soja controle e irradiados. 45

Tabela 9. Determinação do teor de proteína bruta do EHS submetido a tratamentos físicos e antioxidantes.....46

Tabela 10. Caracterização química centesimal dos EHS produzidos com os cultivares BRS-213, BRS-258 e EMB.48 e submetidos a tratamentos físicos (irradiação-5,0 kGy e térmico - 80 °C) com suplementação de tocoferol (toc).....48

Tabela 11. Atividade específica de LOX (ηmol mg de proteína min^{-1}) em três cultivares de soja (controle) e em grãos irradiados. 51

Tabela 12. Porcentagem de redução da atividade específica de LOX do grão de soja submetido a diferentes dosagens de irradiação.....51

Tabela 13. Porcentagem de redução da atividade específica de LOX do EHS produzido com três cultivares de soja e submetido a tratamentos físicos e antioxidantes. 52

Tabela 14. Atividade específica de LOX (ηmol mg de proteína min^{-1}) de EHS produzidos com três cultivares e submetido a tratamentos térmicos.....53

Tabela 15. Atividade específica de LOX (ηmol mg de proteína min^{-1}) de EHS a partir das médias obtidas pelos três cultivares, variando apenas as temperaturas. 53

Tabela 16. Atividade específica de LOX (ηmol mg de proteína min^{-1}) de EHS a partir das médias obtidas pelos três cultivares, variando apenas as dosagens de irradiação gama. 54

Tabela 17. Atividade específica de LOX (ηmol mg de proteína min^{-1})de EHS produzidos com três cultivares submetidos a dosagens distintas de irradiação gama.....54

Tabela 18. Atividade específica de LOX (ηmol mg de proteína min^{-1})de EHS produzidos com três cultivares e adição de diferentes quantidades de tocoferol (toc). 55

Tabela 19. Atividade específica de LOX (ηmol mg de proteína min^{-1}) de EHS produzidos com três cultivares e adição de diferentes quantidades de TBHQ.....55

Tabela 20. Atividade específica de LOX (ηmol mg de proteína min^{-1}) de EHS a partir das médias obtidas pelos três cultivares, variando o tipo (natural-toc. ou sintético-TBHQ) de antioxidante. 56

Tabela 21. Influência da quantidade de Tocoferol e TBHQ na redução da atividade de lipoxigenase de EHS produzido com três cultivares distintos.....57

Tabela 22. Porcentagem de redução da atividade específica de LOX do EHS submetido a tratamentos físicos (irradiação e térmico) suplementados com tocoferol (toc).....58

Tabela 23. Atividade específica de LOX (ηmol mg de proteína min^{-1}) de EHS produzido com três cultivares que foram submetidos a tratamentos: irradiação com tocoferol e térmico com tocoferol (toc).....58

Tabela 24. Comparação da atividade específica de LOX (ηmol mg de proteína min^{-1}) entre os EHS produzidos com três cultivares que foram submetidos a tratamentos: irradiação com tocoferol e térmico com tocoferol (toc).....59

Tabela 25. Atividade específica de LOX (ηmol mg de proteína min^{-1}) de EHS produzido com três cultivares que foram submetidos ao tratamento irradiação e irradiação com tocoferol (toc). 60

Tabela 26. Atividade específica de LOX (ηmol mg de proteína min^{-1}) de EHS produzido com três cultivares que foram submetidos ao tratamento térmico e térmico com tocoferol (toc) 61

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. Estrutura química das principais isoflavonas da soja.....12
Figura 2. Produtos da LOX e especificidade posicional a partir da oxidação do ácido linoléico.....16
Figura 3. Estrutura tridimensional da LOX.....17
Figura 4. Fluxograma da aplicação dos tratamentos ao EHS na fase 1. 26
Figura 5. Fluxograma da aplicação dos tratamentos ao EHS na fase 2. 30

LISTA DE ABREVIATURAS

EHS: .....Extrato hidrossolúvel de soja (leite de soja)
EMB.48: .....Embrapa 48 (nome do cultivar de soja)
toc: .....tocoferol (vitamina E)
TBHQ: ..... Butil Hidroquinona Terciária
qde. max.: .....quantidade máxima
qde. int.: ..... quantidade intermediária
qde. min.: ..... quantidade mínima
g: .....gramas
mg: .....miligramas
mL: .....mililitro
µL: .....microlitro
LOX: .....lipoxigenase
kGy: .....Quilo Gray
ɣ: ..... gama
cal: ..... caloria
kcal: .....quilo caloria
kJ: ..... quilo Joule
Min: ..... minutos

1-RESUMO

O extrato hidrossolúvel de soja-EHS (“leite de soja”) é considerado uma bebida importante devido as suas características funcionais. No entanto, a bebida sofre restrições sensoriais pela população ocidental, devido ao sabor adstringente resultante da ação da enzima lipoxigenase (LOX) ativada no processo de extração. O objetivo dessa pesquisa foi estudar o efeito de tratamentos físicos e antioxidantes sobre a atividade da LOX em EHS de diferentes cultivares de soja. Para este estudo utilizou-se tratamentos físicos (Irradiação e Térmico) e antioxidantes (Tocoferol e TBHQ) visando à inativação da LOX (fase 1). A partir da seleção dos melhores tratamentos desta fase, foram conduzidos novos ensaios associando-se tratamentos físicos ao tratamento antioxidante (fase 2). Para acompanhar os resultados da atividade enzimática nos grãos de soja e no EHS (controle), foram realizadas as concentrações centesimais de umidade, proteína, lipídios, cinzas, fibra-bruta, carboidratos, minerais e valor energético. Nos EHS produzidos na fase 1 analisou-se o teor de proteína e atividade específica de LOX. Nos grãos irradiados e no EHS produzido na fase 2 determinou-se a composição química centesimal e a atividade específica de LOX. A irradiação induziu a redução do teor de proteína em grãos de soja, porém os teores protéicos avaliados nos EHS produzidos a partir desses não sofreram alteração, comparados ao controle. Os tratamentos da fase 1 que se destacaram com a redução da atividade específica de LOX em EHS foram o térmico (80 °C), irradiação (5 kGy) e tocoferol (adicionado na quantidade máxima). Na fase 2 o tratamento térmico (80 °C) suplementado com tocoferol inibiu 100 % a atividade específica de LOX em

EHS. Concluiu-se que os tratamentos físicos + tocoferol não alteraram os nutrientes do EHS, e que o tratamento térmico + tocoferol foi o único que inibiu totalmente a atividade específica de LOX.

Palavras-chave: lipoxigenase; extrato hidrossolúvel de soja; soja

STUDY OF THE ACTIVITY OF LIPOXYGENASE ON SOYMILK [*Glycine max* (L.) MERR.] SUBJECTED TO DIFFERENT TREATMENTS. Botucatu, 2012. 75p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Energia na Agricultura) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: ÉRICA AMANDA DE BARROS

Adviser: FERNANDO BROETTO

2-SUMMARY

The soluble extract of soybean ("soymilk") is considered an important beverage because of its functional characteristics. However, the beverage suffers sensory restrictions by the western population, due to the astringent flavor resulting from the action of the enzyme lipoxygenase (LOX) activated the extraction process. The aim of this search was to study the effect of physical and antioxidant treatments on the activity of the LOX in soymilk of different soybean cultivars. For this study we used physical treatments (irradiation and thermal) and antioxidants (Tocopherol and TBHQ) aimed at inactivation of the LOX (phase 1). From the selection of the best treatments of this phase, new tests were conducted associating physical treatments to antioxidant treatments (phase 2). To follow the results of enzymatic activity in soybeans and soymilk (control), centesimals chemical concentrations were performed of moisture, protein, fat, ash, crude fiber, carbohydrates, minerals and energy value. In soymilks produced in phase 1 analyzed the protein content and specific activity of the LOX. In irradiated grains and soymilk produced in phase 2 it was determined the centesimal chemical composition and specific activity of the LOX. The irradiation induced a reduction in protein content in soybeans, but the protein levels measured in soymilks produced from soybeans irradiated did not change compared to control. The treatments of phase 1 that stood out to reduce the specific activity of the LOX in soymilk were thermal (80 °C),

irradiation (5 kGy) and tocopherol (added in the maximum). In phase 2 the thermal treatment (80 °C) supplemented with tocopherol inhibited 100% specific activity of the LOX in soymilk. It was concluded that physical treatments + tocopherol did not alter the nutrients in soymilk, and the treatment thermal + tocopherol was the only one that completely inhibited the specific activity of the LOX.

Keywords: lipoxygenase; soymilk; soybean

3-INTRODUÇÃO

A soja pertence à família das leguminosas e se destaca por ser rica em proteínas, lipídeos, fibras, isoflavonas, sais minerais e vitaminas do complexo B, além de ser uma fonte de proteína saudável. O consumo de soja contribui com a diminuição do colesterol e possui fito-químicos que auxiliam na redução do risco de câncer e no índice de doenças cardiovasculares. (TRUCOM, 2005).

O setor de alimentos vem investindo de maneira crescente no desenvolvimento de uma classe especial de produtos - os alimentos funcionais (SOYATECH, 2007), já que atualmente os consumidores buscam por alimentos de qualidade e alto valor nutricional. Pesquisa realizada pela Health Focus revela que 44 % da população preferem aos alimentos que acarretam vantagens a saúde (NIELSEN, 2006).

A partir da soja produz-se *tofu* ("queijo" de soja), iogurte à base de soja, "carne" de soja (proteína texturizada de soja – PTS), *missô* (pasta de soja), *shoyu* (molho de soja), concentrados e isolados proteicos, óleo refinado, farelo, farinha e leite de soja (extrato hidrossolúvel de soja-EHS). Esses alimentos já faziam parte da dieta japonesa e de outros países orientais e também foram sendo introduzidos em países ocidentais nos últimos anos a partir do crescimento da produção e consumo (SOUZA, VALLE, MORENO, 2000; GERREIRO, 2006).

Dentre os vários produtos a base de soja, um dos que mais se destaca é o EHS, em função da ampla variedade ofertada, como por exemplo, a combinação com sucos

de frutas que vêm sendo comercializados com sucesso no mercado nacional desde o final da década de 90. Estes produtos possuem sabor agradável e que pouco lembra o sabor característico da soja. A presença e expansão da linha destes produtos nos últimos anos indicam que os consumidores foram receptivos e os incorporaram a seus hábitos alimentares (BEHRENS, 2002). Entretanto, apesar dessa expansão do consumo, esse mercado representa apenas 1% das bebidas consumidas no Brasil (TRADECOS, 2007).

O EHS é uma bebida de baixo custo e de fácil obtenção, representa uma importante alternativa para a alimentação das populações desnutridas (GUERREIRO, 2006), pois contém macronutrientes (proteína, carboidrato e gordura) capazes de fornecer energia, acionando o trabalho biológico em nosso organismo (BRASIL, 2007).

No Ocidente, o baixo consumo da soja e de seus derivados está relacionado ao sabor, ao odor e aos hábitos alimentares. O sabor descrito como amargo e adstringente (sabor *beany flavor* ou de feijão cru), resultante da ação da lipoxigenase, é o principal fator limitante do consumo da soja. Todavia, a ação dessa enzima pode ser evitada com um tratamento térmico próximo de 100^{o}C por 5 a 10 minutos (MORAIS, SILVA, 1996; MAIA, ROSSI, CARVALHO, 2006).

Além da temperatura outros tratamentos podem eliminar o sabor e o odor característicos do leite de soja, tais como remoção completa da casca do grão, maceração dos grãos com álcalis, trituração dos grãos com ácidos e adição de flavorizantes (MORAIS; SILVA, 1996), adição de antioxidantes (que evita a oxidação lipídica, causada pela enzima lipoxigenase) (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999; HALLIWELL *et al.*, 1995).

Como alternativa, a técnica da irradiação dos grãos de soja é utilizada para estender a vida útil e evitar problemas fitossanitários em produtos consumidos in natura ou processados, inibindo brotações, matando insetos e microorganismos (THAKUR; SINGH, 1994). Além disso, ao diminuir os inibidores de proteases (fator antinutricional) ocorre a redução da atividade de LOX concomitantemente (BARROS *et. al.*, 2008).

O objetivo dessa pesquisa foi estudar o efeito de tratamentos físicos e antioxidantes sobre a atividade específica de lipoxigenases em extrato hidrossolúvel de soja produzido com diferentes cultivares.

4-REVISÃO DE LITERATURA

4.1- Soja: Origem e Histórico

Embora diferentes autores ainda discordem quanto ao local específico de onde a soja cultivada emergiu, todos concordam que a área de origem se localiza na região leste da Ásia (MIYASAKA; MEDINA, 1981).

A mais antiga referência à soja consta do herbário PEN TS‘ AO KANG MU como parte da obra “Matéria Médica” de autoria do imperador Shen Nung, escrita em 2838 a.C. Nessa obra foram descritas as plantas mais importantes para os chineses; dentre elas, o arroz, o trigo, a cevada, o milheto e a soja que eram considerados “os cinco grãos sagrados”, por serem essenciais à estabilidade da civilização chinesa (CÂMARA, 1998).

Durante séculos, o cultivo da soja permaneceu restrito apenas aos países orientais, sendo usada na preparação de grande variedade de alimentos frescos, fermentados e secos (MORAIS; SILVA, 1996). Apenas após a chegada dos primeiros navios europeus no final do século XV e início do século XVI, é que foi trazida para o Ocidente (COODETEC, 2008).

No Brasil, a soja começou a ser cultivada provavelmente em 1882. Com a chegada dos primeiros imigrantes japoneses ao Brasil em 1908, a cultura foi introduzida no Estado de São Paulo e em 1914 no Rio Grande do Sul, mas o seu plantio expandiu-se rapidamente apenas no final dos anos 60 (SOUSA *et al.*, 2000).

4.2- Botânica

A soja, *Glycine max* (L.) Merril, é pertencente à divisão Spermatophyta, subdivisão Angiospermae, classe Dicotyledoneae, ordem Rosales, família Leguminoseae (Fabaceae) que inclui, aproximadamente 600 gêneros e 13000 espécies. A família Leguminoseae é constituída de três sub-famílias: Mimosoideae, Caesalpinoideae e Faboideae (Papilionoideae). A sub-família Faboideae, é a maior delas, com cerca de 400 gêneros amplamente distribuídos, dentre eles o *Glycine*. Dentro desta sub-família encontram-se gêneros conhecidos como: *Phaseolus* (feijão), *Pisum* (ervilha), *Arachis* (amendoim), *Lens* (lentilha), entre outros (JOLY, 2002).

O sistema radicular da planta de soja possui raiz pivotante bem desenvolvida, com presença de raízes secundárias, terciárias e quaternárias; as ramificações são ricas em nódulos de bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico (CÂMARA, 1998).

É uma planta anual, ereta, pubescente, de pêlos brancos, pardo-queimados e tostados com caule herbáceo a sub-lenhoso, que varia de 0,30m a 1,80m de altura (Câmara, 1992, 1998). As folhas apresentam três principais tipos, incluindo as cotiledonares, unifolioladas ou trifolioladas, são geralmente ovais e de coloração verde claro a verde escuro com textura variando de lisa a rugosa conforme o cultivar (CÂMARA, 1998; JOLY, 2002).

O fruto, derivado de uma única folha capelar, é tipicamente um legume, comumente chamado de vagem (MIYASAKA; MEDINA, 1981). São do tipo vagem, achatados, curtos, de cor cinzenta, marrom, amarelo-palha ou preta. De acordo com a variedade, é possível encontrar até 400 vagens por planta; estas encerram de uma a cinco sementes (MISSÃO, 2006).

As flores são hermafroditas, reunidas em racemos curtos axilares ou terminais de coloração branca, amarela ou violácea, conforme a variedade (CÂMARA, 1998; JOLY, 2002). As sementes são, em geral, elípticas (ovalada) e achatadas ou globosas; com superfície lisa, brilhante ou opaca; de cor amarela, marrom, verde ou preta, variando conforme o cultivar (MISSÃO, 2006). O hilo, bem visível, varia na forma de linear-eliptico a ovalado. O tegumento (testa ou cobertura seminal) tem característica delgada, cuja função é proteger o embrião contra agentes externos (CÂMARA, 1998).

O embrião possui dois cotilédones, responsáveis por acumular as substâncias de reserva, e o eixo do embrião, o qual é constituído pela plúmula, hipocótilo e a radícula (CÂMARA, 1998).

4.3- Agronomia

No Brasil, a soja é plantada desde o extremo Sul, nas fronteiras com a Argentina, até os cerrados do Norte. Os terrenos de superfície levemente ondulada são ideais à sua cultura. A soja não tolera temperaturas baixas e é sensível ao fotoperíodo, isto é, seu florescimento não começa até que os dias no verão se tornem mais longos (CARUSO, 1997).

A semente de soja, para a germinação e a emergência da plântula, requer absorção de água de, pelo menos, 50 % do seu peso seco. Para que isso ocorra, deve haver condições adequadas de umidade e aeração do solo e a semeadura deve propiciar o melhor contato possível entre solo e semente. Semeadura em solo com insuficiência hídrica, ou *no pó,* prejudica o processo de germinação, podendo torná-lo mais lento, expondo as sementes às pragas e aos microorganismos do solo, reduzindo a chance de obtenção da população de plantas desejada (EMBRAPA, 2004b).

Regiões com precipitações médias anuais de 700 a 1.200 mm, com boa distribuição (500 a 700 mm) durante o ciclo das plantas, são consideradas aptas para a cultura (CÂMARA, 1992). A temperatura média do solo, adequada para semeadura da soja, vai de 20^{o}C a 30 ^{o}C, sendo 25 ^{o}C a ideal para uma emergência rápida e uniforme. Semeadura em solo com temperatura média inferior a 18 ^{o}C pode resultar em drástica redução nos índices de germinação e de emergência, além de tornar mais lento esse processo. Temperaturas acima de 40 ^{o}C, também, podem ser prejudiciais (EMBRAPA, 2004b).

Os solos onde se planta soja são em sua maioria ácidos e deficientes em nutrientes. Sem a devida correção, com a aplicação de calcário e nutrientes, principalmente fósforo e potássio e elementos menores, não é possível ter uma boa produção (CARUSO, 1997).

A acentuada expansão das áreas de plantio ocasiona o crescimento das ervas daninhas, que podem representar um problema para a cultura. Crescem também, em

número e intensidade, as doenças causadas por fungos, bactérias e nematóides, todas com potencial maior e menor para reduzir a produtividade (CARUSO, 1997).

Para garantia de adequado crescimento e desenvolvimento das culturas, faz necessário o uso de fungicidas sintéticos. Trabalhos têm relatado a eficiência de fungicidas no controle de patógenos associados às sementes de soja (YUYAMA; HENNING, 1997) e, também, no aumento da emergência a campo (REZENDE *et al*., 2003).

4.4-Composição química

A soja é considerada alimento de alto valor nutritivo e de grande importância na alimentação humana, constituindo excelente fonte de energia e proteína, além de razoável fonte de vitaminas e minerais (MIYASAKA; MEDINA, 1981). Possui ácidos graxos poliinsaturados e compostos fitoquímicos como isoflavonas, saponinas, fitatos, além de fosfolipídios, antioxidantes, fibras, dentre outros. Também é uma fonte de minerais, como o cobre, zinco, ferro, fósforo, potássio, magnésio, manganês e vitaminas do complexo B (CHIARELLO, 2002).

A soja quando verde apresenta alto teor de niacina e de ácido ascórbico. Quando madura, torna-se rica em vitaminas E e K e com quantidades significativas de tiamina, riboflavina e ácido fólico (MORAIS; SILVA, 1996).

Os ácidos graxos dos grãos de soja são os saturados (~15%) palmítico e esteárico; o monoinsaturado oléico (~24%), e os polinsaturados, linoléico (~54%) e linolênico (~7%). Portanto, a soja constitui-se num dos produtos mais susceptíveis a ocorrência da oxidação dos ácidos graxos. (WILSON, 1987).

Sua importância econômica e nutricional é devida ao elevado teor de lipídios e proteínas que são responsáveis por cerca de 60 % do peso seco da soja, sendo o restante composto por aproximadamente 35 % de carboidratos e 5 % de cinzas. A umidade representa em média 13 % dos grãos, que em base úmida contêm cerca de 35 % de proteínas, 17 % de lipídios, 31 % de carboidratos e 4,4 % de cinzas (LIU, 1999).

Segundo Silva *et al*. (2006) a composição química de 100 gramas de soja para umidade é 5,60 g , para energia é 451,60 (kcal g^{-1}), para proteína é 40,40 g, para lipídios é 24,55 g, para carboidratos é 17,26 g, para fibras é 9,31 g e para cinzas é 2,88 g.

4.5-Fatores Nutricionais

No Brasil, o Ministério da Saúde publicou a Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999, definindo os alimentos funcionais como sendo aqueles consumidos como parte da dieta usual, que produzem efeitos metabólicos ou fisiológicos e/ou capacidade de reduzir o risco a doenças, além de possuírem funções nutricionais básicas (BRASIL, 1999).

A soja é considerada um alimento funcional porque, além de funções nutricionais básicas, produz efeitos benéficos à saúde. Apresenta reconhecido valor nutricional sendo estudada como alimento capaz de diminuir os riscos de enfermidades como alguns tipos de câncer, doenças cardiovasculares, osteoporose e sintomas da pós-menopausa, além da redução da concentração sérica de colesterol e triglicerídeos (EMBRAPA, 2004a).

Estudos realizados no Japão e na China, países cujas populações utilizam regularmente a soja em sua dieta alimentar, mostraram reduzidos índices de doenças coronárias, de câncer de mama e de próstata, quando comparados aos dos países onde a soja é pouco utilizada na alimentação humana. Atualmente, a Federação Mundial de Cardiologia confirma que o consumo diário de 25 gramas de proteína de soja faz bem ao coração, controlando os níveis de colesterol e, assim, prevenindo doenças crônicas (MANDARINO, 2002).

Os grãos de soja apresentam em sua composição os aminoácidos essenciais e também lecitina, substancia lipídica que contém colina, inositol e fósforo. É um emulsificador biológico que tem a propriedade de conservar suspensas as gorduras no organismo, permitindo que elas passem pelas paredes das artérias. Dessa forma, preveni a obstrução da circulação sanguínea, reduzindo a taxa de colesterol e as doenças cardiovasculares (COSTA, 2002).

As isoflavonas (também chamadas de isoflavonóides) pertencem à família dos polifenóis. Uma propriedade comum dos polifenóis é a sua atividade antioxidante. Contudo as isoflavonas apresentam estrutura química semelhante aos estrógenos humanos, tal como o 17 ß-estradiol, e por apresentar atividade estrogênica, essas substâncias são comumente referenciadas como fitoestrógenos. Esses compostos se encontram de forma natural em leguminosas e são especialmente abundantes nos grãos de soja. Quando

consumimos a soja e seus produtos, as isoflavonas presentes são hidrolisadas no intestino por glicosidases intestinais, liberando as agliconas, daidzeína, a genisteína e a gliciteína (Figura 1), que são as formas biologicamente ativas, que irão atuar beneficamente no organismo humano (EMBRAPA, 2006).

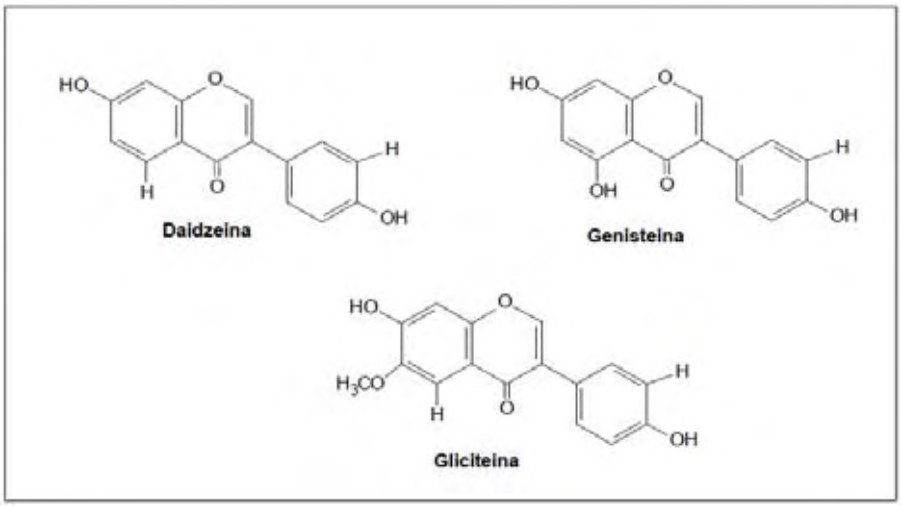

Figura 1: Estrutura química das principais isoflavonas da soja

As principais isoflavonas encontradas na soja estão nas formas de agliconas (daidzeína, genisteína e gliciteína), de glicosídeos (genistina, daidzina e glicitina), de derivados glicosilados acetilados (6”-*O*-acetildaidzina, 6”- *O*-acetilgenistina, 6”-*O*-acetilglicitina) e de glicosilados malonilados (6”-*O*-malonildaidzina, 6”-*O*-malonilgenistina, 6”-*O*-malonilglicitina) (SETCHELL, 1998; WANG et al. 1998).

A genisteína (5,7,4'-trihidroxi-isoflavona) foi capaz de promover a apoptose de células de carcinoma da próstata (KYLE *et al*., 1997). Contudo foi relatado também que a soja pode interferir na progressão da insuficiência renal crônica e da Doença de Alzheimer; é capaz de reduzir a pressão arterial, porque tem baixo conteúdo de sódio e atua na reatividade vascular; é útil na síndrome de epistaxe crônica e na telangiectasia hereditária familiar, porque inibe a angiogênese (MORAIS, 2001).

Estudos indicam que os fitormônios, conhecidos como isoflavonas ou isoflavonóides, atuam como antioxidantes, reduzindo o nível de colesterol ruim (LDL) no sangue e, conseqüentemente, influenciando a queda de doenças cardiovasculares, além de

exercerem também atividade hormonal, equilibrando a quantidade do hormônio estrógeno no organismo feminino, amenizando, os sintomas da menopausa (GUERREIRO, 2006).

As fibras solúveis da soja exercem importante papel na regulação dos níveis de glicose no sangue, pois retarda a sua absorção, auxiliando no controle de diabetes (GUERREIRO, 2006). Além disso, as fibras insolúveis auxiliam as funções gastrointestinais, normaliza a mobilidade intestinal, prevenindo a diverticulite e constipação, como conseqüência, diminuem a incidência de câncer do cólon (CHANG, 2001).

A Soja tem se mostrado como o alimento mais versátil na atualidade com respeito às possibilidades nutricionais e funcionais (YIM, 2002). E isso fez com que o consumo da soja quadruplicasse nos últimos cinco anos (AGUIAR, 2002). Apesar das evidências dos benefícios da soja na prevenção e no controle do câncer, a comunidade científica ainda não conseguiu estabelecer claramente os mecanismos fisiológicos de atuação e ação preventiva dos compostos da soja. Além disso, eficácia da soja na prevenção e no tratamento do câncer depende do tipo de câncer, do agente causal e da fase de desenvolvimento da doença. Contudo, é possível haver variações na eficácia da resposta, em função das características do paciente. (MANDARINO, 2002).

4.6-Fatores Antinutricionais

Os fatores antinutricionais existentes nos alimentos podem desencadear efeitos fisiológicos não desejados ou ainda reduzir a biodisponibilidade e absorção de alguns nutrientes (SILVA; SILVA, 2000).

A presença de agentes antinutricionais deprecia enormemente as características biológicas da soja, tornando-a tóxica, quando ministrada no estado nativo ou quando submetida a um processamento inadequado (MIYASAKA; MEDINA, 1981). O calor inativa parcial ou totalmente a ação tóxica dos componentes antinutricionais (BRAZACA, 1997).

Os fatores antinutricionais conhecidos na soja são: anti-tripsina que funciona como anti-enzima, inibindo a enzima digestiva tripsina, aumentando a necessidade de minerais (em parte devido à ação quelante do fitato) e vitaminas; hemaglutinina que promove aglutinação dos glóbulos vermelhos do sangue; Fator bocigênico que é responsável

pela hipertrofia da glândula tireóide; saponinas que são responsáveis pela ruptura de eritrócitos; fitatos que podem reduzir a biodisponibilidade e absorção de íons metálicos importantes para a fisiologia (ou metabolismo) humana; estaquinose e rafinose são oligossacarídeos não metabolizados pelo homem (MIYASAKA; MEDINA, 1981; TASHIMA; CARDELLO, 2003; BRAZACA, 1997).

Embora esteja presente em grande quantidade, a qualidade da proteína da soja não se iguala totalmente à qualidade das proteínas animais, como as carnes, ovos, leite e derivados (LOPES, 2003), sendo deficiente apenas em relação aos aminoácidos sulfurados – metionina e cistina (MIYASAKA; MEDINA, 1981), devendo ser complementada com outras fontes protéicas vegetais, como o arroz, o milho e o trigo. Justamente devido ao alto conteúdo protéico, a presença de pequenas quantidades dessas outras fontes já é o suficiente para tornar a proteína da soja equivalente às proteínas animais (LOPES, 2003).

4.7-Mercado

A soja é um produto agrícola de grande interesse mundial graças à versatilidade de aplicação de seus produtos na alimentação humana e animal e ao seu valor econômico nos mercados nacional e internacional (MELLO FILHO *et al*, 2004).

No Brasil, na safra 2011/12, a cultura ocupou uma área de 25,02 milhões de hectares, o que totalizou uma produção de 66,17 milhões de toneladas. A produtividade média da soja brasileira é de 2665 kg por hectares, chegando a alcançar cerca de 3076 kg/ha na região norte, uma das regiões com maior produção de soja. Porém, houve um decréscimo da produção atual comparada à safra 2010/2011 que atingiu uma produção de 75,32 milhões de toneladas. As condições climáticas adversas causadas pelo fenômeno *La Niña* foram às responsáveis pelo resultado negativo da safra 2011/2012 (CONAB, 2012).

O Brasil, os Estados Unidos e a Argentina representam 81 % da produção mundial de soja. O Brasil é o segundo maior produtor e exportador de soja, ficando atrás somente dos EUA (DEPEC, 2012).

4.8-Potencial de aproveitamento

Segundo o relato da Embrapa, há três setores para os produtos não alimentares a base de soja. O primeiro é destinado à fabricação de produtos intermediários, geralmente, substâncias químicas, empregadas em processos industriais, como compostos emulsificantes para aplicações diversas. O segundo setor é o de produtos industriais como solventes, fluídos, tintas e lubrificantes. E o terceiro é aquele nos quais os produtos são destinados ao consumidor final, como o biodiesel e uma gama de cosméticos e de produtos de higiene e limpeza (Papel da soja...,2009).

A torta, a farinha e o farelo são utilizados na formulação de rações. A torta também é utilizada produzir fluídos para extintores de incêndio, na fabricação de adesivos e fertilizantes. Já a farinha é utilizada para fazer pães e massas alimentícias O óleo de soja é utilizado na fabricação de margarina, maionese, molhos e óleos e a lecitina é usada em doces, pães, leite em pó e remédios. A indústria também utiliza o óleo na confecção de tintas e sabão (Costa, 1996).

A adição de proteínas de soja aos alimentos industrializados apresenta diversas vantagens tecnológicas, como o aumento de retenção de umidade, melhoria da textura, ligamento, coesão e rendimento final, retenção dos atributos de qualidade em geral, maior teor protéico, cor agradável, maior vida de prateleira, melhor palatabilidade, melhor aparência e valor nutricional (Araújo *et al*., 1997;).

4.9-Enzima lipoxigenase

O sabor descrito como amargo e adstringente resultante principalmente da ação da enzima lipoxigenase limitam o consumo dessa leguminosa. Nos grãos de soja íntegros (secos), o substrato não está exposto à ação dessa enzima. A reação só ocorre quando os grãos se quebram e absorvem água. A ação da lipoxigenase pode ser evitada com tratamento térmico (MORAIS; SILVA, 1996).

As lipoxigenases são isoenzimas que catalisam a incorporação de moléculas de oxigênio em ácidos graxos poliinsaturados (substratos) que possuem a estrutura *cis,cis*-1,4-pentadieno, formando hidroperóxidos (Figura 2) que se decompõem em ácidos,

aldeídos e cetonas de cadeia curta. Os ácidos graxos vegetais mais comuns que possuem essa estrutura são os ácidos linoléico e linolênico.

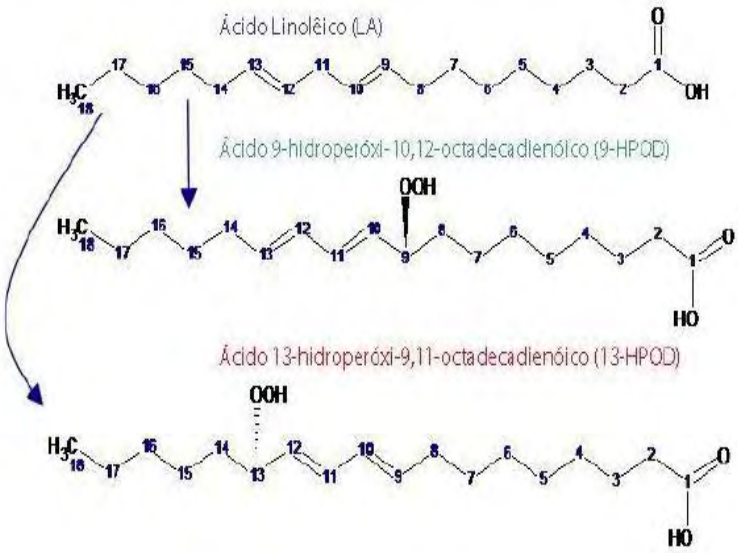

Figura 2: Produtos da LOX e especificidade posicional a partir da oxidação do ácido linoléico.

Os grãos de soja constituem a fonte mais rica de lipoxigenases, sendo que quatro isoenzimas foram isoladas, as lipoxigenases L-1, L-2, L-3a e L-3b. Estas isoenzimas diferem entre si em vários aspectos da ação catalítica tais como pH ótimo de ação, especificidade para substrato, regioespecificidade, produtos primários e secundários formados e valor de Km. As isoenzimas L-3a e L-3b são muito similares em suas propriedades e, para fins analíticos, podem ser consideradas idênticas e caracterizadas como L-3 (AXELROD *et al*, 1981).

As lipoxigenases são proteínas globulares, solúveis em solução salina e consistem em uma cadeia polipeptídica simples (Figura 3), de massa molecular em torno de 100 kDa (HILDEBRAND; HYMOWITZ, 1981; AXELROD *et al.*, 1981). São dioxigenases, contendo um mol de ferro em um grupamento não-heme, por mol de proteína, portanto são denominadas metaloproteínas (VLIEGENTHRT *et al*., 1979), O ferro II oxida-se em ferro III, então é retirado um átomo de hidrogênio da cadeia carbônica do ácido graxo e este átomo de hidrogênio se oxida a próton. O radical pentadieno ligado à enzima é convertido em um dieno

conjugado que capta o oxigênio. Ocorre então a liberação de hidroperóxido, iniciando assim uma reação em cadeia (MORETTO; FETT, 1998).

Figura 3**.** Estrutura tridimensional da LOX

4.10-Extrato Hidrossolúvel de Soja (EHS)

Conforme Guerreiro (2006), o extrato aquoso de soja é um produto obtido a partir da lavagem, maceração e aquecimento de grãos de soja. Os grãos lavados e macerados são moídos e aquecidos para, então, passarem por um processo de filtração que separa o extrato aquoso de seu subproduto, o *okara* (bagaço).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a partir da Resolução CNNPA n° 14/78 aprovou o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade para Extrato de Soja.

A legislação define o EHS (Leite de Soja) como sendo o produto obtido a partir da emulsão aquosa resultante da hidratação dos grãos de soja, convenientemente limpos, seguido de processamento tecnológico adequado, adicionado ou não de ingredientes opcionais permitidos, podendo ser submetido à desidratação, total ou parcial (BRASIL, 1978).

De acordo com a Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2005b) o EHS deve obedecer à seguinte característica química para teor de proteína: máximo de 41,5 % (em pó) e mínimo de 3,0 % (líquido).

Acredita-se que o extrato aquoso de soja tenha sido elaborado pela primeira vez na China durante o segundo século depois de Cristo (JACKSON, 2001). Desde

então, este extrato aquoso tem sido consumido na China diariamente. No Ocidente, o baixo consumo de soja está relacionado ao sabor, odor e hábitos alimentares (MORAIS; SILVA, 1996).

No início do século XX, um médico americano missionário na China, Harry Williis Miller, deu uma grande contribuição ao seu uso, conduzindo uma pesquisa onde a soja era utilizada na alimentação de crianças e bebês chineses. Melhorou a qualidade do processamento, e iniciou uma produção de EHS em larga escala em muitos países, incluindo China, Estados Unidos, Japão, Filipinas, Hong Kong e Singapura. Nas últimas décadas, este produto concretizou seu papel de bebida popular tanto devido ao trabalho do Dr. Miller quanto ao processo de redução do *beany flavor* (sabor de feijão cru) desenvolvido por pesquisadores das Universidades de *Illinois e Cornell* (LIU, 1999).

Para eliminar o sabor e o odor característicos da soja em EHS podem ser utilizados vários tratamentos, tais como remoção completa da casca, trituração com água quente, maceração dos grãos com álcalis, trituração dos grãos com ácidos e adição de flavorizantes (MORAIS; SILVA, 1996).

A partir do lançamento (em 1997) de bebidas a base de soja no mercado brasileiro, observou-se um consumo crescente deste tipo de produto. Nos últimos anos, as substâncias a base de soja em geral e particularmente o EHS têm despertado o interesse pelo seu consumo, devido principalmente às suas propriedades nutricionais. O produto industrializado pode ser encontrado no Brasil na forma original (sem aromatização), aromatizado com diferentes sabores e, ainda, adoçado com sacarose ou edulcorantes como a sucralose (TASHIMA; CARDELLO, 2003; GUERREIRO, 2006).

O EHS é um produto de aspecto semelhante ao leite de vaca e de alto valor nutritivo, (MIYASAKA; MEDINA, 1981). É uma bebida de baixo custo, e de fácil obtenção, representa uma importante alternativa para a alimentação das populações desnutridas (GUERREIRO, 2006). Como não contém lactose e possui ácidos graxos poliinsaturados é ideal para portadores de intolerância à lactose ou indivíduos com índice de colesterol alto. Constitui boa fonte proteica (Tabela 1), podendo ser utilizado na prevenção e correção da desnutrição infantil (OLIVEIRA *et al*., 1996).

Embora o EHS seja muito recomendado para crianças com intolerância a lactose, o EHS não contém a mesma biodisponibilidade do cálcio presente nos leites de vaca

e cabra, no caso da soja a isoflavona e os fitatos afetam a absorção do cálcio pelo organismo. Assim sendo, crianças que recebem exclusivamente o EHS devem receber uma suplementação de cálcio (LOPES, 2003; ZHAO *et al*., 2005).

Tabela 1. Composição química (por 100g de produto) do EHS comparado com o leite de vaca e humano.

Determinações	**EHS**	**Leite de vaca pasteurizado**	**Leite humano**
Calorias (kcal)	38,00	61,00	77,00
Proteínas (g)	3,00	3,60	1,10
Gordura (g)	1,40	3,00	4,00
Carboidratos (g)	3,80	4,90	9,50
Fibra (g)	0,00	0,00	0,00
Água (g)	91,80	88,50	85,40
Cálcio (mg)	36,00	123,00	33,00
Fósforo (mg)	30,00	96,00	14,00
Ferro (mg)	0,40	0,10	0,10
Sódio (mg)	---	---	16,00
Vitamina A (mg)	10,00	33,00	70,00
Vitamina B_1 (mg)	0,05	0,04	0,01
Vitamina B_2 (mg)	0,04	0,18	0,04
Niacina (mg)	0,20	0,10	0,20
Vitamina C (mg)	0,00	1,00	5,00

Fonte: Morais e Silva (1996).

De maneira geral, aproximadamente 30 % do Ca dietético está biodisponível nos alimentos sendo que, são muitas as variáveis que influenciam em sua biodisponibilidade (BUZINARO *et al*., 2006). No caso da soja e seus derivados, alguns componentes que podem afetar a absorção do cálcio são as isoflavonas e fitatos. Porém, os minerais são mais biodisponíveis (14 a 76 %) através de bebidas, por estas permitirem sua maior solubilidade e menor concentração de inibidores (SOARES *et al*., 2004; CASÉ *et al*. 2005).

Casé *et al*. (2005) estudaram a adição de diferentes sais de cálcio a extratos de soja, posteriormente submetidos ao tratamento térmico, verificando as alterações na quantidade do elemento, ocorrência de precipitação ou separação de fases, assim como a

aceitação sensorial dos produtos obtidos. Os autores concluíram que o cálcio quelato, embora ocasione sabor estranho (facilmente mascarado por adição de aromas), foi o sal mais adequado para fortificação de extrato de soja, devido a sua alta solubilidade.

4.11-Irradiação

A irradiação é um processo físico comparável à pasteurização térmica, ao congelamento ou enlatamento, onde o alimento embalado ou não é submetido a um dos três tipos de energia ionizante: raios gama, raios X ou feixe de elétrons (IRRADIAÇÃO DOS ALIMENTOS, 2011). Em 1983, a Comissão do *Codex Alimentarius* concluiu que alimentos irradiados com energia abaixo de 10 kGy não apresentavam risco toxicológico. Além disso, organizações internacionais como o Fundo das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) avaliaram várias destas pesquisas e concluíram que a irradiação de alimentos é segura e benéfica.

A técnica da irradiação dos grãos de soja é utilizada para estender a vida útil e evitar problemas fitossanitários em produtos consumidos *in natura* ou processados, inibindo brotações, matando insetos e microorganismos (THAKUR; SINGH, 1994). Além disso, degrada os inibidores de proteases (fator antinutricional) que em conseqüência reduz a atividade de LOX, pois segundo BARROS *et. al*. (2008) na ausência do KTI (inibidor de protease Kunitz) o nível de LOX é reduzido. Os custos estimados dos benefícios da irradiação comercial mostram ser competitivos com outros métodos de fumigação e tratamentos físicos-térmico (DOGBEVI; VACHON; LACROIX, 2000; LACROIX *et al*., 2002).

Diversos trabalhos abordam o efeito da radiação nas propriedades funcionais e estruturais das proteínas de soja (ABU-TARBOUSH, 1998; LACROIX *et al*., 2002). O processamento por radiação tem se mostrado eficiente na redução de oligossacarídeos, inibidores de tripsina e quimotripsina e melhora a produção de leite de soja e tofu (BYUN; KANG; MORI, 1996; IYER *et al*., 1980; RAO; VAKIL, 1983). Dentre outros fatores, ainda aumenta a atividade antioxidante dos compostos fenólicos presentes na soja (VARYAR; LIMAYE; SHARMA, 2004).

No entanto, a literatura também demonstra que o uso da irradiação pode afetar a proteína da soja, de maneira com que as ligações que estabilizam as estruturas

secundárias e terciárias sejam destruídas causando mudanças conformacionais, influenciando na solubilização em meio aquoso e conseqüentemente no valor nutricional (BYUN; KANG, 1994, 1995; GROLICHOVÁ; DVORAK; MUSILOVA, 2004).

Tais relatos são de grande importância para a indústria alimentícia, pois a proteína de soja apresenta diversas vantagens tecnológicas, como o aumento de retenção de umidade, melhoria da textura, ligamento, coesão e rendimento final, retenção dos atributos de qualidade em geral, maior teor protéico, cor agradável, maior vida de prateleira, melhor palatabilidade, melhor aparência e valor nutricional (ARAÚJO; CARLOS; SEDYAMA, 1997; TEIXEIRA, 2011).

4.12-Temperatura

Dados epidemiológicos do Ministério da Saúde indicam que mais de 45% das doenças transmitidas por alimento ocorrem nas residências. A principal forma de contaminação desses produtos dentro do lar dos brasileiros está relacionada ao manuseio incorreto e a conservação inadequada de alimentos. Para evitar esse tipo de doença, responsável por cerca de 670 surtos com 13 mil doentes todo ano, a população precisa estar atenta a cuidados de higiene e a temperatura de armazenagem dos alimentos (BRASIL, 2009).

Como a temperatura influencia a multiplicação microbiana (FIGUEIREDO; JUNQUEIRA; CUNHA, 2003), a falta de controle da temperatura de conservação dos alimentos perecíveis acarreta não só importantes perdas econômicas e nutricionais, como também compromete a segurança sanitária e altera as características sensoriais dos alimentos, como sabor, cor, textura e odor (GÓES *et al*., 2004; LIMA, 2001).

Técnicas de conservação de alimentos devem ser empregadas com a finalidade de prolongar a vida-útil de frutos e hortaliças, aumentando o período de comercialização. Portanto, a utilização de baixas temperaturas no armazenamento reduz a taxa metabólica dos processos de maturação e senescência precoce dos frutos e retarda o desenvolvimento dos microrganismos (BLEINROTH, 1986).

Muitas pesquisas evidenciam a influência de fatores como a concentração e a temperatura nos parâmetros reológicos de diversos produtos, sendo a relação

de Arrhenius geralmente utilizada para descrever o efeito da temperatura na viscosidade dos alimentos líquidos (KAYA, 2001; BERTO, SILVEIRA JUNIOR, VITALI, 2003).

Os métodos de conservação de alimentos de produtos alimentícios baseados na alteração da temperatura referem-se à conservação pelo frio – resfriamento e congelamento – e pelo calor – pasteurização, esterilização, branqueamento e apertização (FARO; ARDITO; BORGO, 2002). Tais métodos inibem enzimas indesejáveis e microrganismos.

4.13-Oxidação

Os lipídios são constituídos por uma mistura de tri, di e monoacilgliceróis, ácidos graxos livres, glicolipídios, fosfolipídios, esteróis e outras substâncias. A maior parte destes constituintes é oxidável em diferentes graus (BERSET, CUVELIER, 1996), sendo que os ácidos graxos insaturados são as estruturas mais susceptíveis ao processo oxidativo (COSGROVE, CHURCH, PRYOR, 1987).

A oxidação lipídica é responsável pelo desenvolvimento de sabores e odores desagradáveis tornando os alimentos impróprios para consumo, além de também provocar outras alterações que irão afetar não só a qualidade nutricional, devido à degradação de vitaminas lipossolúveis e de ácidos graxos essenciais, mas também a integridade e segurança dos alimentos, através da formação de compostos poliméricos potencialmente tóxicos (KUBOW, 1993; SILVA, BORGES, FERREIRA, 1999).

A oxidação por via enzimática ocorre pela ação das enzimas lipoxigenases que atuam sobre os ácidos graxos poliinsaturados, catalisando a adição de oxigênio à cadeia hidrocarbonada poliinsaturada. O resultado é a formação de peróxidos e hidroperóxidos com duplas ligações conjugadas que podem envolver-se em diferentes reações degradativas (HALLIWELL, CHIRICO, ARUOMA, 1995; SILVA, BORGES, FERREIRA, 1999).

O uso de antioxidantes na indústria de alimentos e seus mecanismos funcionais têm sido amplamente estudados (MUKAI *et al.*, 1993). Os antioxidantes primários são compostos fenólicos que promovem a remoção ou inativação dos radicais livres formados

durante a iniciação ou propagação da reação, através da doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo a reação em cadeia (SIMIC; JAVANOVIC, 1994)

Os antioxidantes principais e mais conhecidos deste grupo são os polifenóis, como butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxitolueno (BHT), terc-butil-hidroquinona (TBHQ) e propil galato (PG), que são sintéticos, e tocoferóis, que são naturais (NAMIKI, 1990). Estes últimos também podem ser classificados como antioxidantes biológicos (NAMIKI, 1990; BAILEY, 1996).

Os antioxidantes contribuem na qualidade organoléptica do alimento, mas indústrias estão optando por antioxidantes naturais, já que há estudos mostrando que os antioxidantes sintéticos conferem efeito carcinogênico em tecido animal (BOTTERWECK *et al*., 2000**)**. Os antioxidantes BHA e TBHQ foram testados em roedores e induziram respectivamente a hiperplasia gastrointestinal e basais (MADHAVI; SALUNKHE, 1995;CRUCES *et al.,* 1999). Por estes motivos, o uso destes antioxidantes em alimentos é limitado (ANVISA, 2000)

4.14-Valor Energético

O valor calórico ou valor energético de um alimento se refere à energia que o mesmo fornece quando ingerido pelo organismo. É a energia necessária para o desempenho de todas as atividades físicas e para realizar o metabolismo do nosso corpo (FAO, 1963).

A unidade padrão de energia é o Joule, porém, no Brasil o valor energético de diferentes produtos alimentícios deve ser expresso nos rótulos em quilocalorias (kcal) e quilojoule (kJ), declarado em números inteiros. A legislação permite um erro de 20%, para mais ou para menos, nos valores de componentes nutricionais informados nos rótulos dos produtos em relação ao encontrado na análise (BRASIL, 2003).

Devido ao fato da quantidade de energia envolvida no metabolismo dos gêneros alimentícios ser muito alta, a kcal (1 kcal = 1000 calorias (cal)), é comumente utilizada. Uma convenção permite a adoção dos termos kcal e cal para expressar a quantidade de energia envolvida no metabolismo de alimentos (BRASIL, 2005a).

O kJ, assim como a kcal, são unidades de energia usadas para medir calor. Cada kcal corresponde a 4,186 kJ. A caloria é uma medida mais conhecida da população e usada com freqüência (kcal). Desse modo, basta converter as medidas em quilojoules para quilocalorias dividindo o primeiro por 4,186 (BRASIL, 2005a).

Por meio de algumas maneiras pode-se obter o valor energético do alimento. A partir da:

- Composição química centesimal- obtenção da energia metabolizável (BRASIL, 2003);
- Tabela de composição de alimentos- obtenção da energia metabolizável (TACO, 2011) e;
- Bomba calorimétrica- obtenção da energia bruta (SANTOS, 2010).

5-MATERIAL E MÉTODOS

5.1- Material

Para a realização dos ensaios, foram utilizados grãos de soja dos cultivares Embrapa: BRS-213 (com ausência de lipoxigenases), BRS-258 e Embrapa 48 (Emb-48), ambas com presença de lipoxigenases. Os grãos utilizados nos ensaios foram fornecidos pela EMBRAPA – Soja, sediada em Londrina, PR.

5.2-Métodos

5.2.1- Processamento

Para a produção do EHS os grãos de cada cultivar foram hidratados em água destilada por 2 horas. Em seguida, os grãos foram triturados por 2 minutos em liquidificador na proporção de 1:6 (soja: água), o extrato foi filtrado em coador de tecido, onde ocorreu a separação do Okara (resíduo da soja) com o EHS (BRASIL, 1978).

O EHS (Controle e tratamentos) foi fracionado em tubos falcon de 15 mL, que ficaram mantidos em ultra-freezer (-80 °C).

5.2.2- Planejamento experimental

As atividades foram divididas em 2 fases:

Fase 1: Os tratamentos aplicados aos EHS foram os físicos (térmico e irradiação) e antioxidantes (tratamento antioxidante natural e sintético) (Figura 2). Com esses tratamentos observou-se as possiveis reduções ou inibição da atividade de lipoxigenases. Essa fase foi realizada para obtenção de resultados preliminares, que permitiram a seleção dos possíveis tratamentos que foram utilizados na fase 2. O fluxograma a seguir representa a aplicação dos tratamentos aos EHS que foram produzidos a partir de três cultivares (BRS-213, BRS-258 e Emb-48):

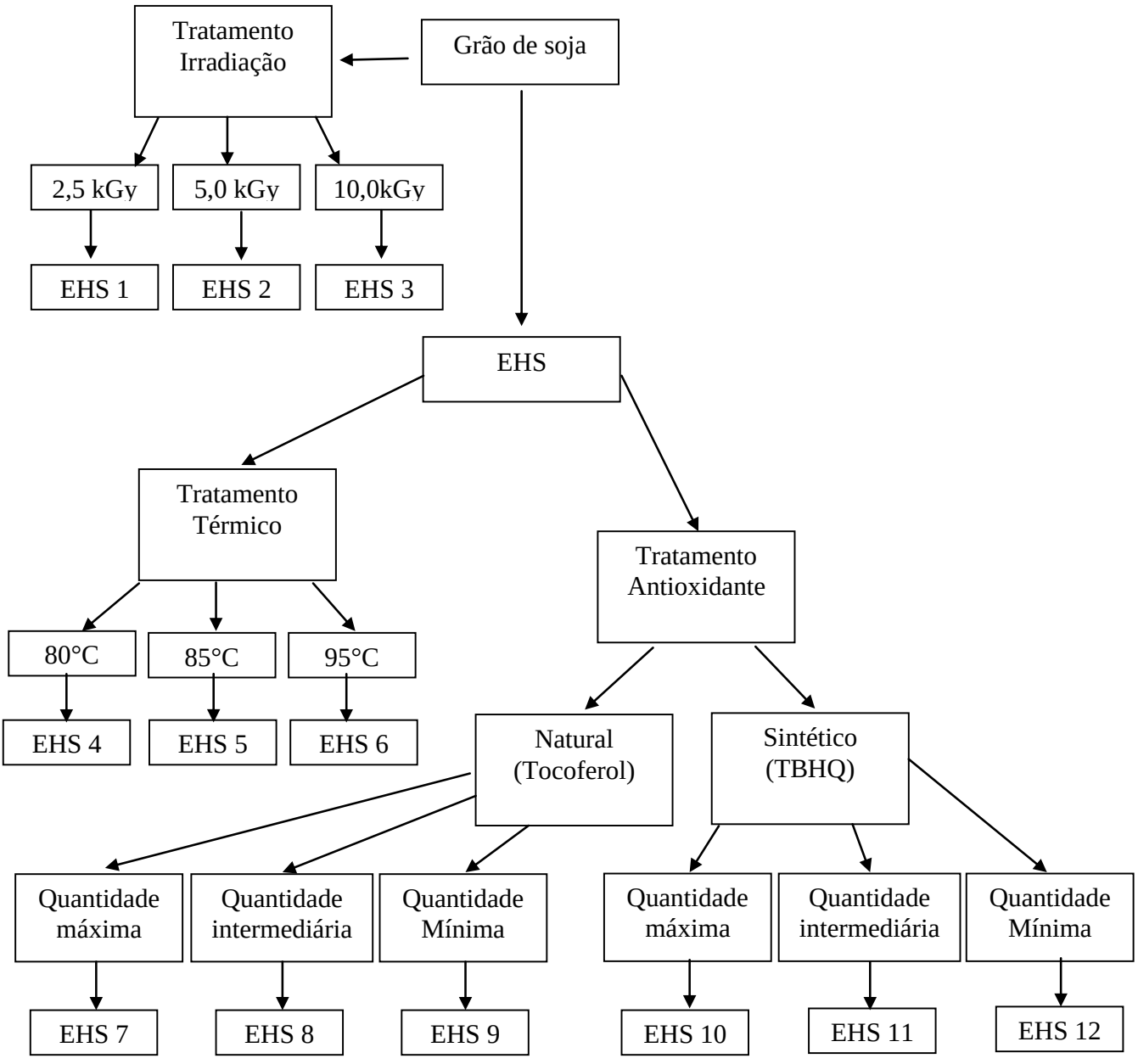

Figura 4: Fluxograma da aplicação dos tratamentos ao EHS na fase 1.

5.2.2.1- Tratamentos - Físicos

a) Tratamento térmico (químico e biológico): Após o processamento, o EHS de cada cultivar (BRS-213, BRS-258 e Embrapa 48- Emb. 48) foi transferido para béquer de 2 litros, todos foram aquecidos em banho-maria e mantidos por 10 minutos na temperatura dos tratamentos (80, 85 ou 90 ºC).

-**Tratamento 1:** EHS extraído do BRS-213 e aquecido a 80°C

-**Tratamento 2:** EHS extraído do BRS-258 e aquecido a 80°C

-**Tratamento 3:** EHS extraído do Emb. 48 e aquecido a 80°C

-**Tratamento 4:** EHS extraído do BRS-213 e aquecido a 85°C

-**Tratamento 5:** EHS extraído do BRS-258 e aquecido a 85°C

-**Tratamento 6:** EHS extraído do Emb. 48 e aquecido a 85°C

-**Tratamento 7:** EHS extraído do BRS-213 e aquecido a 90°C

-**Tratamento 8:** EHS extraído do BRS-258 e aquecido a 90°C

-**Tratamento 9:** EHS extraído do Emb. 48 e aquecido a 90°C

b) Tratamento irradiação (químico e biológico): Os grãos de soja foram embalados em sacos plásticos e submetidos à dosagens de 2,5; 5 e 10 kGy de irradiação gama proveniente da fonte ^{60}Co, Gammacell 220 (Atomic Energy of Canada Ltda.). O processamento para obtenção do EHS foi realizado posteriormente com esses grãos irradiados. Os tratamentos foram realizados em cooperação com o Centro de Energia Nuclear na Agricultura – CENA/USP, Piracicaba – SP.

-**Tratamento 10:** EHS extraído do BRS-213 irradiado a 2,5 kGy.

-**Tratamento 11:** EHS extraído do BRS-213 irradiado a 5,0 kGy.

-**Tratamento 12:** EHS extraído do BRS-213 irradiado a 10 kGy.

-**Tratamento 13:** EHS extraído do BRS-258 irradiado a 2,5 kGy

-**Tratamento 14:** EHS extraído do BRS-258 irradiado a 5,0 kGy.

-**Tratamento 15:** EHS extraído do BRS-258 irradiado a 10 kGy

-**Tratamento 16:** EHS extraído do Emb. 48 irradiado a 2,5 kGy

-**Tratamento 17:** EHS extraído do Emb. 48 irradiado a 5,0 kGy

-Tratamento 18: EHS extraído do Emb. 48 irradiado a 10 kGy

5.2.2.2- Tratamentos - Antioxidantes

Para os tratamentos antioxidantes do EHS, utilizou-se compostos antioxidantes-natural e sintético, aplicados de acordo com as exigências da legislação brasileira (BRASIL, 2000)

A ANVISA permite a adição em EHS de alguns antioxidantes (Tabela 2), porém para realização dos ensaios foram selecionados apenas dois antioxidantes, sendo um natural (Tocoferol-vitamina E) e o outro sintético (TBHQ- Butil Hidroquinona Terciária).

Os antioxidantes foram pesados e adicionados após o processamento do EHS. A homogeneização do antioxidante no EHS foi realizada em liquidificador. A quantidade máxima de tocoferol (toc) e bultil hidroquinona terciária (TBHQ) foi calculada com base no teor de gordura presente em 100 mL de EHS de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2. Antioxidantes (Aditivo) permitidos para se adicionar em alimentos da categoria produtos protéicos, da subcategoria bebida não alcoólica a base de soja, ou seja, EHS.

INS	**ADITIVO ANTIOXIDANTE**	**LIMITE MÁXIMO (g 100 g^{-1} ou g 100 mL^{-1})**
304	Palmitato de ascorbila	0,01
305	Estearato de ascorbila	0,01
307	**Tocoferol**	**0,05 (sobre o teor de gordura)**
310	Galato de propila	0,01 (sobre o teor de gordura)
319	**Terc-butil-hidroquinona, TBHQ**	**0,02 (sobre o teor de gordura)**
320	Butil Hidroxianisol, BHA	0,01 (sobre o teor de gordura)
321	Butil Hidroxitolueno, BHT	0,01 (sobre o teor de gordura)

Fonte: Brasil, 2000

Para cada cultivar de soja o antioxidante foi adicionado em quantidade máxima (qde.Max.), quantidade intermediária(qde int.), quantidade mínima (qde min.), sendo que qde int. = qde. max./2 e a qde. min. = qde. int./2.

a) Tratamento antioxidante natural (Tocoferol - toc): A partir de cada cultivar foram extraídos volumes de 1000 mL de EHS e desses calculou-se a quantidade de toc. O toc adicionado ao EHS foi doado pela DSM produtos nutricionais, sediada em São Paulo/ Brasil.

-**Tratamento 19:** EHS extraído do BRS-213 + 1,12g de toc.
-**Tratamento 20:** EHS extraído do BRS-213 + 0,56g de toc
-**Tratamento 21:** EHS extraído do BRS-213 + 0,28g de toc
-**Tratamento 22:** EHS extraído do BRS-258 + 1,36g de toc
-**Tratamento 23:** EHS extraído do BRS-258 + 0,68g de toc
-**Tratamento 24:** EHS extraído do BRS-258 + 0,34g de toc
-**Tratamento 25:** EHS extraído do Emb. 48 + 1,40g de toc
-**Tratamento 26:** EHS extraído do Emb. 48 + 0,70g de toc
-**Tratamento 27:** EHS extraído do Emb. 48 + 0,35g de toc

b) Tratamento antioxidante sintético (Butil hidroquinona Terciária-TBHQ - Sigma-Aldrich**):** A partir de cada cultivar foram extraídos 1000 mL de EHS e desses volumes calculou-se a quantidade de TBHQ a ser adicionado.

-**Tratamento 28:** EHS extraído do BRS-213 + 0,45g de TBHQ
-**Tratamento 29:** EHS extraído do BRS-213 + 0,22g de TBHQ
-**Tratamento 30:** EHS extraído do BRS-213 + 0,11g de TBHQ
-**Tratamento 31:** EHS extraído do BRS-258 + 0,54g de TBHQ
-**Tratamento 32:** EHS extraído do BRS-258 + 0,27g de TBHQ
-**Tratamento 33:** EHS extraído do BRS-258 + 0,14g de TBHQ
-**Tratamento 34:** EHS extraído do Emb. 48 + 0,56g de TBHQ
-**Tratamento 35:** EHS extraído do Emb. 48 + 0,28g de TBHQ
-**Tratamento 36:** EHS extraído do Emb. 48 + 0,14g de TBHQ

Fase 2: Essa fase foi delineada com os tratamentos que se destacaram na fase 1. Aplicou-se ao mesmo EHS o “melhor” tratamento físico e o “melhor” tratamento

antioxidante. Tais parâmetros foram determinados a partir dos resultados estatísticos obtidos da fase 1 (trabalho preliminar) em relação a redução da atividade específica de lipoxigenases (LOX).

Tratamentos da fase 1 que foram selecionados:

-**Tratamento Térmico:** Tratamentos 1, 2 e 3;

-**Tratamento Irradiação:** Tratamentos 11, 14 e 17;

-**Tratamento Antioxidante natural:** Tratamentos 19, 22 e 25.

O EHS foi extraído da mesma forma descrita no item 5.2.1 com os cultivares BRS-213, BRS-258 e Emb. 48 e submetido a tratamentos físicos e com adição de antioxidante (tratamento irradiação + antioxidante e tratamento térmico + antioxidante) (Figura 3). Os tratamentos físicos selecionados foram a dosagem de 5kGy de irradiação e a temperatura de 80°C. Para combinar com o método físico foi fixado o tocoferol (antioxidante natural), na quantidade máxima exigida pela lei vigente.

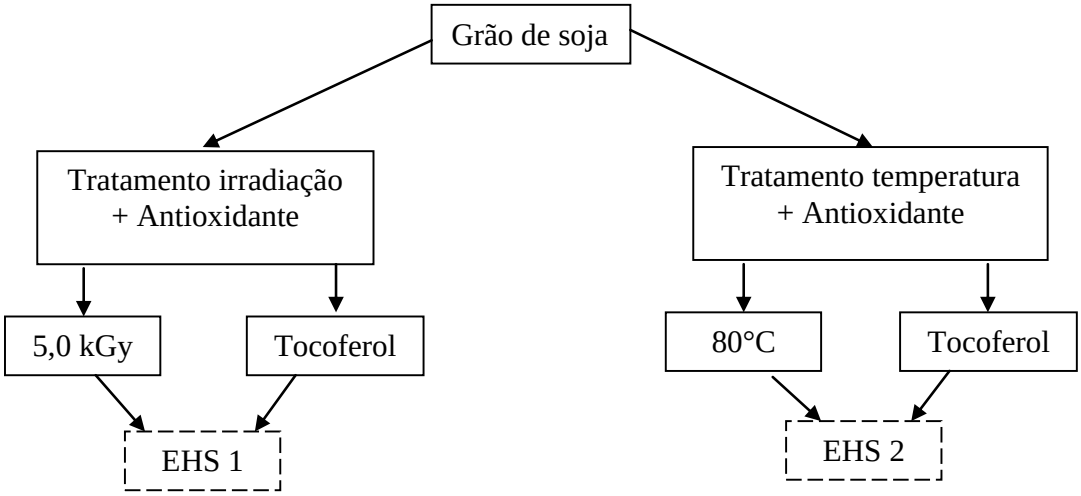

Figura 5: Fluxograma da aplicação dos tratamentos ao EHS na fase 2.

5.2.2.3- Tratamentos físicos (irradiação e térmico) + antioxidante (tocoferol)

a)Tratamento irradiação + tocoferol: O EHS foi extraído dos grãos irradiados e em seguida foi adicionado o tocoferol (toc) referente ao volume estabelecido

(600mL). A homogeneização do tocoferol no EHS foi realizada em liquidificador. Sendo delineados três tratamentos, com quatro repetições, totalizando doze parcelas experimentais:

-**Tratamento 1:** EHS extraído do BRS-213 irradiado a 5,0 kGy + 0,672 g de toc.
-**Tratamento 2:** EHS extraído do BRS-258 irradiado a 5,0 kGy + 0,816 g de toc.
-**Tratamento 3:** EHS extraído do Emb. 48 irradiado a 5,0 kGy + 0,840 g de toc.

b)Tratamento térmico + tocoferol: Após a extração do EHS (600 mL) adicionou-se o tocoferol (toc), a homogeneização ocorreu em liquidificador. Em seguida o volume foi transferido em béquer de 1 litro que ficou em banho-maria por 10 minutos a 80 °C. Sendo delineados três tratamentos, com quatro repetições, totalizando doze parcelas experimentais:

-**Tratamento 4:** EHS extraído do BRS-213 e aquecido a 80 ºC + 0,672 g de toc.
-**Tratamento 5:** EHS extraído do BRS-258 e aquecido a 80 ºC + 0,816 g de toc.
-**Tratamento 6:** EHS extraído do Emb. 48 e aquecido a 80 ºC + 0,840 g de toc.

5.2.3- Análises químicas

Nos grãos e nos EHS (Controle) foram realizadas a composição química centesimal (umidade, proteína, lipídios, cinzas, fibra-bruta e carboidratos) conforme metodologias do Instituto Adolfo Lutz (BRASIL, 2005a), no Laboratório de Bromatologia da FCA/UNESP- Campus de Botucatu, SP. As determinações de minerais e energia bruta foram realizadas no Departamento de Química e Bioquímica do Instituto de Biociências de Botucatu/UNESP.

A análise realizada para os EHS obtidos na Fase 1 foi determinação de proteína bruta.

Para os grãos irradiados analisou-se a composição química centesimal. Nos EHS da Fase 2 foram realizadas as análises de composição química centesimal, exceto fibras. As análises foram desenvolvidas no Centro de Raízes e Amidos Tropicais (Unidade

complementar da Faculdade de Ciências Agronômicas- Unesp Botucatu/SP) conforme metodologia do Instituto Adolfo Lutz (BRASIL, 2005a).

Os resultados das determinações realizadas para os grãos foram expressos na base seca. Já para EHS os resultados foram demonstrados na base úmida.

a) Determinação do teor de proteína total

A proteína foi determinada pelo método de Kjeldahl, o qual quantifica o N orgânico total. Para conversão do N em proteína é necessário multiplicar o resultado pelo fator 6,25. O procedimento do método baseia-se no aquecimento da amostra com ácido sulfúrico para digestão até que o carbono e hidrogênio sejam oxidados. Todo nitrogênio presente na amostra transformou-se em sulfato de amônio. Adicionou-se NaOH concentrado e aqueceu-se para liberação da amônia dentro do volume conhecido de uma solução de ácido bórico, formando borato de amônio. O borato de amônio formado é dosado com uma solução ácida (HCl) padronizada (BRASIL 2005a).

b) Determinação do extrato etéreo ou gordura bruta

Pesou-se 2g de amostra em cartucho de papel-filtro e registrou-se o peso inicial dos balões (balões vazios) referentes a cada amostra.

O cartucho de papel de filtro foi colocado no recipiente de extração Soxhlet. Ao balão foi adicionado de 30 a 40 mL de éter de petróleo e colocado sob o condensador fixando-o ao anel de rosca. Ligou-se a água do condensador. Após completar a extração, foi removida a amostra do recipiente e colocado o tubo de vidro, coletor de éter, sob o condensador. Registrou-se o peso final do balão (balão com gordura). A diferença entre o peso final e o inicial do balão corresponde à massa da gordura extraída (SILVA, 1990, BRASIL, 2005a).

c) Teor de umidade pelo método de secagem em estufa

Método de secagem em estufa através da perda de peso da amostra aquecida a 105ºC ± 1ºC, até peso constante (BRASIL, 2005a).

d) Determinação de cinzas

Foram pesados 2g das amostras utilizando-se cápsulas de porcelana previamente taradas. Estas amostras foram desidratadas a 105 ± 2ºC por 12 h e em seguida foram mantidas em dessecador, para a posterior pesagem. Em sequencia as amostras foram carbonizadas em mufla a 550° C por 4 h. Após resfriadas em dessecador até a temperatura ambiente as amostras foram pesadas. O cálculo do percentual de cinzas foi efetuado por meio da seguinte expressão: % Cinzas = [(S*100) / P]

Onde: S = massa de cinzas (g);

P = massa da amostra (g).

A diferença entre o peso do conjunto e o peso do cadinho vazio, expressa a quantidade de cinzas na amostra (BRASIL, 2005a).

e) Fibra bruta

Para determinar o teor de fibra bruta dos alimentos, que representa o conteúdo total de fibras, utilizou-se do método de digestão ácido-base. Foram pesados, em triplicata, aproximadamente 3,0g de cada amostra em béquer e transferidos para tubo de digestão, em seguida acrescentados 200 ml de solução de H_2SO_4 a 1,25% e submetidos à ebulição branda durante 30 minutos. O material foi filtrado em filtro de papel e lavado com auxílio de água destilada quente. O material retido no filtro foi transferido para o tubo digestor com auxílio de 200 ml de NaOH a 1,25% e submetido novamente ao processo de digestão e filtragem, em papel filtro tarado. O filtro juntamente com a amostra retida foi submetido ao processo de secagem completa em estufa a 105ºC, com circulação de ar forçado. Em seguida, foram resfriados por 1 hora em dessecador e posteriormente pesados, conforme a metodologia da AOAC (1990). Os resultados foram expressos na base seca em g 100 g^{-1}.

f) Carboidratos

Para os grãos o teor de carboidrato foi determinado por diferença conforme a expressão: 100 - % dos constituintes sólidos (proteína, lipídeos, cinzas e fibra bruta). Já para o EHS o teor de carboidratos foi determinado por diferença: 100 - % umidade - % constituintes sólidos.

g) Minerais

As concentrações de Ca, Cu, Zn, P, Fe e K foram determinadas segundo Malavolta *et al*. (1989) e Sarruge & Haag (1974). Os extratos foram obtidos por digestão nitroperclórica. O P foi determinado por colorimetria, segundo AOAC (1990); Ca, Cu, Zn e Fe por espectrometria de absorção atômica e K por fotometria de chama.

h) Energia metabolizável

O valor energético foi calculado a partir dos resultados obtidos pela composição química centesimal das amostras multiplicados pelos seguintes fatores de conversão: Carboidratos (exceto polióis) 4 kcal/g - 17 kJ/g; Proteínas 4 kcal/g - 17 kJ/g; Gorduras 9 kcal/g - 37 kJ/g (BRASIL, 2003).

i) Energia bruta ou total

A energia bruta é obtida a partir da combustão completa da amostra dentro de uma bomba calorimétrica, através da determinação do calor liberado para uma quantidade de água (2 L) onde está submersa a bomba. O calor liberado durante o processo representa o máximo em energia que pode ser obtida pela combustão de um composto (PIFFER, 1999). Para determinação da energia bruta utilizou-se um calorímetro *Oxygen Combustion Bomb* da marca Parr, modelo 1108.

5.2.4- Análise bioquímica

Foi determinada a atividade específica de lipoxigenases (LOX) do EHS controle, dos EHS obtidos na Fase 1 e 2, dos grãos de soja controle e dos grãos irradiados. Essa análise foi realizada com 4 repetições.

Para extração da LOX dos grãos de soja macerou-se 20mg da amostra com 2 mL de tampão Tris-HCl 50 $mol.L^{-1}$, CaCl2 20 $mol.L^{-1}$, pH 8,0, a solução macerada foi transferida para tubos Falcon e centrifugada a 5.500 *rpm* por 10 minutos, à 4 °C. O sobrenadante (extrato enzimático) obtido da centrifugação foi pipetado para eppendorf e armazenado em freezer -20°C.

A atividade específica de LOX sobre o ácido linoléico foi determinada segundo o método descrito por Axelrod *et al.* (1981), o qual se baseia no aumento da absorbância a 234 nm, resultante da formação de um sistema de duplas ligações conjugadas no hidroperóxido formado.

Preparou-se uma solução-estoque de linoleato de sódio 10 $mol.L^{-1}$, utilizando-se ácido linoléico, aproximadamente 99% (SIGMA), como se segue: a um erlenmeyer envolvido por papel alumínio, contendo aproximadamente 10 mL de água deionizada, previamente fervida, foram adicionados 78 μL de ácido linoléico e 90 μL de Tween 20 (SIGMA). Em seguida, homogeneizou-se a solução, succionando com auxílio de uma pipeta automática e tomando-se o cuidado para não formar bolhas. Para o clareamento da solução, foram adicionadas gotas de solução de hidróxido de sódio 0,5 N. Após o clareamento, a solução foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL coberto por papel-alumínio, após houve a aferição do volume. A solução-estoque de linoleato de sódio foi armazenada em tubos eppendorf, envolvidos em papel alumínio e armazenados a – 20ºC.

Para as análises das atividades de lipoxigenases, adicionou-se 10 μL de EHS diluído ou do extrato bruto (obtido do grão de soja), 40 μL da solução-estoque de linoleato de sódio (substrato), 500 μL de tampão fosfato 50,0 $mol.L^{-1}$, pH 6,5 em cubeta de quartzo. A velocidade da reação foi determinada de 20 em 20 segundos, a 234 nm, por um período de 60 segundos. Sob as mesmas condições, procedeu-se com o branco, que consistiu apenas da mesma quantidade de substrato e tampão.

Os resultados foram expressos em ηmol. mg de proteína. $(min)^{-1}$ a partir da expressão:

$$Velocidade\,da\,\mathrm{Re}ação = \frac{\Delta E \times VE \times FD \times VC}{\varepsilon}$$

onde:

ΔE = variação da absorbância a 234 nm;

VE = volume do extrato enzimático;

FD = fator de diluição;

VC = volume total contido na cubeta;

ε = 25000 $mol.L^{-1}$ (Absortividade molar dos hidroperóxidos do ácido linoléico a 234 nm).

Atividade específica de LOX é o número de unidades de enzima por miligrama de proteína (LEHNINGER, 1995). Assim, os valores de atividade específica foram obtidos dividindo-se os valores de atividade pela concentração de proteínas (velocidade da reação/ mg de proteína).

A quantificação do teor de proteína no extrato enzimático foi realizada pelo método de BRADFORD (1976), onde a concentração de proteína solúvel presente nos extratos foi determinada em triplicata, com albumina de soro bovino (BSA) como proteína padrão. A curva padrão foi obtida através de uma solução de BSA (Albumina de Soro Bovino) em concentração final de $1mg.mL^{-1}$. Tal análise foi realizada no Departamento de Química e Bioquímica do Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP/SP.

5.2.5- Análise estatística

Os resultados das análises físico-químicas dos grãos de soja e dos EHS da Fase 1 foram expressos através de médias e desvios padrões. Os dados da análise da composição química centesimal dos EHS da Fase 2 e bioquímica dos grãos de soja e EHS da Fase 1 e 2 foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. As análises foram realizadas no software MINITAB 16 (MINITAB, 2010).

6- RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1- Análises químicas

6.1.1- Composição química centesimal dos grãos de soja irradiados

Os resultados referentes à composição química centesimal dos cultivares BRS-213, BRS-258 e EMBRAPA 48 utilizados na produção do EHS encontram-se na Tabela 3. Os cultivares Embrapa 48, BRS-258 e BRS-213 apresentaram resultados próximos entre si para todos os parâmetros observados (matéria seca, cinzas, extrato etéreo, fibra bruta) com exceção do teor proteína bruta e carboidratos (Tabela 3). TANGO *et al*. (1984) afirmam que composição físico-química dos grãos de soja podem variar em função do cultivar, condições edafo-climáticas, forma de cultivo e tratamento utilizado.

Segundo GROLICHOVÁ *et al*. (2004) a energia da irradiação pode afetar as três macromoléculas: proteínas, carboidratos e lipídeos. Tais alterações podem levar a transformações químicas como quebra de ligações peptídicas, dissulfídicas, pontes de hidrogênio, bem como ligações cruzadas das cadeias protéicas. Todas estas alterações podem influenciar a estrutura terciária das proteínas e suas propriedades físico-químicas (CIÉSLA; ROOS; GLUSZEWSKI, 2000). Essas modificações possivelmente ocorreram na macromolécula proteína, pois, houve queda do teor proteico quando os grãos de soja de cada cultivar foram submetidos às dosagens de irradiação (Tabela 3).

Para cada cultivar tratado com irradiação (intensidades de 2,5; 5,0 e 10,0 kGy) os resultados médios do teor de proteína foram próximos. Entretanto, quando comparados ao controle, observou-se diminuição dos teores protéicos. Baseado no trabalho de SIDDHURAJU; MAKAR; BECKER (2002), tal fato pode ser discutido em função da interferência da irradiação na configuração estrutural da macromolécula (proteína) presente nos grãos de soja. Segundo estes autores, a irradiação pode induzir a processos como a deaminação, quando o aminoácido perde seu grupo amina, pode ocorrer formação de $NH_{3,}$ a qual é volátil, causando assim a redução do teor de proteína bruta.

Entretanto, mesmo com a redução do teor de proteína bruta após os tratamentos de irradiação, o grão ainda apresenta considerável quantidade de proteína (~32%), teor próximo ao encontrado por Ciabotti *et al.* (2006) e Osthoff *et al.* (2010), 32 % e 32,5 % respectivamente.

Tabela 3. Concentrações centesimais dos grãos de soja irradiados a 2,5 / 5,0 e 10 kGy e dos respectivos controle. Valores representam à média (n=3) ± desvio padrão.

*CV	**kGy	Parâmetros (%)					
		Matéria seca	Cinzas	Proteína	Lipídios	Fibra Bruta	Carboidratos
BRS-213	Controle	90,25±0,25	5,57±0,01	38,92±0,28	19,21±0,28	17,72±1,14	18,67±0,80
	2,5	91,60±0,99	4,34±0,08	32,88±0,70	20,66±0,84	15,27±0,30	26,85±0,88
	5,0	91,80±0,11	5,58±0,05	33,41±0,02	20,99±0,11	15,58±0,68	24,44±0,71
	10,0	91,48±0,45	4,53±0,04	33,22±0,21	19,95±0,76	15,92±0,26	26,38±0,72
BRS-258	Controle	91,75±0,14	5,00±0,01	37,84±0,32	24,19±0,30	17,59±1,09	15,39±0,98
	2,5	92,60±0,21	5,33±0,02	31,74±0,13	19,21±0,87	17,16±0,76	27,56±0,85
	5,0	92,41±0,01	5,22±0,61	32,50±0,39	20,56±0,38	16,06±0,22	26,66±0,49
	10,0	91,35±0,47	5,28±0,12	31,72±0,52	21,23±1,01	16,42±0,41	26,35±0,44
EMB-48	Controle	91,20±0,20	4,70±0,01	35,11±0,01	21,62±0,03	16,56±1,00	22,01±0,85
	2,5	92,98±0,14	4,67±0,32	31,10±0,65	21,43±0,10	15,75±0,70	27,05±0,49
	5,0	92,07±0,60	4,63±0,76	32,42±0,79	20,79±0,04	16,42±0,18	25,74±0,63
	10,0	91,68±0,14	5,29±0,34	30,56±0,39	20,45±0,21	16,58±0,37	27,12±0,42

Valores expressos com base na matéria seca. A caracterização foi demonstrada em grupos de cores para cada cultivar tratado e controle. *CV= Cultivares. **kGy= unidade de dose de irradiação gama.

A soja constitui excelente fonte proteica para alimentação humana, nesses ensaios houve variação de 31 a 39% do teor de proteína bruta (Tabela 3). Esse elevado teor de proteína apresenta alta digestibilidade (87 a 88 %) além de conter aminoácidos

essenciais, fatores que agregam a soja grande valor nutricional e econômico (HALL, 1971; TOLEDO, 2007).

Delincée; Villavicencio; Mancini-Filho (1998) observaram que o uso de radiação gama até 10,0 kGy não alterou o teor protéico, o valor biológico e a digestibilidade de duas variedades de feijões Carioca (*Phaseolus vulgaris L.)* e Macaçar (*Vigna unguiculata (L.) Walp*), discordando dos resultados apresentados na Tabela 3 para o teor de proteína, os valores médios do teor proteico reduziram quando os três cultivares receberam as dosagens de 2,5/ 5,0 e 10,0 kGy.

FARAG (1998) reporta que os grãos de soja tratados com doses de irradiação até 10,0 kGy mantiveram os teores de umidade, proteína bruta e cinza semelhantes aos grãos *in natura* (controle), essa declaração concorda somente com os resultados médios do teor de umidade e cinzas encontrados para o cultivar BRS-213, BRS-258 e Embrapa 48 (Tabela 3).

Em relação aos carboidratos (Tabela 3) já era esperado o aumento dos valores médios, pois houve queda do teor de proteína e para obtenção de seus resultados o cálculo é feito por diferença.

Os valores da matéria seca, cinzas, proteínas e lipídios dos cultivares em estudo foram semelhantes aos valores encontrados na literatura (CIABOTTI, 2006; MORAES *et al*, 2006; BOWLES, 2006; TOLEDO *et al.*, 2007), respectivamente.

6.1.2- Minerais

Os artigos referentes ao conteúdo de minerais em grãos de soja (TSAI *et al*., 1981; LIM *et al*., 1990; SUN; BREENE, 1991; SHEN *et al*., 1991; CAI *et al*., 1997; CAI; CHANG, 1998; ROSSET, 2007; DA SILVA *et al*., 2009) fornecem principalmente dados dos macronutrientes (Ca, Mg, P e K) expressos em base seca. Nestes estudos, os autores encontraram valores variando entre 160 e 410 mg 100 g^{-1} para Ca; 190-330 mg 100 g^{-1} para Mg; 360-770 mg 100 g^{-1} para P e 1910-2040 mg 100 g^{-1} para K. Os grãos dos cultivares analisados no presente estudo apresentaram conteúdo de minerais (Tabela 4) compreendidos entre o mínimo e o máximo apresentados na literatura. Entretanto, a concentração de K foi inferior aos dados publicados pelos autores citados na frase anterior.

A variação dos resultados para o mesmo mineral pode ser discutida de acordo ao relatado por Liu (1999), o qual argumentou que o conteúdo de minerais nos grãos de soja pode variar devido a diferença existente entre as cultivares, as condições submetidas no cultivo e forma de aplicação de fertilizantes e suas possíveis concentrações utilizadas.

Os resultados do presente estudo (Tabela 4) quanto a concentração de Fe, Zn e Cu situam-se próximos aos valores encontrados por Ciabotti (2006), 7,2-7,9 de Fe, 4,2-4,6 de Zn, 0,9-1,2 de Cu, expressos na base seca e em mg 100 g^{-1}.

A concentração de K (1.130 - 1.182), Fe (6 - 8) e Ca (247 – 288) corroboram (Tabela 4) com Amaral (1981) e Oliveira (1981), que relataram que a soja é importante fonte de minerais como K, Fe e Ca, com destaque para a elevadíssima concentração de K, a qual concorre para a manutenção do equilíbrio eletrolítico do tecido.

Tabela 4. Concentrações dos minerais presentes em cultivares de soja. Valores representam à média (n=3) ± desvio padrão.

Minerais	Caracterização (mg $100g^{-1}$)		
	Cultivares		
	BRS-213	BRS-258	Embrapa-48
K	1.168,49±0,01	1.130,03±0,02	1182,15±0,02
P	540,59±0,43	593,47±0,01	573,64±0,02
Mg	382,43±0,03	398,42±0,01	419,52±0,03
Ca	246,97±0,01	287,80±0,01	278,04±0,01
Na	16,86±0,02	17,23±0,01	17,02±0,01
Fe	7,75±0,01	6,02±0,01	6,20±0,01
Zn	4,32±0,01	5,06±0,01	6,41±0,01
Cu	1,38±0,02	1,09±0,04	1,07±0,02

Valores expressos com base na matéria seca.

Para justificar a queda das concentrações de minerais do EHS (Tabela 5) comparado ao grão de soja (Tabela 4) destaca-se que durante o processamento dos grãos de soja para a produção do EHS, foi separado o *Okara*, que contem uma fonte considerável de minerais. O`toole (1999) encontrou variações para as concentrações de minerais do *Okara* (mg.100 g) onde a concentração de Ca observada foi (260 – 428), Mg (158 – 165), Fe (6,2 – 8,2), Na (16- 18), K (1046 – 1233), Cu (1,1 – 1,2), Zn (3,5 – 6,4), Mn (2,3 – 3,1) e P (396 – 444).

Mesmo ocorrendo grande diferença entre as concentrações de minerais do grão de soja (Tabela 4) para o EHS (Tabela 5), o EHS apresenta vantagem sobre o grão por ser bebida, pois os minerais tornam-se mais biodisponíveis (14 a 76 %), a solução permite maior solubilidade e menor concentração de inibidores (SOARES *et al*., 2004; CASÉ *et al*. 2005).

A concentração de Ca encontrada nesse estudo (20 a 30 mg $100g^{-1}$) é próxima da concentração de Ca presente no leite humano (33 mg $100g^{-1}$) (MORAES,SILVA; 1996), porém a biodisponiblidade do cálcio da soja é menor que a do leite humano, isso porque alguns componentes como a isoflavona e os fitatos podem afetar a sua obsorção no organismo (ZHAO *et al*., 2005). Dessa forma, crianças que recebem exclusivamente EHS devem receber suplementação de cálcio (LOPES, 2003). Embora, estudo realizado por Casé *et al*. (2005) foi concluído que o cálcio quelato é o sal mais adequado para fortificação de extrato de soja, devido a sua alta solubilidade.

Tabela 5. Concentrações dos minerais presentes em EHS produzido com três cultivares de soja. Valores representam à média (n=3) ± desvio padrão.

Minerais	Caracterização (mg $100g^{-1}$)		
	EHS dos cultivares		
	BRS-213	BRS-258	EMB.48
K	128,63±0,04	130,39±0,02	123,03±0,04
P	61,93±0,06	62,66±0,12	60,85±0,01
Mg	17,39±0,22	19,60±0,03	15,57±0,03
Ca	20,13±0,02	29,77±0,31	25,82±0,15
Na	0,09±0,01	0,12±0,01	0,10±0,01
Fe	0,25±0,02	0,26±0,05	0,29±0,01
Zn	0,30±0,01	0,57±0,11	0,49±0,10
Cu	0,04±0,01	0,07±0,26	0,07±0,04

Valores expressos com base na matéria úmida

As concentrações de minerais do EHS podem variar de acordo com o processamento utilizado, ou seja, a proporção soja: água. As concentrações de K (42,2) e P (82,7) encontradas por Felberg *et al.* (2004) foram inferiores as encontradas nesse ensaio (Tabela 5). Porém, alguns resultados coincidiram aos citados na literatura. As concentrações

de Fe (0,31) e Mg (14,31) foram semelhantes as encontradas por Felberg *et al.* (2004). As concentrações de Ca encontradas nas cultivares avaliadas se assemelham aos dados citados em TACO (2011). Em relação de Zn e Cu, suas concentrações (Tabela 5) concordam com Ciabotti (2006).

6.1.3- Valor energético (Energia bruta e Energia metabolizável)

As Tabelas 6, 7 e 8 resumem o valor energético da soja e seus subprodutos. Como opção de alimentos menos calóricos, pode-se preparar produtos a partir da farinha nutritiva obtida pela indústria que retira o óleo da soja, tal produto conterá pouco teor de lipídios, elevado conteúdo de proteína adequada às necessidades nutricionais de indivíduos adultos além de preservar as características físicas e sensoriais (DHINGRA; JOOD, 2001).

Embora a unidade padrão de energia seja o Joule (J), no Brasil, o valor energético de diferentes produtos alimentícios precisam ser expresso nos rótulos em quilocaloria (kcal) e quilojoule (kJ) (Tabela 6), declarados em números inteiros (BRASIL, 2003).

Tabela 6. Resultados médios da energia bruta do grão de soja, do okara, do EHS e EHS liofilizado, seguidos do desvio padrão.

Cultivar	Amostras	Energia bruta	
		kcal g^{-1}	kJ g^{-1}
BRS-213	Grão de soja	5,51±0,21	22,81±0,86
	Okara	4,99±0,01	20,90±0,11
	EHS	0,58±0,08	2,41±0,33
	EHS-liofilizado	5,44±0,06	22,70±0,25
BRS-258	Grão de soja	5,20±0,06	21,70±0,25
	Okara	5,06±0,04	21,23±0,15
	EHS	0,60±0,13	2,50±0,56
	EHS-liofilizado	5,71±0,02	23,92±0,08
EMB-48	Grão de soja	5,36±0,09	22,40±0,29
	Okara	4,82±0,04	20,25±0,18
	EHS	0,63±0,05	2,62±0,21
	EHS-liofilizado	5,59±0,01	23,44±0,01

A energia bruta foi demonstrada em grupos de cores para cada cultivar.

O EHS apresenta valor energético (energia bruta do alimento) inferior às outras amostras analisadas (Tabela 6), o que já era previsto uma vez que foi diluído (proporção 1:6 - soja:água). Em contrapartida, o grão de soja, o okara e o EHS-liofilizado apresentaram valores energéticos semelhantes. Tais resultados demonstram que o processamento (obtenção do okara) e a técnica de liofilização não interferiram nas macromoléculas que conferem energia ao alimento. Esta afirmação concorda com Marques (2008) o qual relatou a preservação das características físicas e nutricionais de frutos tropicais a partir da liofilização.

Na indústria alimentícia, o valor energético dos alimentos é majoritariamente determinado através da aplicação de um método empírico introduzido no final do século XIX por Atwater (MERRILL; WATT, 1973; ATWATER, WOODS, 1996) Este método, baseia-se na composição nutricional dos alimentos. As quantidades dos nutrientes (em gramas) usados pelo corpo humano para a obtenção de energia (proteínas, lípidos e glícidos) são multiplicadas, respectivamente, pelos fatores 4, 9 e 4 (em $kcal.g^{-1}$), para a obtenção do valor energético do alimento (SANTOS, 2010). A partir dessa técnica foi possível quantificar a energia metabolizável dos alimentos, no caso do presente trabalho verificou-se a energia dos diferentes cultivares e dos EHS produzidos com os mesmos (Tabela 7)

O valor energético (energia metabolizável) do EHS e do grão de soja obtido pela Tabela TACO (2011) foi adequado à margem de erro (± 20 %) permitida pela legislação. Entretanto, o valor da energia bruta encontrada para os EHS e grãos de soja foi além dos valores obtidos pelo cálculo da energia metabolizável, e consequentemente inadequados ao exigido em Brasil (2003). Esse excedente é representado pela caloria contida nas fibras, principalmente nas fibras solúveis (fermentescíveis) calculada (SANTOS, 2010).

Os resultados do presente ensaio, 520 a 550 kcal $100g^{-1}$ (Tabela 6), se assemelham aos publicados por Rodrigues (2002) em relação à energia bruta do grão de soja (519 kcal $100g^{-1}$).

Houve elevada diferença entre os valores em kcal do grão de soja e do EHS (Tabelas 7 e 8). Quando o EHS é produzido, além da soja ser triturada com água (diluição), ocorre à filtração, onde o *Okara* (resíduo) é separado do extrato, no qual considerável parte da caloria deve ficar retida. Esta informação pode ser confirmada pela

interpretação dos resultados obtidos por Silva *et al* (2006), que verificaram que no Okara havia 334,10 kcal $100g^{-1}$, enquanto que no grão a fonte calórica foi de 451,60 kcal $100g^{-1}$.

Tabela 7. Comparação entre o valor energético obtido pelos valores estimados do cálculo centesimal (energia metabolizável), energia bruta e Tabela de composição de alimentos e bebidas (energia metabolizável), dos EHS e grãos de soja.

Amostra	Valores Referentes à kcal $100g^{-1}$				
	Energia Metabolizável	Limite (- 20 %)	Limite (+ 20 %)	Energia Bruta	*Tabela
EHS (BRS-213)	43,28	34,62	51,94	57,59	39,00
EHS (BRS-258)	48,84	39,07	58,61	59,65	39,00
EHS (EMB-48)	49,16	39,33	58,99	62,63	39,00
Grão (BRS-213)	402,89	322,31	483,47	551,13	459,00
Grão (BRS-258)	430,63	344,50	516,76	519,57	459,00
Grão (EMB-48)	423,06	338,45	507,67	536,01	459,00

O valor energético foi demonstrado em grupos de cores para o EHS e grão de soja irradiado. *Tabela está em (TACO, 2011).

Os resultados do valor energético mostram-se semelhantes, independente do tratamento aplicado ao grão ou ao EHS (Tabela 8). Entretanto, o tratamento irradiação quando comparado ao controle interferiu no valor energético dos três cultivares de soja. Essa redução da energia metabolizável pode estar vinculada a redução do teor de proteínas (Tabela 3) já que a kcal.$100g^{-1}$ (energia metabolizável) dos grãos de soja foram obtidas pelo cálculo da composição química centesimal.

Os valores encontrados por Maia (2005) (32,54 kcal 100 mL^{-1}) e por Monteiro e Martino (2006) (37,49 kcal 100 mL^{-1}) para o EHS foram inferiores aos observados nesse ensaio (Tabela 8), provavelmente em função da proporção soja: água utilizada no processamento.

Tabela 8. Energia metabolizável dos EHS controle e submetidos a tratamentos físicos e dos grãos de soja controle e irradiados.

Tratamentos	kcal.100mL^{-1} ou g^{-1}		
	Cultivares		
	BRS-213	BRS-258	Emb48
EHS-Controle	43,28	48,84	49,16
EHS-80 °C	52,27	49,94	52,93
EHS-5,0 *kGy	49,60	49,56	48,31
Grão- Controle	403,13	430,63	423,10
Grão-2,5 kGy	371,06	380,35	365,15
Grão-5,0 kGy	342,45	360,96	360,63
Grão-10,0 kGy	383,95	379,63	371,37

O valor energético foi desmosntrada em grupos de cores para o EHS e grão de soja irradiado. *kGy= unidade de dose de irradiação ionizante.

6.1.4- Proteína bruta dos EHS tratados

Os resultados dos teores proteicos dos EHS não se diferenciaram entre si em função dos tratamentos (Tabela 9). Outrossim, estes valores concordam ao exigido pela ANVISA, a qual preconiza que os EHS precisam conter no mínino 3% de teor de proteína.

Muitos estudos *in vitro* têm demonstrado que o oxigênio singleto (O_2 na forma reativa) oxida lipídios, proteínas, aminoácidos, ácidos nucléicos, carboidratos e tióis (RONSEIN *et al*, 2006). Desta forma, o uso de antioxidantes em alimentos contribuiu para retardar ou inibir a oxidação das biomoléculas, promovendo a manutenção da qualidade nutricional dos mesmos (CHOE; MIN, 2009). Contudo, os resultados obtidos para os EHS submetidos aos tratamentos antioxidantes demonstraram estabilidade no teor de proteína (Tabela 9), uma vez que estes colaboram na manutenção das cadeias proteicas em seus estados originais, por possuírem a habilidade de unirem-se aos oxigênios singletos, responsáveis pela ruptura das cadeias (HAYES *et al.*, 2009).

Tabela 9. Determinação do teor de proteína bruta do EHS submetido a tratamentos físicos e antioxidantes. Valores representam à média (n=3) ± desvio padrão.

Tratamentos	Determinação de PB%		
	Cultivares		
	BRS-213	BRS-258	EMB.48
Controle	4,38±0,03	4,37±0,01	4,17±0,07
80°C	4,84±0,04	4,82±0,01	4,54±0,01
85°C	4,93±0,03	4,68±0,01	4,71±0,02
90°C	5,50±0,02	4,91±0,02	4,87±0,03
2,5 kGy*	4,54±0,01	3,67±0,04	4,11±0,03
5,0 kGy	4,63±0,03	3,91±0,05	3,62±0,01
10,0 kGy	4,52±0,06	3,05±0,00	4,75±0,02
Tocoferol-max**	4,81±0,03	4,67±0,08	4,29±0,00
Tocoferol-int***	4,83±0,05	4,52±0,04	4,16±0,01
Tocoferol-min****	4,83±0,02	4,66±0,00	4,58±0,01
TBHQ-max	5,34±0,01	5,18±0,01	4,61±0,04
TBHQ-int	4,65±0,06	5,00±0,00	4,86±0,06
TBHQ-min	4,68±0,03	5,00±0,06	4,63±0,02

Valores expressos com base na matéria úmida. O teor de proteína bruta foi demonstrado em grupos de cores para distinguir o controle do tratamento físico e antioxidantes. *kGy= unidade de dose irradiação ionizante. **máximo; ***intermediário; **** mínimo

A pequena variação no teor de proteína entre os tratamentos pode ser atribuída à forma de processamento do EHS (artesanal-manual), ou seja, a força aplicada na extração pode ser diferente a cada vez que o EHS é produzido. No presente ensaio, o EHS foi produzido na proporção 1:6 (soja: água), em uma diluição que provavelmente determinou diferenças com resultados encontrados na literatura. Como comparação, o resultado do teor de proteína do EHS (3,03%) obtido por Rodrigues (2008) está aquém aos valores médios demonstrados pela Tabela 9.

O tratamento térmico (90 °C) para o cultivar BRS-213 contribuiu com aumento do teor proteico (5,50 %) comparado ao controle (4,38 %). Por ser o tratamento com temperatura mais elevada entre os tratamentos térmicos, estima-se que este fator favoreceu para maior evaporação e ao consequente aumento do teor de sólidos solúveis (Tabela 9).

A solubilidade de uma proteína é a manifestação termodinâmica do equilíbrio entre a interação proteína-proteína e proteína-solvente e está relacionada ao seu balanço de hidrofilicidade/hidrofobicidade. As principais interações que influenciam na

solubilidade das proteínas são de natureza hidrofóbica e iônica. Interações hidrofóbicas promovem ligações proteína-proteína que resultam em um decréscimo de solubilidade. Enquanto interações iônicas promovem ligações proteína-água e resultam em um aumento da solubilidade (DAMODARAM, 1996), a cultivar que melhor representou esse fenômeno foi a EMB.48 irradiada a 10,0 kGy (Tabela 9).

Modificações estruturais da proteína, como aumento da hidrofilicidade e reação de deaminação, promovidos pela irradiação são possivelmente responsáveis pela sua maior solubilidade (DOGBEVI; VACHON; LACROIX, 2000). Porém, nesse trabalho, a irradiação não induziu a maior solubilidade, pois o teor de proteína ou manteve-se semelhante ou mais reduzido que o controle. A maior redução do teor proteico foi representada pelo EHS produzido pelo cultivar BRS-258 que foi submetido a dosagem de irradiação gama de 10,0 kGy (3,05 %) onde seu controle era de 4,37 % (Tabela 9). Essa queda no teor de proteína possivelmente está relacionada com a formação de $NH_{3,}$ induzida pela irradiação, o que foi observado também para grão de soja irradiado (Tabela 3).

6.1.5- Composição química centesimal do EHS (Fase 2)

Nesta Fase, os EHS produzidos com cada cultivar de soja (BRS-213, BRS-258 e EMB.48) receberam tratamentos físicos de irradiação e temperatura aliados ao tratamento antioxidante (adição de tocoferol em quantidade máxima permitida pela ANVISA). Os tratamentos selecionados em função da análise estatística da Fase 1 e utilizados para a Fase 2 foram os que demonstraram maior redução da atividade específica de LOX, conforme se observou nas Tabelas 15 a 23. As Tabelas de 10 a 12 expressaram a caracterização (composição química centesimal) do EHS para cada cultivar (controle) em relação aos tratamentos aplicados (Físico + Antioxidante).

Os teores de cinzas encontrados nos EHS tratados foram superiores aqueles presentes nos EHS controle, resultado consequente da adição de tocoferol. Ressalta-se que os valores observados entre os tratamentos aplicados ao EHS-BRS-213 para todos os parâmetros da composição química centesimal não apresentaram diferença significativa (Tabela 10).

Os valores médios foram superiores para o teor de proteína e lipídios dos EHS produzidos com o cultivar BRS- 213 que foram submetidos a tratamentos físicos (Irradiação e Térmico) quando comparados ao controle (Tabela 10). Esses resultados concordam com Mendes *et al*. (2004) que relataram que o processamento térmico adequado aumenta a solubilidade e a digestibilidade protéica, da fibra e dos lipídios.

Tabela 10. Caracterização química centesimal dos EHS produzidos com os cultivares BRS-213, BRS-258 e EMB.48 e submetidos a tratamentos físicos (irradiação-5,0 kGy e térmico-80 °C) com suplementação de tocoferol (toc).

EHS	Tratamentos	Parâmetros (%)				
	Físicos + toc	Umidade	Cinzas	Proteína	Lipídios	Carboidratos
BRS-213	Controle	91,10 a	0,56 b	4,38 b	2,25 b	1,40 b
	5,0 kGy*	89,63 b	0,82 a	4,70 a	2,76 a	1,49 ab
	80 °C	88,98 b	0,86 a	4,86 a	2,91 a	1,66 a
BRS-258	Controle	90,28	0,57	4,37	2,75	1,72
	5,0 kGy*	89,32	0,75	4,62	2,72	1,65
	80 °C	89,78	0,79	4,45	2,86	1,63
EMB.48	Controle	90,27	0,56 c	4,17 bc	2,80 b	1,82
	5,0 kGy*	89,83	0,86 a	4,14 c	2,75 b	1,75
	80 °C	89,63	0,73 b	4,42 a	3,09 a	1,86

Valores expressos com base na matéria seca. Médias seguidas de letras diferentes na coluna indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade para cada cultivar. *kGy= unidade de dose de irradiação ionizante.

Os teores de proteína bruta para todos os EHS estão adequados ao exigido pela legislação brasileira, a qual exige que o EHS contenha no mínimo 3% de proteína bruta.

O EHS produzido por cada cultivar demonstrou elevado teor de proteína bruta (~ 4,50 %), a qual é caracterizada por possuir boa digestibilidade, tal afirmação

foi confirmada pelos resultados de Felix (2005) que observou em grãos de soja tostados 93 % de digestibilidade. Assim como, Wang *et al*. (1997) obteve 86,46 % da digestibilidade da proteína após autoclavar (121 °C) o EHS por 5 minutos.

O parâmetro umidade apresentou valores significativamente diferentes entre o EHS controle com o EHS submetido aos tratamentos, ambos produzidos com o cultivar BRS-213 (Tabela 10). Em consequência, os valores para sólidos solúveis aumentaram (representados pelos carboidratos, proteínas, lipídios e cinzas).

Para os EHS- BRS-258 houve estabilidade entre os resultados dos tratamentos e o controle para todos os parâmetros da composição química centesimal, com valores não significativos.

Em relação aos resultados obtidos pelos EHS produzidos com o cultivar BRS-258 e EMB.48 observou-se que a irradiação não interferiu na solubilidade da proteína presente nos grãos de soja dos dois cultivares, apresentando valores médios semelhantes entre os tratamentos físicos e o controle, sem diferença significativa. Esses dados discordam de Dogbevi; Vachon; Lacroix (1999) que encontraram em seus resultados aumento da solubilidade da proteína devido à conversão dos grupos aminas em grupos hidrofílicos ao irradiarem o grão de soja do EHS.

Da mesma forma, os tratamentos aplicados não induziram diferença significativa para umidade e carboidratos do EHS- EMB.48. Em contrapartida, houve aumento do teor de lipídios e proteína no EHS com tratamento térmico (80 °C). Contudo, ressalta-se que o processamento hidrotérmico do EHS além de eliminar fatores antinutricionais termolábeis pode provocar ruptura da parede celular do grão de soja liberando a proteína e os lipídios complexados, responsável pelo maior teor de ambos. Entretanto, o tratamento térmico pode provocar também a reação de Maillard e desnaturação protéica pelo excesso de calor (Haythornthwaite, 1986; HEIDENREICH, 1994).

6.2- Análise Bioquímica

Os resultados demonstraram que usar a irradiação, independente da dosagem aplicada aos grãos de soja, induziu a queda da atividade específica da lipoxigenase(Tabelas 11, 12, 13, 16, 17, 22, 23, 24 e 25). A redução da atividade específica de

LOX por irradiação foi reflexo dos mecanismos de ação da radiação gama, que envolveu três processos principais: efeito fotoelétrico, produção de pares e efeito Compton (URBAIN, 1986)..

6.2.1-Atividade específica de LOX em grãos de soja

Os resultados demonstraram que surtiu efeito as diferentes dosagens de irradiação sobre a atividade específica de LOX (Tabelas 11 e 12) nos três cultivares de soja estudados (BRS-213, BRS-258 e EMB.48).

O cultivar BRS-213 (livre de LOX) apresentou atividade de LOX reduzida quando comparado aos outros cultivares controle (BRS-258 e EMB.48) que a partir dos resultados confirmaram a presença da LOX (Tabela 11).

Os tratamentos irradiação (2,5/ 5,0 e 10,0 kGy) induziram a redução de atividade específica de LOX nos cultivares BRS-258 e EMB.48. A relação dosagem-atividade foi inversamente proporcional, já que com o aumento da dosagem de irradiação gama houve queda da atividade específica de LOX. Embora os resultados médios se mostrassem decrescentes a partir do controle para a maior dosagem (10 kGy) não houve diferença significativa entre os valores de atividade do tratamento 2,5 e 5,0 kGy para o cultivar BRS-258 e 5,0 e 10,0 kGy para o cultivar EMB.48.

Tabela 11. Atividade específica de LOX (ηmol mg de proteína min^{-1}) em três cultivares de soja (controle) e em grãos irradiados.

Dosagem (*kGy)	Atividade de LOX		
	Cultivares		
	BRS-213	BRS-258	EMB-48
Controle	0,0125 a	1,6883 c	1,5068 c
2,5	0,0261 b	0,9911 b	0,8565 b
5,0	0,0170 a	0,9613 b	0,4696 a
10,0	0,0234 b	0,3327 a	0,2826 a

Médias seguidas de letras diferentes na coluna indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. *kGy= unidade de dose de irradiação ionizante.

As distintas dosagens de irradiação não interferiram na porcentagem de redução da atividade específica de LOX apresentada pela cultivar BRS-213 (Tabela 12). Entretanto, as maiores porcentagens de redução da atividade foi observada para o tratamento 10 kGy com 79,68 % (BRS-258) e 81,91 % (EMB.48). Contudo, esses resultados confirmaram o que foi relatado por Souza; Neto (2006), que a irradiação pode afetar a proteína do grão de soja, sendo que a LOX perfaz um total de 2 % da mesma (OOMAH *et al.*, 1994). A irradiação é capaz de transformar a estrutura de moléculas, pois a mesma induz ao o efeito Compton que é o principal mecanismo de transferência de energia em alimentos irradiados. Neste processo, um fóton incidente interage com o átomo e transfere sua energia, provocando a expulsão de elétrons. Os elétrons deslocados de seus orbitais contêm energia suficiente para causar excitação e ionização de átomos adjacentes. A radiação penetra profundamente no alimento e, por meios físicos, interage com átomos e moléculas, provocando transformações químicas e biológicas (URBAIN, 1986).

Tabela 12. Porcentagem de redução da atividade específica de LOX do grão de soja submetido a diferentes dosagens de irradiação.

Dosagem (*kGy)	% Redução		
	Cultivares		
	BRS-213	BRS-258	EMB-48
2,5	-	39,47	45,17
5,0	-	41,9	69,94
10,0	-	79,68	81,91

*kGy= unidade de dose de irradiação ionizante.

A inibição da atividade específica de lipoxigenases é importante para indústria alimentícia, já que esta enzima é uma das principais responsáveis pela limitação de alimentos à base de soja (KITAMURA *et al.*, 1983), porém quando se irradiou os grãos ocorreu apenas a redução da atividade específica de LOX (Tabela 12) o que não é o suficiente para eliminar o sabor caracterizado por *beany flavor* (sabor de feijão cru ou verde).

6.2.2- Atividade específica de LOX em EHS (Fase 1)

Na Fase 1, trabalho preliminar, os tratamentos aplicados aos EHS produzidos por diferentes cultivares surtiram efeitos sobre a atividade específica de LOX, que foram apresentadas em forma de resultados médios nas Tabelas 13 a 21. Através dessa fase foram selecionados os tratamentos da fase 2, como explicado no item 5.2 e subitem 6.1.5.

A Tabela 13 apresentou porcentagens de redução próximas a 100% para todos os cultivares (BRS-213. BRS-258 e EMB.48) e independente da variação dos tratamentos térmicos (80, 85 e 90°C).

Tabela 13. Porcentagem de redução da atividade específica de LOX do EHS produzido com três cultivares de soja e submetido a tratamentos físicos e antioxidantes.

Tratamentos		% Redução		
		Cultivares		
		BRS-213	BRS-258	EMB-48
Térmico (°C)	80	98,92	99,94	100,00
	85	31,74	99,91	100,00
	90	87,65	100,00	100,00
Dosagem (*kGy)	2,5	92,05	37,52	19,68
	5,0	19,09	35,37	46,87
	10,0	30,92	39,63	46,00
**Tocoferol (%)	Máx	96,20	49,57	37,42
	Int	69,66	29,29	46,10
	Mín	55,37	37,37	41,00
**TBHQ (%)	Máx	98,95	33,52	41,51
	Int	83,76	36,18	40,60
	Mín	68,61	33,95	50,95

*kGy= unidade de dose de irradiação ionizante.**Tocoferol e **TBHQ (Butil Hidroquinona Terciária) são antioxidantes que possuem limites de quantidades para serem adicionados em EHS (BRASIL, 2000).

Com relação ao tratamento irradiação, a dosagem que mais influenciou na redução da enzima (LOX) foi a de 2,5 kGy (92,05 %) para o cultivar BRS-213, a de 5,0 kGy (46,87 %) para o cultivar BRS-258, e a de 10,0 kGy (39,63 %) para o cultivar EMB.48 (Tabela 13).

Os valores médios obtidos pelos três cultivares para atividade específica de LOX demonstraram que o tratamento térmico é eficiente para inibi-la, sendo que as maiores médias de redução foram obtidas para o EHS-EMB.48 (Tabela 14).

Tabela 14. Atividade específica de LOX (ηmol mg de proteína. min^{-1}) de EHS produzidos com três cultivares e submetido a tratamentos térmicos.

Cultivares	Atividade de LOX		
	Térmico (°C)		
	80	85	90
BRS-213	0,0002 a	0,0167 b	0,0030 a
BRS-258	0,0044 ab	0,0065 b	0,0004 a
EMB48	0,0002 a	0,0002 a	0,0004 a

Médias seguidas de letras diferentes na linha indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Para os EHS-BRS-213 e BRS-258 os tratamentos 80 °C e 90 °C não apresentaram diferença significativa (Tabela 14). Concordando com a Tabela 15 a qual demonstra que independente dos cultivares, os tratamentos 80 °C e 90 °C não foram significativos. Dessa maneira, o tratamento 80 °C foi o selecionado para fase 2, uma vez que o mesmo seria mais economicamente viável para a indústria alimentícia.

Tabela 15. Atividade específica de LOX (ηmol mg de proteína min^{-1}) de EHS a partir das médias obtidas pelos três cultivares, variando apenas as temperaturas.

Temperatura (C°)	Atividade de LOX
80	0,0016 a
85	0,0078 b
90	0,0013 a

Médias seguidas de letras diferentes na coluna indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 16. Atividade específica de LOX (ηmol. mg de proteína. $(min)^{-1}$) de EHS a partir das médias obtidas pelos três cultivares, variando apenas as dosagens de irradiação.

Dosagem (*kGy)	Atividade de LOX
2,5	3,2501
5,0	2,7423
10,0	2,6291

Não significativo. *kGy= unidade de dose de irradiação ionizante.

O aumento das dosagens de irradiação reduziu levemente a atividade específica de LOX dos EHS produzidos com os três cultivares, não ocorrendo diferença significativa entre os resultados (Tabela 16). Entretanto, na Tabela 17 foi observado que o resultado obtido pela dosagem de 2,5 kGy foi diferente dos valores apresentados pelas dosagens 5,0 e 10,0 kGy para o EHS-BRS-213. Como o cultivar BRS-213 é livre de lipoxigenase, foi selecionada a dosagem que reduziu a atividade específica de LOX do EHS-EMB.48, já que não houve diferença significativa entre os tratamentos do EHS produzido com o EHS- BRS-258. Portanto, como não ocorreu diferença entre os resultados dos tratamentos 5,0 e 10,0 kGy para o EHS- EMB.48, fixou-se para fase 2 a dosagem de 5,0 kGy.

Tabela 17**.** Atividade específica de LOX (ηmol mg de proteína min^{-1}) de EHS produzidos com três cultivares submetidos a dosagens distintas de irradiação gama.

Cultivares	Atividade de LOX		
	Dosagem (*kGy)		
	2,5	5,0	10,0
BRS-213	0,0020 a	0,0196 b	0,0164 b
BRS-258	4,0506 a	4,4188 a	4,0589 a
EMB48	5,6982 a	3,7874 b	3,8121 b

Médias seguidas de letras diferentes na linha indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. *kGy= unidade de dose de irradiação ionizante.

Tabela 18. Atividade específica de LOX (ηmol mg de proteína min^{-1}) de EHS produzidos com três cultivares e adição de diferentes quantidades de tocoferol (toc).

Cultivares	Atividade de LOX		
	Quantidades de toc*		
	Máxima	Intermediária	Mínima
BRS-213	0,0009 a	0,0070 b	0,0103 b
BRS-258	3,3922 a	4,6550 b	4,1226 b
EMB48	4,4396 a	3,8977 a	4,3377 a

Médias seguidas de letras diferentes na linha indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. *toc é um antioxidante que possui limite de quantidade para ser adicionado em EHS (BRASIL, 2000).

Não houve diferença significativa entre as quantidades de tocoferol para atividade específica de LOX do EHS- EMB.48 (Tabela 18). Da mesma forma esse efeito foi verificado para o antioxidante TBHQ no EHS- BRS-258 e EMB.48 (Tabela 19). A atividade específica de LOX demonstrou maior redução quando se adicionou ao EHS- BRS-213 e BRS-258 a quantidade máxima de tocoferol (Tabela 18). O mesmo aconteceu para o EHS- BRS-213, porém com a quantidade máxima de TBHQ (Tabela 19). Tais resultados evidenciam que a quantidade máxima foi selecionada para fase 2.

O EHS- BRS-258 tratado com a quantidade máxima de tocoferol (49,57%) e intermediária de TBHQ (36,18%) apresentou máxima redução da LOX. Por outro lado, a maior redução de LOX do EHS- EMB.48 ocorreu quando se adicionou a concentração intermediária de tocoferol (46,10%) e mínima de TBHQ (50,95%) (Tabela 13).

Tabela 19. Atividade específica de LOX (ηmol mg de proteína min^{-1}) de EHS produzidos com três cultivares e adição de diferentes quantidades de TBHQ.

Cultivares	Atividade da LOX		
	Quantidades de TBHQ*		
	Máxima	Intermediária	Mínima
BRS-213	0,0005 a	0,0038 b	0,0073 c
BRS-258	4,4716 a	4,2924 a	4,4430 a
EMB48	4,1494 a	4,2139 a	4,1523 a

Médias seguidas de letras diferentes na linha indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. *TBHQ (Butil Hidroquinona Terciária) é um antioxidante que possui limite de quantidade para ser adicionado em EHS (BRASIL, 2000).

Independente dos cultivares estudados, a variação das quantidades de antioxidantes (Tocoferol e TBHQ) interferiu de maneira semelhante na redução da atividade de LOX, uma vez que os resultados não tiveram diferença significativa (Tabela 20).

Tabela 20. Atividade específica de LOX (ηmol mg de proteína min^{-1}) de EHS a partir das médias obtidas pelos três cultivares, variando o tipo (natural-Toc ou sintético-TBHQ) de antioxidante.

Quantidades de Antioxidantes	Atividade de LOX	
	Toc*	TBHQ*
Máxima	2,6111	2,8742
Intermediária	2,8530	2,8374
Mínima	2,8243	2,8680

Ausência de letras na linha= resultado não significativo. *toc e *TBHQ (Butil Hidroquinona Terciária) são antioxidantes que possuem limites de quantidades para serem adicionados em EHS (BRASIL, 2000).

A partir da Tabela 21 observou-se que o tocoferol reduziu significativamente a atividade específica de LOX quando adicionado ao EHS. Este resultado justificou que o tocoferol teve maiores resultados de redução da atividade da LOX, sendo diferente em função da concentração (Max., int. e min) para EHS-BRS-258, EMB.48 e BRS-258, respectivamente. Enquanto o TBHQ, por outro lado, demonstrou redução da atividade apenas quando adicionado nos EHS-BRS-213 nas quantidades máxima e intermediária.

Portando foi selecionado para Fase 2 o tocoferol sendo adicionado aos EHS na quantidade máxima permitida pela legislação.

Tabela 21. Influência da quantidade de Tocoferol e TBHQ na redução da atividade de lipoxigenase de EHS produzido por três cultivares distintos.

Quantidades	Antioxidantes	Atividade de LOX		
		Cultivares		
		BRS-213	BRS-258	EMB-48
Máximo	Tocoferol*	0,0009 b	**3,3922 a**	**4,4396 a**
	TBHQ**	**0,0005 a**	4,4716 b	**4,1494 a**
Intermediário	Tocoferol	0,0070 b	**4,6550 a**	**3,8977 a**
	TBHQ	**0,0038 a**	**4,2924 a**	4,2139 b
Mínimo	Tocoferol	**0,0103 a**	**4,1226 a**	**4,33777 a**
	TBHQ	**0,0073 a**	4,4430 b	**4,1523 a**

A estatística foi realizada dentro de cada grupo de cor que se refere à quantidade de *Tocoferol e **TBHQ para cada cultivar. Médias seguidas de letras diferentes na coluna indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. *Tocoferol e *TBHQ (Butil Hidroquinona Terciária) são antioxidantes que possuem limites de quantidades para serem adicionados em EHS (BRASIL, 2000).

6.2.3- Atividade específica de LOX em EHS (Fase 2)

A partir dos resultados obtidos na Fase 1, delineou-se os tratamentos que seriam aplicados aos EHS da Fase 2. Seguem nas Tabelas 22 a 24 os resultados obtidos da atividade específica de LOX em EHS produzido com os cultivares BRS-213, BRS-258 e EMB.48 após aplicação de tratamentos físicos + antioxidante. Nas Tabelas 25 e 26 comparou-se os efeitos ocasionados pelos tratamentos físicos da Fase 1 com os tratamentos físicos + antioxidante da Fase 2 sobre a atividade específica de LOX em EHS produzidos com os diferentes cultivares.

A vantagem do tratamento térmico a 80°C foi que além de inibir a LOX (Tabela 22), ocorreu à preservação de características nutricionais do alimento (Tabela 10). Em contrapartida, essa temperatura foi específica para degradar apenas alguns grupos de microorganismos, como os psicrófilos e mesófilos não esporulados, não eliminando os termófilos e formas esporuladas (EVANGELISTA, 2000). Antagonicamente, o tratamento irradiação estende a vida útil em produtos consumidos in natura ou processados, prevenindo problemas fitossanitários por eliminar os insetos e microorganismos (THAKUR; SINGH, 1995).

Tabela 22**.** Porcentagem de redução da atividade específica de LOX do EHS submetido a tratamentos físicos (irradiação e térmico) suplementados com tocoferol (toc).

Cultivares	% Redução	
	Tratamentos físicos + toc	
	5,0 kGy*	80°C
BRS-213	98,7171	99,8676
BRS-258	66,8801	99,996
EMB 48	66,7127	99,999

*kGy= unidade de dose de irradiação ionizante.

A irradiação contribuiu com aproximadamente 67 % da redução da LOX nos EHS-BRS-258 e EMB.48 (Tabela 22) do presente ensaio, o que provavelmente não seria suficiente para manter a qualidade sensorial do EHS, já que os 33 % de LOX restantes poderiam causar a rancificação por hidroperoxidação lipídica (SELL, 1988).

Os EHS submetidos aos tratamentos físicos (Irradiação ou Térmico) + antioxidante apresentaram redução da atividade específica de LOX, sobretudo para o tratamento térmico. O tratamento térmico + tocoferol foi mais eficiente que o tratamento irradiação + tocoferol, inibindo aproximadamente 100% da enzima nos EHS produzidos pelas três cultivares (Tabelas 22 e 23). Todavia, Maia *et al*. (2006) relatou que grãos de soja aquecidos por 7 minutos a 97 °C, atingiu valores de 86 % de inativação máxima.

Tabela 23. Atividade específica de LOX (ηmol mg de proteína min^{-1}) de EHS produzido com três cultivares que foram submetidos a tratamentos: irradiação com tocoferol e térmico com tocoferol (toc).

Tratamentos	Atividade da LOX		
	Cultivares		
	BRS-213	BRS-258	EMB-48
Controle	0,0244 b	6,7349 c	7,2174 c
5,0 kGy* + toc	0,0004 a	2,2156 b	2,3570 b
80 °C + toc	0,0000 a	0,0003 a	0,0001 a

Médias seguidas de letras diferentes na coluna indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. *kGy= unidade de dose de irradiação ionizante.

A Tabela 23 demonstrou que ocorreu diferença significativa entre os tratamentos e o controle para os EHS- BRS-258 e EMB.48. Para estes, os resultados confirmaram que houve queda da atividade específica de LOX quando comparou os tratamentos entre si e o controle. Já para o EHS- BRS-213 foi observado que os tratamentos não diferiram significativamente, havendo apenas diferença dos tratamentos com o controle.

Independente dos tratamentos, o EHS-BRS-213 manteve a atividade específica da LOX reduzida, o que já era esperado, considerando-se que esse cultivar selecionado não expressa o gene da LOX. Assim, o uso desse cultivar foi útil como referência para observar as possíveis quedas ou inibição das atividades da enzima nos cultivares que apresentaram a LOX (Tabelas 23 a 26).

Houve diferença significativa da atividade específica de LOX entre os EHS obtidos pelos diferentes cultivares tratados a 80°C + tocoferol. Entretanto o tratamento irradiação + tocoferol apenas diferiu o EHS- BRS-213 em relação aos EHS- BRS-258 e EMB.48, o que era previsível já que o cultivar BRS-213 é livre naturalmente de LOX (Tabela 24).

Tabela 24. Comparação da atividade específica de LOX (ηmol mg de proteína min^{-1}) entre os EHS produzidos com três cultivares que foram submetidos a tratamentos: irradiação com tocoferol e térmico com tocoferol (toc).

Cultivares	Atividade de LOX	
	Tratamentos	
	5,0 kGy* + toc	80°C + toc
BRS-213	0,0004 a	0,0000 a
BRS-258	2,2156 b	0,0003 c
Emb. 48	2,3570b	0,0001 b

Médias seguidas de letras diferentes na coluna indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. *kGy= unidade de dose de irradiação ionizante.

Em todos os cultivares houve maior redução da atividade específica de LOX quando se adicionou o tocoferol nos EHS produzidos por grãos irradiados. Para as cultivares que apresentaram a LOX (BRS-258 e EMB.48) foram demonstrados valores médios que diferiram significativamente quando se comparou o EHS controle com os EHS tratados e os tratamentos entre si (Tabela 25).

Tabela 25. Atividade específica de LOX (ηmol mg de proteína min^{-1}) de EHS produzido com três cultivares que foram submetidos ao tratamento irradiação e irradiação com tocoferol (toc).

Tratamentos	Atividade da LOX		
	Cultivares		
	BRS-213	BRS-258	EMB-48
Controle	0,0244 b	6,7349 c	7,2174 c
5,0 kGy*	0,0196 b	4,4188 b	3,7874 b
5,0 kGy+ toc	0,0004 a	2,2156 a	2,3570 a

Médias seguidas de letras diferentes na coluna indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. *kGy= unidade de dose de irradiação ionizante.

O tratamento 5,0 kGy (Fase 1) reduziu a atividade específica de LOX em 35,37 % para o EHS- BRS-258 e 46,87 % para o EHS- EMB.48 (Tabela 13). Entretanto ao se adicionar tocoferol aos EHS produzidos por grão irradiados a 5,0 kGy ocorreu uma redução da atividade de aproximadamente 67% para ambas cultivares (Tabela 22). A diferença entre o tratamento 5,0 kGy com o tratamento 5,0 kGy + tocoferol conferiu ao EHS um aumento de 31,51 pontos percentuais para o cultivar BRS-258 e 19,84 pontos percentuais para o cultivar EMB.48 de redução da atividade específica de LOX.

Adicionar o tocoferol ao EHS contribuiu na redução da atividade de LOX (Tabela 25). Tal observação pode ser justificada pela literatura a qual relatou que a bioatividade dos compostos fenólicos (tocoferol) pode estar relacionada com o potencial antioxidante, aos quais são atribuídas características como quelar metais, inibir a lipoxigenase e seqüestrar radicais livres (SCHUBERT, 1999). A função do tocoferol como antioxidante é a de doar seus átomos de hidrogênio fenólicos aos radicais livres lipídicos, interrompendo a propagação em cadeia (RAMALHO; JORGE, 2006).

Por outro lado, Lea e Ward citados por Warner *et al*.(2003) sugerem que a atividade antioxidante relativa dos tocoferóis depende de vários parâmetros, incluindo temperatura, composição e forma da gordura (líquida, emulsão) e concentração utilizada.

Os resultados presentes na Tabela 26 confirmam que o tratamento térmico foi capaz de inativar a LOX, independente da adição de tocoferol, uma vez que os resultados não diferiram significativamente entre os tratamentos.

Tabela 26. Atividade específica de LOX (nmol mg de proteína min^{-1}) de EHS produzido por três cultivares que foram submetidos ao tratamento térmico e térmico com tocoferol (toc).

Tratamentos	Atividade da LOX		
	Cultivares		
	BRS-213	BRS-258	EMB-48
Controle	0,0244 b	6,7349 b	7,2174 b
80 °C	0,0002 a	0,0044 a	0,0002 a
80°C + toc*	0,0000 a	0,0003 a	0,0001 a

Médias seguidas de letras diferentes na coluna indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

7- CONCLUSÃO

1. Concluiu-se que os tratamentos aplicados, independente da cultivar de soja, não alteraram a composição química centesimal dos grãos nem e dos EHS.

2. Todos os tratamentos influenciaram na redução da atividade especifica de LOX, porém o tratamento térmico (fase1) e térmico + tocoferol (fase2) foram capazes de inibir 100% da atividade da LOX.

3. A variação de dosagem de irradiação não contribuiu com a solubilidade da proteína presente no grão de soja, pelo contrário, foi o único tratamento que demonstrou menores teores de proteína quando comparado ao controle e aos outros tratamentos.

4. Em suma, pode-se concluir que somar o antioxidante (tocoferol) ao tratamento irradiação influenciou na maior redução da atividade específica de LOX ao se comparar com o tratamento irradiação da fase 1 para os EHS produzidos com os três cultivares.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-TARBOUSH, H. M. Irradiation inactivation of some antinutritional factors in plant seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 46, n. 7, p. 2698-2702, 1998.

AGUIAR, C. L. Isoflavonas de soja e propriedades biológicas. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos,** Curitiba, v. 20, n. 2, p. 323-334, jul./dez. 2002.

AMARAL, A. Alimentação racional. In: MIYASAKA, S.; MEDINA, J. C. (Ed.). **A soja no Brasil**. Campinas: ITAL, 1981. p. 832-839.

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official methods of the association of the agricultural chemists**. 15. ed. Washington, DC, 1990. v. 2.

ARAÚJO, J. M. A.; CARLOS, J. C. S.; SEDYAMA, C. S. Isoflavonas em grãos de soja: importância da atividade de β-glicosidase na formação do sabor amargo e adstringente. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 17, n. 2, p. 137-141, 1997.

ATWATER, W. O.; WOODS, C. D. **The chemical composition of american food materials**. Washington, DC: USDA, 1896. (Bulletin, 28).

AXELROD, B.; CHEESBROUGH, T. M.; LAAKSO, S. Lipoxygenase from soybeans. **Methods in Enzymology**, New York, v. 71, p. 441-451, 1981.

BAILEY, A. E. **Bailey's industrial oil and fat products.** 5th. ed. New York: John Wiley, 1996. v. 3.

BARROS, J. G. A. et al. Efeito do inibidor de protease kunitz sobre níveis de lipoxigenases em sementes de soja. **Ciência e Agrotecnologia,** Lavras, v. 32, n. 4, p. 1126-1132, jul./ago. 2008.

BERSET, C.; CUVELIER, M. E. Methods of estimating the degree of lipid oxidation and of measuring antioxidizing power. **Sciences des Aliments**, Cachan, v. 16, p. 219-245, 1996.

BEHRENS, J. H. **Aceitação, atitude e expectativa do consumidor em relação a uma nova bebida fermentada a base de extrato hidrossolúvel de soja (*Glycine max LMerril*).** 2002. 157 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos)-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

BERTO, M. I.; SILVEIRA JUNIOR, V.; VITALI, A. A. Mathematical models for the prediction of rheological parameters of Brazilian concentrated orange juice. **Journal of Food Science and Technology**, New Delhi, v. 40, n. 4, p. 366-370, 2003.

BLEINROTH, E. W. Recomendações para armazenamento. **Toda Fruta**, São Caetano do Sul, v. 1, n. 5, p. 34-37, 1986.

BOTTERWECK, A. A. M. et al. Intake of butilated hydroxyanisole and butilated hydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the Netherlands cohort study. **Food and Chemical Toxicology,** Oxford, v. 38, p. 599, 2000.

BOWLES, S.; DEMIATE, I. M. Caracterização físico-química de okara e aplicação em pães do tipo francês. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos,** Campinas, v. 26, n. 3, p.652-659, jul./set. 2006**.**

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

BRASIL. Ministério da Educação. Secretaria de Educação Básica. Alimentação saudável e sustentável. Brasília, DF: Universidade de Brasília. 2007. 92 p. Disponível em: <http://portal.mec.gov.br/seb/arquivos/pdf/profunc/alimet_saud.pdf>. Acesso em: 20 jan. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução CNNPA n. 14, de junho de 1978. Estabelece o padrão de identidade e qualidade para farinha desengordurada de soja, proteína texturizada de soja, proteína concentrada de soja, proteína isolada de soja e extrato de soja. Disponível em: <http://elegis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=15426&word=>. Acesso em: 02 mar. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n. 18, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos, constante do anexo desta portaria. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=109>. Acesso em: 20 mar. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Aprova o Regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados, tornando

obrigatoria a rotulagem nutricional. Resolução-RDC n. 360, de 23 de dezembro de 2003. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 26 de dezembro 2003. Disponível em: <http://elegis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=9059&word=RotulagemNutricinaldeAlimentosEmbalados>. Acesso em: 17 fev. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 268, de 22 de setembro de 2005. Regulamento Técnico para Produtos Protéicos de Origem Vegetal. Diário Oficial da União, Brasília, 2005b. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=18827&word=>. Acesso em: 16 jan. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos.** 4. ed. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2005a. 1018 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Temperatura e higiene garantem segurança dos alimentos. Notícias da Anvisa. Brasília, DF, 14 de outubro de 2009. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2009/141009.htm>. Acesso em: 24 out. 2011.

BRAZACA, S. G. C. Antinutricionais em alimentos. In: OETTERER, M. (Coord.). **Palestras apresentadas na disciplina de Processamento e Qualidade Nutricional dos Alimentos**. Piracicaba: ESALQ/ USP, 1997. 20 p.

BUZINARO, E. F.; ALMEIDA, R. N. A.; MAZETO, G. M. F. S. Biodisponibilidade de cálcio dietético. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, São Paulo, v. 50, n. 5, p. 852-860, out. 2006.

BYUN, M. W.; KANG, IL-JUN. Effect of gamma irradiation on soya bean proteins. **Journal of the Science and Food and Agriculture**, Sussex, v. 66, n. 1, p. 55-60, 1994.

BYUN, M. W.; KANG, IL-JUN. Properties of soya milk and tofu prepared with gamma irradiated soya beans. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Sussex, v. 67, n. 4, p. 477-483, 1995.

BYUN, M. W.; KANG, IL-JUN; MORI, T. Effect of gamma-irradiation on the water soluble components of soybeans. **Radiation Physics and Chemistry**, Oxford, v. 47, n. 1, p. 155-160, 1996.

CAI, T. D. et al. Comparison of bench and production scale methods for making soymilk and tofu from 13 soybean varieties. **Food Research International**, Barking, v. 30, n. 9, p. 659-668, 1997.

CAI, T. D.; CHANG, K. C. Characteristics of production-scale tofu as affected by soymilk coagulation method: propeller blade size, mixing time and coagulant concentration. **Food Research International**, Barking, v. 31, n. 4, p. 289-295, 1998.

CÂMARA, G. M. S. Ecofisiologia da cultura da soja. In: SIMPÓSIO SOBRE CULTURA E PRODUTIVIDADE DA SOJA, 1., Piracicaba, 1991. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 1992. p. 129-142.

CÂMARA, G. M. S. **Soja:** tecnologia de produção. Piracicaba: Publique, 1998. 293 p.

CARUSO, R. **Soja**: uma caminhada sem fim: como a soja conquistou o mundo e o Brasil. São Paulo: Fundação Cargill, 1997. 95 p.

CASÉ, F. et al. Produção de 'leite' de soja enriquecido com cálcio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos,** Campinas, v. 25, n. 1, p. 86-91, 2005.

CIABOTTI. S. et al. Avaliações químicas e bioquímicas dos grãos, extratos e tofus de soja comum e de soja livre de lipoxigenase. **Ciências e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 5, p. 920-929, set./out. 2006.

CHANG, Y. K. Alimentos funcionais e aplicação tecnológica: Padaria da Saúde e Centro de Pesquisas em Tecnologia de Extrusão. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE OS BENEFÍCIOS DA SOJA PARA A SAÚDE HUMANA, 1., 2001, Londrina. **Anais...** Londrina: Embrapa-Soja, 2001.

CHIARELLO, M. D. Soja e os alimentos funcionais. In: ENCONTRO FRANCO BRASILEIRO DE BIOCIÊNCIA E BIOTECNOLOGIA: Alimentos Funcionais e Nutracêuticos, 2002, Brasília, DF, 2002. **Resumos das Palestras...** Brasília, DF: EMBRAPA, 2002. p. 7-9.

CHOE, E.; MIN, D. B. Mechanisms of antioxidants in the oxidation of foods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Chicago, v. 8, p. 345-358, 2009.

CIÉSLA, K.; ROOS, Y.; GLUSZEWSKI, W. Denaturation processes in gamma irradiated proteins studied by differential scanning calorimetry. **Radiation Physics and Chemistry**, Oxford, v. 58, n. 3, p. 233-243, 2000.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira 2011/2012. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_05_10_08_49_52_boletim_maio_2012.pdf>. Acesso em: 05 de maio de 2012.

COODETEC. Soja e Saúde. São Paulo, 2008. Disponível em: <www.coodetec.com.br>. Acesso em: 05 jan. 2010.

COSGROVE, J. P.; CHURCH, D. F.; PRYOR, W. A. The kinetics of autoxidation of polyunsaturated fatty acids. **Lipids,** Champaign, v. 22, n. 5, p. 299-304, 1987.

COSTA, J. A. **Cultura da soja.** Porto Alegre: Evangraf, 1996. 233 p.

COSTA, E. A. **Manual de nutrientes**: prevenção de doenças através dos alimentos e suas composições químicas. 2. ed. Petrópolis: Vozes, 2002. cap. 1. p. 13-175.

CRUCES-BLANCO, C. et al. The use of dansyl chloride in the spectrofluorimetric determination of the synthetic antioxidant butylated hydroxyanisole in foodstuffs. **Talanta**, Amsterdam, v. 50, n. 5, p. 1099-1108, 1999.

DAMODARAM, S. Functional properties. In: NAKAI, S.; MODLER, H. W. (Ed). **Food proteins properties and characterization**. New York: Marcel Dekker, 1996. 544 p.

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

DELINCÉE, H.; VILLAVICENCIO, A. L. C. H.; MANCINI-FILHO, J. Protein quality of irradiated Brazilian beans. **Radiation Physics and Chemistry**, Oxford, v. 52, n. 1/6, p. 43-47, 1998.

DEPARTAMENTO DE PESQUISAS E ESTUDOS ECONÔMICOS. **Soja.** Disponível em: <http://www.economiaemdia.com.br/static_files/EconomiaEmDia/Arquivos/infset_soja.pdf>. Acesso em: 01 fev. 2012.

DHINGRA, S.; JOOD, S. Organoleptic and nutritional evaluation of wheat breads supplemented with soybean and barley flour. **Food Chemistry,** Barking, v. 77, n. 4, p. 479-488, 2001.

DOGBEVI, M. K.; VACHON, C.; LACROIX, M. Physicochemical properties of dry red kidney bean proteins and natural microflora as effected by gamma irradiation. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 24, n. 3, p. 54-542, 1999.

DOGBEVI, M. K.; VACHON, C.; LACROIX, M. Effect of gamma irradiation on the microbiological quality and the functional properties of protein in dry red kidney beans (*Phaseolus vulgaris*). **Radiation Physics and Chemistry**, Oxford, v. 57, n. 3-6, p. 265-268, 2000.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method form determination of sugars and related substaces. **Nature**, London, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

EMBRAPA. Consumo diário de soja pode garantir saúde e vida longa. Londrina: EMBRAPA Soja, 2004a. Disponível em: <http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2002/junho/bn.2004-11-25.2513155615/ >. Acesso em: 28 mar. 2012.

EMBRAPA. Tecnologias de produção de soja: região Central do Brasil 2004: exigências climáticas. Londrina: EMBRAPA Soja, 2004b. (Sistema de produção, n. 1). Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/producaosoja/exigencias.htm>. Acesso em: 05 fev. 2012.

EMBRAPA. Importância dos fitoestrógenos, presentes na soja, para a saúde humana. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2006. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/recursos/Queiroz_Nogueira_Scramin_importanciaID-5nX98pWTxk.pdf> Acesso em: 22 jul 2012.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia dos alimentos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2000.

FARO, Z. P.; ARDITO, E.; BORGO, L. A. **Qualidade em alimentos II**: conservação e processamento de alimentos. Brasília, DF: UNB - Centro de Excelência em Turismo, 2002.

FARAG, M. D. E H. The nutritional value for chicks of full-fast soybeans irradiated at up to 60 kGy. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 73, p. 319-328, 1998.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **6 millones de bocas**. Roma: FAO, 1963.

FELBERG, I. et al. Bebida mista de extrato de soja integral e castanha-do-Brasil: caracterização físico química, nutricional e aceitabilidade do consumidor. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 15, n. 2, p. 163-174, 2004.

FELIX, M. A. **Análise química e sensorial dos grãos de soja (*Glycine max* (L.) Merril) tostados por diferentes tratamentos**. 2005. 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)-Escola Superior da Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

FIGUEIREDO, C. V.; JUNQUEIRA, A. C. A.; CUNHA, H. T. Avaliação das temperaturas de armazenamento de produtos perecíveis em açougues e supermercados de Três Corações, MG. Revista Ciência e Saúde Coletiva, Brasília, DF, v. 8, n. 1-2, 2003. Suplemento.

GÓES, J. A. W. Condições de conservação de alimentos armazenados por refrigeração na cidade de Salvador, Bahia. **Revista Higiene Alimentar,** São Paulo, v. 18, n. 125, p. 41-43, 2004.

GROLICHOVÁ, M.; DVORAK, P.; MUSILOVA, H. Employing ionizing radiation to enhance food safety: a review. **Acta Veterinaria Brunensis**, Bratislava, v. 73, n. 1, p. 143-149, 2004.

GUEREIRO, L. **Dossiê da soja:** produto da soja. Rio de Janeiro: Redetec, 2006. 25 p.

HALL, C. W. **Drying farm crops**. Westport: The Avi, 1971. 336 p.

HALLIWELL, B. et al. Free Radicals and antioxidants in food and in vivo: what they do and how they work**. Critical Reviews in Food Science and Nutrition,** Philadelphia, v. 35, p. 7-20, 1995.

HAYES, J. E. et al. The effect of lutein, sesamol, ellagic acid and olive leaf extract on lipid oxidation and oxymyoglobin oxidation in bovine and porcine muscle model systems. **Meat Science,** Barking, v. 83, p. 201-208, 2009.

HAYTHORNTHWAITE, A. **Extrusion:** as a toll for improved nutritional vallue of feeds. Reading: Creative Press, 1986. 4p.

HEANEY, R. P.; RAFFERTY, K. The settling problem in calcium-fortified soybean drinks. **Journal of the American Dietetic Association**, Chicago, v. 106, n. 11, p. 1753, 2006.

HEIDENREICH, E. Operation strategies for expansion cooking. **Feed Mix**, Doetinchen, v. 2, p. 32-34, 1994.

HILDEBRAND, D. F.; HYMOWITZ, T. Two genotypes lacking lipoxygenase-1. **Journal of American Oil Chemistry,** New York, v. 49, p. 583-586, 1981.

IRRADIAÇÃO dos alimentos. Consultoria e Assessoria Radiologia. Nós e as radiações. Informativo CRTR06. Disponível em: <http://www.nuclear.radiologia.nom.br/diversos/esterili.htm> Acesso em: 10 ago. 2011.

IYER, V. et al. Quick-cooking beans (*Phaseolus Vulgaris L.*) I. Investigations on quality. **Qualitas Plantarum:** Plant Foods for Human Nutrition, The Hague, v. 30, n. 1, p. 27-43, 1980.

JACKSON, C. J. C. Effects of processing on the content and composition of isoflavones during manufacturing of soy beverage and tofu. **Process Biochemistry**, London, v. 37, p. 1117-1123, 2001.

JOLY, A. B. **Botânica:** introdução à taxonomia vegetal. 13. ed. São Paulo: Nacional, 2002. 777 p.

KAYA, A. Rheology of mulberry pekmez. **Journal of Texture Studies**, Hoboken, v. 32, p. 335-342, 2001.

KITAMURA, K. et al. Genetic analysis of a nullallele for lipoxygenase-3 in soybean seeds. **Crop Science,** Madison, v. 23, p. 924-927, 1983.

KUBOW, S. Lipid oxidation products in food and atherogenesis. **Nutrition Reviews,** New York, v. 51, n. 2, p. 33-40, 1993.

KYLE, E. et al. Genistein-induced apoptosis of prostate cancer cells is preceded by a specific decrease in focal adhesion kinase. **Molecular Pharmacology,** New York, v. 51, p. 193-200, 1997.

LACROIX, M. et al. Use of gamma irradiation to produce films from whey, casein and soya proteins: structure and functionals characteristics. **Radiation Physics and Chemistry**, Oxford, v. 63, n. 3-6, p. 827-832, 2002.

LEHNINGER, A. L. Proteínas. In: _____. **Princípios de bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 1998. p. 105.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 1995. 839 p.

LIM, B. T. et al. Yield and quality of tofu as affected by soybean and soymilk characteristics: calcium sulfat coagulant. **Journal of Food Science,** Chicago, v. 55, n. 4, p. 1088-1092, 1990.

LIMA, C. R. **Manual prático de controle de qualidade em supermercados**. São Paulo: Varela, 2001.

LIU, K. **Soybeans**. Gaithersburg: Aspen Publishers, 1999. 532 p.

LOPES, C. G. A soja na alimentação. Juiz de Fora: Acessa.com, 2003. Disponível em: <http://www.jfservice.com.br/viver/arquivo/nutricao/2003/02/07-soja/>. Acesso em: 27 fev. 2012.

MADHAVI, D. L.; SALUNKHE, D. K. **Antioxidants**. In: MAGA, J.; TU, A. T. (Ed.). New York: Marcel Dekker, 1995. p. 89.

MAIA, M. J. L. **Qualidade e rendimento do "leite" de soja da unidade de produção de derivados da soja.** 2005. 59 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.

MAIA, M. J. L.; ROSSI, E. A.; CARVALHO, M. R. B. Qualidade e rendimento do leite de soja da unidade de produção de derivados de soja - UNISOJA - FCF - Ar/ UNESP. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 17, n. 1, p. 65-72, 2006.

MALAVAOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação de estado nutricional de plantas**. Piracicaba: Potafos, 1989. 201 p.

MANDARINO, J. M. G. A soja e a saúde humana. In: ENCONTRO FRANCO BRASILEIRO DE BIOCIÊNCIA E BIOTECNOLOGIA: ALIMENTOS FUNCIONAIS E NUTRACÊUTICOS, 2002, Brasília, DF. **Resumos das Palestras...** Brasília. DF, 2002. p. 9-11.

MARQUES, L. G**. Liofilização de frutas tropicais.** 2008. 293 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos)-Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2008.

MCMINDES, M. K. Applications of isolated soy protein in low-fat meat products. **Food Technology,** Chicago, v. 45, n. 12, p. 61-64, 1991.

MELLO FILHO, O. L. et al. Grain yield and seed quality of soybean selected for high protein content. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 39, n. 5, p. 445-450. 2004.

MENDES, W. S. et al. Composição química e valor nutricional da soja crua e submetida a diferentes processamentos térmicos para suínos em crescimento. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 56, n. 2, p. 207-2013, 2004.

MERRILL, A. L.; WATT, B. K. **Energy value of foods:** basis and derivation, revised. Washington, DC: USDA, 1973. (Bulletin, 74).

MINITAB® 16 STATISTICAL SOFTWARE, 2010.

MISSÃO, M. R. Soja: origem, classificação, utilização e uma visão abrangente do mercado. **Management**: Revista de Ciências Empresariais, Maringá, v. 3, n. 1, p. 7-15, jan./jun. 2006.

MIYASAKA, S.; MEDINA, J. C. **A soja no Brasil.** Campinas: ITAL, 1981. 1062 p.

MONTEIRO, M. R. P.; MARTINO, H. S. D. Avaliação nutricional e sensorial do extrato hidrossolúvel de soja. **Revista Mineira de Enfermagem,** Belo Horizonte, v. 10, n. 2, p. 113-117, abr./jun. 2006.

MORAES, R. et al. Caracterização bioquímica de linhagens de soja com alto teor de proteína. **Pesquisa Agropecuária Brasileira,** Brasília, DF, v. 41, n. 5, p. 725-729, 2006.

MORAIS, A. A. C. Usos da soja em medicina. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE OS BENEFÍCIOS DA SOJA PARA A SAÚDE HUMANA, 1., 2001, Londrina. **Anais...** Londrina: Embrapa-Soja, 2001.

MORAIS, A. A. C.; SILVA, A. L. **Soja:** suas aplicações. Rio de Janeiro: MEDSI, 1996. 259 p.

MORETTO, E.; FETT, R. **Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos**. São Paulo: Varela, 1998. 150 p.

MUKAI, K. et al. Kinetic study of reactions between tocopheroxyl radicals and fatty acids. **Lipids,** Champaign, v. 28, p. 753-756, 1993.

NAMIKI, M. Antioxidants/antimutagens in food. **Journal of Nutrition**, Boca Raton, v. 29, n. 4, p. 273-300, 1990.

NELSON, N. A. Photometria adaptation of somogyi method for determination of glicose. **Journal Biological Chemistry**. Baltimore, v. 31, n. 2, p. 159-161, 1944.

NIELSEN, A. C. Retail highlights: o que você precisa saber sobre o varejo. 2006. Disponível em: <http://br.nielsen.com/pubs/documents/Retail_Highlights2006Novembro.doc>. Acesso em: 17 maio 2011.

OLIVEIRA, J. E. D. de. Valor da soja como alimento. In: MIYASAKA, S.; MEDINA, J.C. (Ed.). **A soja no Brasil**. Campinas: ITAL, 1981. p. 820-823.

OLIVEIRA, J. E. D. et al. The nutritive value of soy milk in malnourish children: a comparative study. **Journal of Pediatrics**, Saint Louis, v. 69, p. 670-675, 1996.

OOMAH, B. D.; VOLDENG, H.; FREGEAU-REID, J. A. Characterization of soybean proteins by HPLC. **Plants Foods for Human Nutrition**, New York, v. 45, n. 3, p. 251-263, 1994.

OSTHOFF, G. et al. Characterization of a spray-dried soymilk powder and changes observed during storage. **Food Science and Technology International,** London, v. 2, p. 169-178, 2010.

O'TOOLE, D. K. Characteristics and use of Okara, the soybean residue from soymilk production: a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 47, n. 2, p. 363-371, 1999.

PAPEL da soja como matéria-prima. Blog da terra, Botucatu, jan. 2010. Disponível em: <http://blogdaterra.com.br/2009/05/22/aumenta-o-papel-da-soja-como-materia-prima/>. Acesso em: 27 jan. 2010.

PIFFER, L. Análise paramétrica de um gaseificador de resíduos de madeira. Disponível em: <http://ucsnews.ucs.br/ccet/deme/emsoares/inipes/gasequi.html>. Acesso em: 26 set. 2011.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.

RAO, V. S.; VAKIL, V. K. Effects of gamma irradiation on flatulence-causing oligosaccharides in green grown (*Phaseolus aureus*). **Journal of Food Science**, Chicago, v. 48, n. 6, p. 1791-1795, 1983.

REZENDE, P. M. et al. Efeito da semeadura a seco e tratamento de sementes na emergência, rendimento de grãos e outras características da soja (*Glycine max* (L.) Merrill). **Ciência e Agrotecnologia,** Lavras, v. 27, n. 1, p. 76-83, 2003.

RODRIGUES, R. S.; MORETTI, R. H. Caracterização físico-química de bebida protéica elaborada com extrato de soja e polpa de pêssegos. **B. CEPPA**, Curitiba v. 26, n. 1, p. 101-110 jan./jun. 2008.

RODRIGUES, P. B.; ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; GOMES, P. C.; NUNES, R. V.; TOLEDO, R. S. Valores energéticos da soja e subprodutos da soja, determinados com frangos de corte e galos adultos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 31, n. 4, p. 1771-1782, 2002.

RONSEIN, G. E. et al. Oxidação de proteínas por oxigênio singlete: mecanismos de dano, estratégias para detecção e implicações biológicas. **Química Nova,** São Paulo, v. 29, n. 3, p. 563-568, May/June 2006.

ROSSET, M. **Distribuição de ácido fítico e minerais durante o processamento de extrato hidrossolúvel de soja e tofu.** 2007. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos)-Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

SANTOS, R. C. O valor energético dos alimentos: exemplo de uma determinação experimental, usando calorimetria de combustão. **Química Nova,** São Paulo, v. 33, n. 1, p. 220-224, 2010.

SARRUGE, J. R. R.; HAAG, H. P. **Análise química em plantas**. Piracicaba: ESALQ/ USP, 1974. 56 p.

SCHUBERT, S. Y.; LANSKY, E. P.; NEEMAN, I. Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate oil and fermented juice flavonoids. **Journal of Ethnopharmacology,** Lausanne, v. 66, n. 1, p. 11-17, 1999.

SELL, A. M. **Técnicas imunoquímicas na análise genética das lipoxigenases LOX-1 e LOX-2 em soja**. 1988. 65 f. Dissertação (Mestrado em Genética)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1988.

SETCHELL, K. D. R. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology and implications for human health of soy isoflavones. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 68, n. 6, p.1333S-1346S, 1998.

SHEN, C. F. et al. Yield and quality of tofu as affected by soybean and soymilk characteristics: glucono-delta-lactone coagulant. **Journal of Food Science,** Chicago, v. 56, n. 1, p. 109-112, 1991.

SILVA, D. J. **Análise de alimentos**: métodos químicos e biológicos. 2. ed. Viçosa, MG: Ed. UFV, 1990. 165 p.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 94-103, 1999.

SILVA, M. S. et al. Composição química e valor protéico do resíduo de soja em relação ao grão de soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos,** Campinas, v. 26, n. 3, p. 571-576, 2006.

SILVA, M. R.; SILVA, M. A. A. P. Fatores antinutricionais: inibidores de proteases e lectinas. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 13, n. 1, p. 3-9, jan./abr. 2000.

SIDDHURAJU, P.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. The effect of ionizing radiation on antinutriticonal factor and nutricional value of plant material with reference to human and animal food. **Food Chemistry**, Barking, v. 78, p. 187-205, 2002.

SIMIC, M. G.; JAVANOVIC, S. V. Inactivation of oxygen radicals by dietary phenolic compounds in anticarcinogenesis. In: HO, C. T. et al. (Ed.). **Food phytochemicals for cancer prevention.** Washington, DC: Barnes & Noble, 1994, p. 20.

SOARES, L. M. V.; SHISHIDO, K.; MORAES, A. M. M.; MOREIRA, V. A. Composição mineral de sucos concentrados de frutas brasileiras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos,** Campinas, v. 24, n. 2, p. 202-206, 2004.

SOUZA, A. S.; NETTO, F. M. Influência da irradiação e do armazenamento nas características estruturais da proteína de soja. **Brazilian Journal Food Technology**, Campinas, III JIPCA, p. 36-43, jan. 2006.

SOUZA, G.; VALLE, J. L. E.; MORENO, I. Efeitos dos componentes da soja e seus derivados na alimentação humana. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 34, n. 2, p. 61-69, jul./dez. 2000.

SOYATECH. Soybean trading in Brazil breaks record with 65% of the crop negotiated, 2007. Disponível em: <http://www.soyatech.com/news_php?=2310>. Acesso em: 19 abr. 2012.

SUN, N.; BREENE, W. M. Calcium sulfate concentration influence on yield and quality of tofu from five soybean varieties. **Journal of Food Science,** Chicago, v. 56, n. 6, p. 1604-1607, 1991.

TACO. **Tabela brasileira de composição de alimentos.** 4. ed. Campinas: NEPA-UNICAMP, 2011. 161 p.

TANGO, J. S. et al. Caracterização de alguns cultivares de soja para produção de extrato protéico. **Boletim Informativo ITAL**, Campinas, v. 21, n. 2, p. 157-182, 1984.

TASHIMA E. H.; CARDELLO, H. M. A. B. Perfil sensorial de extrato hidrossolúvel de soja (G*lycine max* L. Merril) comercial adoçado com sacarose e com sucralose**. Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 21, n. 2, jul./dez. 2003.

TEIXEIRA, C. G. A soja na alimentação humana. Disponível em: <http://www.vegetarianismo.com.br/soja1.html>. Acesso em: 20 ago de 2011.

THAKUR, B. R.; SINGH, R. K. Food irradiation: chemistry and applications. **Food Reviews International**, New York, v. 10, n. 4, p. 437-473, 1994.

THAKUR, B. R.; SINGH, R. K. Combination processes in food irradiation. **Trends in Food Science and Technology**, Oxford, v. 6, n. 1, p. 7-11, 1995.

TOLEDO, T. C. F. et al. Composição, digestibilidade protéica e desaminação em cultivares brasileiras dde soja submetidas a radiação gama. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 2, p. 812-815, 2007.

TRADECOS. **Toda la fruta**, 2005. Disponível em: <http:/ / www.tradecos.com.ar>. Acesso em: 22 abr. 2012.

TRUCOM, C. **Soja:** nutrição e saúde: com receitas práticas e saborosas. São Paulo: Alaúde, 2005. 136 p.

TSAI, S. J.; LAN, C. Y.; KAO, C. S.; CHEN, S. C. Studies on the yield and quality characteristics of tofu. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 6, p. 734-740, 1981.

URBAIN, W. M. (Ed.). **Food irradiation.** Food science and technology. Florida: Academic Press, 1986. 351 p. (Serie monographs).

VARYAR, P. S; LIMAYE, A.; SHARMA, A. Radiation: induced enhancement of antioxidant contents of soybean (*Glycine max Merril*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 52, n. 11, p. 3385-3388, 2004.

VLIEGENTHART, J. F. G.; VELDINK, G. A.; BOLDINGH, J. Recent progress in the study on the mechanism of action of soybean lipoxygenase**. Journal of Agricultural and Food Chemistry**,Washington, DC, v. 27, n. 3, p. 623-626, 1979.

WANG, S. H. et al. Efeito da proporção soja:água e aquecimento sobre rendimento e qualidade protéica do leite de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 32, n. 10, p. 1-10, 1997.

WANG, C.; MA, Q.; PAGADALA, S.; SHERRARD, M. S.; KRISHNAN, P.G. Changes of isoflavones during processing of soy protein isolates. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 75, n. 3, p. 337-341, 1998.

WARNER, K.; NEFF, W. E.; ELLER, F. J. Enhancing quality and oxidative stability of aged fried food with g-tocopherol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 51, p. 623, 2003.

WILSON, R. F. Seed metabolism. In: WILCOX, J. R. **Soybeans:** improvement, production and uses. 2. ed. Madison: Academic Press, 1987. cap.16, p. 643-683.

YIM, D. K. Soja: um arsenal milenar aliado à saúde. In: ENCONTRO FRANCO BRASILEIRO DE BIOCIÊNCIA E BIOTECNOLOGIA: ALIMENTOS FUNCIONAIS E NUTRACÊUTICOS. **Resumo das Palestras...** Brasília, DF: EMBRAPA, p. 12-13, 2002.

YUYAMA, M. M.; HENNING, A. A. Avaliação de Thiabendazole e Thiram no controle dos principais fitopatógenos em sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes,** Brasília, DF, v. 19, n. 2, p. 266-269, 1997.

ZHAO, Y.; MARTIN, B. R.; WEAVER, C. M. Calcium bioavailability of calcium carbonate fortified soymilk is equivalent to cow's milk in young women. **Journal of Nutrition,** Bethesda, v. 135, n. 11, p. 2379-2382, 2005.