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

Efeito do déficit hídrico em características químicas e bioquímicas da soja e na degradação da clorofila, com ênfase na formação de metabólitos incolores

Daniela Borrmann

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Prof[a]. Dr[a]. Ursula Maria Lanfer Marquez

São Paulo
Junho de 2009

Daniela Borrmann

Efeito do déficit hídrico em características químicas e bioquímicas da soja e na degradação da clorofila, com ênfase na formação de metabólitos incolores

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

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

_____
1°. examinador

_____
2°. examinador

_____
3°. examinador

_____
4°. examinador

São Paulo, _____ de _____.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	I
LISTA DE FIGURAS	III
RESUMO	V
ABSTRACT	VII
1 INTRODUÇÃO	**1**
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	**4**
2.1 Soja	**4**
2.1.1 Produção e utilização	*4*
2.1.2 Características da planta e da semente	*7*
2.1.3 Estádios de maturação das sementes	*8*
2.1.4 Sistemas de classificação	*11*
2.1.5 Ocorrência de déficit hídrico	*14*
2.2 Clorofila	**16**
2.2.1 Propriedades físicas e químicas da clorofila	*16*
2.2.2 A clorofila no ciclo de vida da planta	*20*
2.2.3 Análise de clorofilas e seus derivados	*27*
2.3 Ocorrência de sementes oleaginosas com alto teor de clorofila	**27**
2.4 Degradação da clorofila durante o armazenamento e processamento de vegetais	**30**
2.5 Degradação da clorofila durante a secagem e estocagem da soja	**32**
2.6 Óleos de soja provenientes de grãos verdes	**36**
3 OBJETIVOS	**38**

4 MATERIAL E MÉTODOS **40**
4.1 Soja que sofreu déficit hídrico **40**
4.1.1 Amostras de soja *40*
4.1.2 Massa de 100 sementes *40*
4.1.3 Análises químicas e bioquímicas *41*
4.1.3.1 Determinação da umidade *41*
4.1.3.2 Atividade de água *41*
4.1.3.3 Determinação de proteínas *42*
4.1.3.4 Determinação de lipídeos *42*
4.1.3.5 Extração do óleo *43*
4.1.3.6 Índice de acidez *43*
4.1.3.7 Índice de peróxidos *43*
4.1.3.9 Medida da atividade da lipoxigenase 1 *44*
4.1.3.10 Quantificação de clorofila por espectrofotometria *45*
4.1.3.11 Extração e análise das clorofilas e derivados esverdeados por HPLC *45*
4.1.3.12 Extração e análise dos derivados incolores da clorofila por HPLC *48*
4.2 Soja cultivada em condições normais de irrigação **50**
4.2.1 Amostragem *50*
4.2.2 Análises químicas e bioquímicas *52*
4.2.2.1 Determinação de umidade, atividade de água e proteínas *52*
4.2.2.2 Quantificação de clorofila a *e* b *por espectrofotometria* *52*
4.2.2.3 Extração das clorofilas e derivados esverdeados e análise por HPLC *53*
4.2.2.4 Extração e análise de derivados incolores de clorofila por HPLC *56*
4.3 Tratamento estatístico dos dados **57**

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO **58**
5.1 Soja que sofreu déficit hídrico **58**
5.1.1 Classificação dos grãos pela CEAGESP *58*
5.1.2 Presença de pigmentos verdes *60*
5.1.3 Atividade da lipoxigenase 1 *64*
5.1.4 Análise de acidez e peróxidos *66*

5.1.5 Análise de proteínas, lipídeos, atividade de água e umidade *66*
5.1.6 Análise de compostos incolores da degradação da clorofila *69*
5.2 Soja cultivada em condições normais de irrigação **71**
5.2.1 Umidade e atividade de água *71*
5.2.2 Teor de proteínas *73*
5.2.3 Teores de clorofila analisados por espectrofotometria *74*
5.2.4 Análise da concentração de clorofila e derivados verdes por HPLC *75*
5.2.5 Análise de derivados incolores da clorofila por HPLC *85*

6 CONCLUSÕES **91**
6.1 Soja que sofreu déficit hídrico **91**
6.2 Soja cultivada em condições normais de irrigação **91**

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **93**

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1 Descrição dos estádios vegetativos e reprodutivos de soja propostos por Fehr & Caviness (1977) 10

Tabela 2 Padrões de qualidade para a comercialização de soja segundo a Instrução Normativa nº 11 de 15 de maio de 2007 12

Tabela 3 Datas de colheita das amostras de soja IAC-18 51

Tabela 4 Pigmentos investigados nas amostras de sementes de soja 55

Tabela 5 Classificação das amostras de soja prejudicada por déficit hídrico, pela CEAGESP, conforme a portaria 262 do Ministério da Agricultura, de 23 de Novembro de 1983 59

Tabela 6 Peso de 100 sementes de soja prejudicada por déficit hídrico comparado com um controle de soja que cresceu em condições normais 60

Tabela 7 Quantidade de clorofila na soja prejudicada por déficit hídrico, após colheita e após armazenamento 61

Tabela 8 Comparação da atividade da lipoxigenase em soja prejudicada por déficit hídrico, depois da colheita e depois de 20 meses de armazenamento 65

Tabela 9 Acidez em % medida nas amostras após a colheita e após 20 e 30 meses de armazenamento a temperatura ambiente 66

Tabela 10 Teores de proteínas, lipídeos e atividade de água na soja recém-colhida, prejudicada pelo déficit hídrico 67

Tabela 11 Umidade das amostras de soja após a colheita e após 20 meses de armazenamento 68

Tabela 12 Umidade e atividade de água das amostras de soja IAC-18 71

Tabela 13 Umidade e atividade de água nas amostras de soja IAC-18, após serem submetidos à secagem a 40 e 60 °C 72

Tabela 14 Teor protéico nas amostras de soja IAC-18, em base seca 73

Tabela 15 Concentrações, equações e coeficientes de regressão dos padrões utilizados 77

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1 Estrutura dos cloroplastos 17

Figura 2 Espectro de absorbância de clorofila *a* e clorofila *b* 18

Figura 3 Estrutura molecular das clorofilas 19

Figura 4 Esquema da biossíntese de clorofila 20

Figura 5 Degradação da clorofila em folhas senescentes 24

Figura 6 Degradação química da clorofila 31

Figura 7 Gradiente de eluição para a análise de clorofilas e derivados esverdeados por HPLC 47

Figura 8 Gradiente de eluição para a análise de HPLC de compostos incolores da clorofila 49

Figura 9 Volume de chuva e temperaturas na região Palmital de outubro 2004 a março 2005 64

Figura 10 Análise de derivados incolores por HPLC, de soja prejudicada por déficit hídrico 70

Figura 11 Teores de clorofila durante a maturação das sementes de soja IAC-18 fresca e influência da secagem pós-colheita a 40 e 60°C, medidos por espectrofotometria. 74

Figura 12 Cromatograma representativo da análise por HPLC de extrato de soja colhida 101 dias após a semeadura e seca a 60°C 76

Figura 13 Espectros de absorção visível obtido para clorofila *a*, clorofila *b*, feofitina *a* e feofitina *b* 78

Figura 14 Curvas padrão dos pigmentos clorofila *a*, clorofila *b*, feofitina *a* e feofitina *b* 79

Figura 15 Teores de clorofilas e de umidade de soja IAC-18 durante o período de maturação, medidos por HPLC 80

Figura 16 Teores de clorofilas e feofitinas em soja IAC-18, seca a 40°C, medidos por HPLC 83

Figura 17 Teores de clorofilas e feofitinas em soja IAC-18, seca a 60°C, medidos por HPLC 84

Figura 18 Cromatogramas de HPLC dos extratos de NCC das seis amostras de soja IAC-18 frescas e colhidas entre os estádios R_6 e R_8 de maturação, gravados em 320 nm 86

Figura 19 Espectros de absorção UV/Vis dos NCC gravados durante a análise de HPLC dos extratos de soja IAC-18 88

Figura 20 Áreas médias sob a curva das frações identificadas como NCC durante a maturação natural da soja IAC-18 89

RESUMO

O Brasil é o segundo maior produtor e exportador de soja (*Glycine max* L. Merrill) no mundo. A produção é altamente dependente de fatores climáticos, incluindo a temperatura e quantidade de chuva. A soja cultivada no sul do país em 2005 sofreu déficit hídrico causado por temperaturas altas acompanhado por umidade baixa durante o estádio reprodutivo. Pouco se sabe sobre a influência do déficit hídrico na degradação da clorofila e na qualidade dos grãos em geral. Nesse trabalho foram analisadas, numa primeira etapa, as características químicas e bioquímicas de cinco amostras de soja, provenientes de três cultivares que cresceram sob déficit hídrico e que não atendiam aos padrões para comercialização por conter altas quantidades de sementes verdes. Os grãos foram analisados quanto a diversos parâmetros físico-químicos e bioquímicos incluindo a análise dos pigmentos verdes imediatamente após a colheita e após 20 meses de armazenamento. A acidez foi medida adicionalmente após 30 meses de armazenamento. A atividade de água e umidade foram 0,6-0,7 e 8,7 %-11,9 %, respectivamente, e não mudaram durante a estocagem, mas houve um aumento em acidez o que indica atividade de lipases. A atividade da lipoxigenase 1 foi significativamente prejudicada. Imediatamente após a colheita os pigmentos verdes correspondiam a feofitina *a*, feofitina *b* e pequenas quantidades de clorofila *a* e *b*, e traços de outros derivados da clorofila, em ordem decrescente. Após 20 meses de estocagem quase todos os pigmentos haviam desaparecido. O déficit hídrico provavelmente aumentou a permeabilidade das membranas, o que levou a um aumento do pH e promoveu a transformação das clorofilas para feofitinas.

Na segunda etapa do trabalho foi estudado o estágio avançado da degradação natural da clorofila na qual desaparece a coloração esverdeada dos grãos. Esta etapa corresponde à formação de catabólitos incolores (NCC), mas existem controvérsias se essas substâncias são os produtos finais da degradação. Assim, foram investigadas a formação e degradação dos NCC durante a maturação da soja e o efeito do tratamento térmico pós-colheita. A soja foi colhida em seis estádios de maturação e a formação dos NCC foi analisada por HPLC após secagem dos grãos a 40 e 60°C. Todas as amostras contiveram frações com um máximo de absorbância a 320 nm, considerado típico para os NCC. Os teores aumentaram até o 114º dia após a semeadura e decresceram significativamente em estádios mais avançados de maturação. Nas amostras secas a 40 e 60°C os teores de NCC foram menores, devido a níveis iniciais de clorofila inferiores. Esses resultados indicam que os NCC em soja provavelmente não sejam os produtos finais da degradação da clorofila. A sua redução em estádios mais avançados de maturação indica a sua metabolização para outras substâncias.

Palavras-chave: Soja (*Glycine max* L. Merrill). Qualidade dos grãos. Condições climáticas. Secagem pós-colheita. Derivados incolores da clorofila.

ABSTRACT

Influence of drought stress on chemical and biochemical characteristics of soybean and on chlorophyll degradation, with focus on the formation of non-coloured chlorophyll catabolites

Brazil is the second largest soybean (*Glycine max* L. Merrill) producer and exporter in the world. The production depends on climatic factors, like temperature and rain volume. Soybeans cultivated in the south of the country in 2005 suffered drought stress imposed by adverse high ambient temperature, accompanied by low humidity during the reproductive stage. Little information is available regarding drought stress on quality of grains. In this study, firstly, chemical and biochemical characteristics of five soybean samples belonging to three cultivars grown under drought stress and did not meet standards for marketing due to high amounts of green seeds, were evaluated. Grains were analyzed for several physicochemical ad biochemical parameters, including analysis of pigment contents, immediately after harvest and after 20 months of storage at room temperature. Acidity was measured additionally after 30 month of storage. Water activity and humidity were 0.6 - 0.7 and 8.7 % - 11.9 %, respectively, and did not change during storage time, but there was an increase in acidity, which alludes to lipase activity. The activity of lipoxygenase 1 was significantly prejudiced. Immediately after harvest, green pigments corresponded mainly to pheophytin *a*, followed by pheophytin *b*, small quantities of chlorophyll *b* and chlorophyll *a* and traces of other chlorophyll derivatives. After 20 months of storage almost all green pigments had

disappeared. Drought stress probably enhanced membrane permeability, which led to a lower pH and promoted transformation of chlorophylls to pheophytins.

In the second part of the study, the advanced stage of natural chlorophyll degradation was investigated, in which the green colour of the seeds disappears. This stage corresponds to the formation of non-coloured chlorophyll catabolites (NCC), but there are controversies if those are the final products. Thus, the formation and degradation of NCC during soybean (*Glycine max* L. Merrill) maturation and two post-harvest drying temperatures was investigated. Soybean was harvested at six maturation stages and the formation of NCC was analyzed by HPLC after drying at 40°C and 60°C. All samples contained fractions with an absorption maximum at 320 nm, which are considered typical for NCC. The amounts of NCC increased until 114 days after plantation, and were significantly lower in advanced maturation stages. In samples dried at 40°C and 60°C, NCC amounts were lower, due to inferior initial chlorophyll levels. These results indicate that the NCC in soybeans might not be the final products of chlorophyll degradation. Their reduction in advanced maturation stages may be due to further metabolization.

Keywords: Soybean (*Glycine max* L. Merrill). Seed quality. Climate conditions. Post-harvest drying. Non-coloured chlorophyll catabolites.

1 – INTRODUÇÃO

A soja é um dos produtos agrícolas mais importantes no mundo, e atrás dos Estados Unidos da América, o Brasil é o segundo maior produtor. Na história da agricultura no país o maior declínio da produção de soja comercial aconteceu no sul do Brasil em 2004/2005, em decorrência de condições climáticas anormais. Naquele ano as temperaturas altas e a redução de precipitação prejudicaram o desenvolvimento e resultou em qualidade inferior das sementes, o que conseqüentemente reduziu o seu valor comercial. Além da redução de safra, uma parte significante dos grãos manteve a cor verde até após a colheita e secagem (BRASIL, CONAB, 2008). A legislação brasileira permite 8 % de grãos esverdeados, mas a safra de 2004/2005 do sul do país, região Palmital, não atendia à legislação com grande prejuízo para os produtores (BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2007). A legislação dos Estados Unidos da América é ainda mais exigente, permitindo apenas 1 % de grãos verdes na soja, de modo que aquela soja também não podia ser exportada (MANGOS & BERGER, 1997).

A cor verde, entre outros motivos, pode ser resultado da presença de clorofilas e seus derivados esverdeados. A maioria desses pigmentos é lipossolúvel e por isso os pigmentos verdes são extraídos juntamente com o óleo, resultando em coloração escura do óleo. Na presença de clorofilas, a vida de prateleira do óleo e a eficiência dos catalisadores usados na hidrogenação são reduzidas, levando à necessidade de remover os pigmentos no processo de refino do óleo, elevando assim significativamente os custos de produção (TAUTORUS & LOW, 1993).

Em circunstâncias normais de maturação no campo, a clorofila é naturalmente degradada para derivados incolores (HEATON & MARANGONI, 1996). No entanto, fatores ambientais durante a maturação podem influenciar a degradação. Temperaturas altas, a falta de precipitação e também colheita antecipada seguida de secagem a temperaturas acima de 40ºC retardam ou até impedem a degradação da clorofila (GOMES *et al*, 2003).

Enquanto o mecanismo de degradação da clorofila, bem como a influência das condições de maturação e secagem da soja na retenção de pigmentos verdes já são bem estudados, até agora não há estudos publicados sobre as características físico-químicas de soja que sofreu déficit hídrico. Na primeira parte deste trabalho foram avaliados os efeitos do déficit hídrico sobre vários parâmetros relacionados com a qualidade dos grãos, antes e após o armazenamento.

Foi observado que soja submetida à secagem pós-colheita para reduzir a umidade pode resultar em bloqueio parcial da degradação natural. Nesse caso, a degradação da clorofila parece ocorrer via reações químicas, frente à inativação parcial ou total das enzimas. A feofitinização parece ser o processo predominante, resultando da desorganização das membranas celulares em pH ácido, e levando à transformação de clorofilas em feofitinas.

Na segunda parte do trabalho procurou-se aprofundar o conhecimento acerca dos catabólitos incolores (NCC) que são considerados os produtos finais da degradação da clorofila. Alguns autores afirmam que estes NCC são armazenados nos vacúolos da célula (OBERHUBER *et al.*, 2003; KRÄUTLER, 2002). No entanto, esse acúmulo ainda é discutido, desde que foram encontrados compostos com estruturas tetra- e

monopírrólicas, que indicam a degradação dos NCC. Foi sugerido que os NCC podem servir como precursores de substâncias cruciais para a germinação da semente (KRÄUTLER, 2003). Neste trabalho foi estudada a formação e degradação dos NCC em soja durante o processo de maturação e secagem.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Soja

2.1.1 Produção e utilização

O cultivo da soja é de grande importância para a alimentação mundial, tanto no mercado oriental, que sempre possuiu essa leguminosa como hábito alimentar, como também na civilização ocidental, com números de produção sempre crescendo. Além da proteína, a soja é a matéria prima mais importante do mundo para a produção de óleo comestível. Os principais países produtores são os Estados Unidos da América e o Brasil, cujas produções na safra de 2007/2008 foram de 72,9 e 60,0 milhões de toneladas, respectivamente. Em comparação, a produção no Brasil em 1999 foi de apenas 32,0 milhões de toneladas (BRASIL, SECEX, 2001). Os maiores produtores de soja no Brasil são os estados do Mato Grosso e Paraná com produções de 17,8 e 11,9 milhões de toneladas em 2007/2008 (EMBRAPA, 2009). Em 2008, 39,1 milhões de toneladas de soja, que correspondem a 65,2 % da produção total, foram exportados, valendo uma soma de 18 milhões de US$. Esse valor é distribuído por soja em grãos, farelo de soja e óleo de soja, que participam com 24,5, 12,3 e 2,3 milhões de toneladas da exportação total, respectivamente (ABIOVE, 2009). A produção e exportação de soja no Brasil vêm crescendo constantemente há muitos anos. Por exemplo, o volume de exportação de soja e derivados pelo Brasil em 1998 foi de apenas 21,1 milhões de toneladas, incluindo grão, farelo e óleo.

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

A partir da entrada do século 20, a soja tornou-se altamente popular e tem sido alvo de muitas pesquisas, tanto devido às qualidades nutricionais e funcionais, como pela sua versatilidade na produção de diversos alimentos e ingredientes. Alimentos à base de soja são uma categoria crescente na indústria de alimentos, com uma diversidade de produtos que vão desde os tradicionais, até os ingredientes protéicos de soja e produtos alternativos de leite e carne, ou produtos enriquecidos com proteína de soja (GOLBITZ, 2000). Eles podem ser divididos em seis grandes grupos: alimentos contendo óleo de soja, alimentos tradicionais da população oriental (tofu, kinako, natto, shoyu), produtos protéicos (concentrados e isolados), alimentos da nova geração (sorvetes, iogurtes, queijos, hambúrgueres, substitutos de gordura, molhos e balas feitos à base de soja), alimentos enriquecidos com soja (pães, massas alimentícios, cereais, snacks) e ingredientes funcionais ou suplementos de dietas (lecitina, oligossacarídeos,

isoflavonas, tocoferóis, fitosteróis, fitatos, inibidores de tripsina). O interesse na soja alcançou um progresso significativo desde que o Departamento de Controle de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos da América (FDA – Food and Drug Administration) aprovou em 1999 uma alegação de saúde para a proteína da soja, de modo que a ingestão de 25 gramas desta proteína por dia ajuda a reduzir o risco de doenças cardíacas (FDA, 1999; PSZCZOLA, 1999).

No Brasil, a Resolução nº 19, de 30 de abril de 1999 regulamenta os procedimentos para o registro de alimentos com alegação de propriedades funcionais ou de saúde em sua rotulagem (BRASIL, 2008). Em 11 de janeiro de 2005, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou uma atualização e aprovou a seguinte alegação para a proteína de soja: *"O consumo diário de no mínimo 25 g de proteína de soja pode ajudar a reduzir o colesterol. Seu consumo deve estar associado a uma dieta equilibrada e hábitos de vida saudáveis"* (ANVISA, 2009).

A soja é um bom alimento tanto pelo lado econômico como pelo lado agrícola. Ela tem características agronômicas favoráveis, incluindo boa capacidade de adaptação a uma ampla variedade de solos e climas e a habilidade em fixar nitrogênio da atmosfera, em simbiose com bactérias, o que torna a soja uma cultura de rotação com outras culturas que necessitam de altas concentrações de nitrogênio, como o milho e o arroz. Além disso, a soja possui uma composição química que a destaca de outras oleaginosas. Em média, a soja contém 40,5 % de proteína e 22,1 % de lipídeos (TABELA BRASILEIRA DE COMPOSIÇÃO DE ALIMENTOS da USP), o que a torna a cultura entre as leguminosas com o maior teor protéico e o segundo maior teor de gordura, superado somente pelo amendoim que possui 48 % de lipídeos. Essa característica faz da

soja um alimento altamente nutritivo. As proteínas e os lipídeos da soja, além de serem uma fonte de energia, também têm valor qualitativo. O óleo de soja contém uma alta proporção de ácidos graxos insaturados, das séries Ω-3 e Ω-6, tais como ácido linoléico e linolênico. A proteína da soja contém todos os aminoácidos essenciais, e muitos deles estão presentes em quantidades similares às requeridas por humanos e animais, exceto os sulfurados. Além disso, ela possui índice de digestibilidade protéica semelhante ao das proteínas do ovo e da caseína (JOINT FAO/WHO, 1990). A soja também contém diversas outras substâncias, em menor quantidade, conhecidas como fitoquímicos, que têm sido correlacionadas nos últimos anos com benefícios únicos à saúde (LIU, 2000; MESSINA, 1999). Portanto, a soja apresenta versatilidade na sua utilização, incluindo alimentação humana, animal e uso como alimento funcional.

2.1.2 Características da planta e da semente

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

A soja apresenta diversas exigências bioclimáticas: térmicas, hídricas e fotoperiódicas. A cultura adapta-se bem entre 20 e 30°C, mas seu maior desenvolvimento ocorre quando a temperatura do ar está em torno de 30°C. A sua floração é induzida a partir dos 13°C, porém, o principal fator de indução do florescimento é a redução no fotoperíodo. As cultivares desenvolvidas para as regiões

norte, nordeste e centro-oeste do Brasil são mais sensíveis à temperatura do que as cultivares desenvolvidas para o sul e sudeste, que são mais sensíveis ao fotoperíodo. O ciclo da soja dura de 110 a 160 dias, de acordo com as condições locais e a variedade (CARUSO, 1997; CENKOWSKI & JAYAS, 1993; CENKOWSKI *et al.*, 1989[a]). No Brasil, as cultivares mais utilizadas têm um ciclo de 122 a 137 dias (EMBRAPA, 2009).

Com relação às exigências hídricas, índices pluviométricos durante o ciclo da cultura entre 700 e 1000 mm, regularmente distribuídos durante as fases vegetativa e reprodutiva, são suficientes para um desenvolvimento satisfatório e bom rendimento da cultura. Precipitações pluviométricas freqüentes ou prolongadas durante o período de pré-colheita, alternadas com períodos secos, fazem com que a semente, ainda no campo, sofra constantes alterações no seu teor de umidade, acelerando os processos de deterioração, prejudicando o enchimento de grãos, ou então inibindo a degradação da clorofila.

2.1.3 Estádios de maturação das sementes

A comparação dos resultados de pesquisas em soja, referente ao crescimento e desenvolvimento da planta e do grão, especialmente de diferentes áreas geográficas, exige um conhecimento exato dos estádios de desenvolvimento das plantas. Estes estádios foram descritos no passado por definições e termos imprecisos, muitas vezes conhecidos apenas pelo agricultor. Atualmente, a adoção de sistemas de classificação facilitou a descrição e classificação das fases de desenvolvimento da planta de soja. FEHR & CAVINESS (1977) estabeleceram uma escala de estádios de desenvolvimento

da soja, visando a contribuir para a uniformização da comunicação entre pesquisadores, produtores e demais pessoas envolvidas em atividades agrícolas. Os autores propuseram um sistema que introduziu a diferenciação entre os estádios de maturação vegetativos e reprodutivos da planta (***Tabela 1***). Os autores basearam-se no caule principal e no número de nós produzido durante a fase vegetativa. Os estádios vegetativos, referentes ao período pré-florescimento, foram caracterizados com a letra "V". Consideram como primeiro nó aquele das folhas uni-foliadas. O período vegetativo é completado com o início do florescimento aos 40 a 70 dias após a emergência das plantas dependendo do cultivar, da época de semeadura, das condições climáticas e da região (MARCOS FILHO, 1986). Os estádios reprodutivos foram identificados com a letra "R", acompanhada de um número. O período reprodutivo compreende a floração, o desenvolvimento de legumes, o enchimento dos grãos e a maturação (MIYASAKA & MEDINA, 1981). Não há uma transição definida entre os períodos de florescimento e de frutificação, que se inicia em média 10 a 15 dias após o início do florescimento.

As taxas de crescimento das vagens e de acúmulo de matéria seca pelas sementes são relativamente lentas, até 25 a 30 dias após o início do florescimento (R_5). A partir deste momento a maturação torna-se mais rápida, as vagens e sementes vão perdendo a coloração verde e assumindo a coloração amarela.

A maturidade fisiológica, que ocorre aos 40 a 70 dias após o início da frutificação, tem sido caracterizada pelo maior peso da matéria seca dos grãos. Nesse momento os grãos assumem coloração amarela, mas apresentam ainda um teor de umidade de aproximadamente 28-30 % (TECKRONY *et al.*, 1987; MARCOS FILHO, 1986).

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

Descrição dos estádios vegetativos		
Estádio	*Subtítulo*	*Descrição*
$\mathbf{V_E}$	Emergência	Cotilédones acima da superfície do solo
$\mathbf{V_C}$	Estádio cotiledonar	Folhas unifoliadas com as margens não mais se tocando
$\mathbf{V_1}$	Primeiro nó	Folhas unifoliadas desenvolvidas
$\mathbf{V_2}$	Segundo nó	Folhas trifoliadas desenvolvidas no nó acima das folhas unifoliadas
$\mathbf{V_3}$	Terceiro nó	Três nós do caule com folhas desenvolvidas, começando com o nó das folhas unifoliadas
$\mathbf{V_n}$	"n" nó	"n" número de nós no caule com folhas unifoliadas

Descrição dos estádios reprodutivos		
Estádio	*Subtítulo*	*Descrição*
$\mathbf{R_1}$	Início do florescimento	Uma flor aberta em qualquer nó do caule
$\mathbf{R_2}$	Florescimento	Flores nos quatro últimos nós do caule com folhas desenvolvidas
$\mathbf{R_3}$	Início da frutificação	Um legume com cinco milímetros em um dos quatro últimos nós do caule, com folhas desenvolvidas
$\mathbf{R_4}$	Vagem desenvolvida	Um legume com dois centímetros em um dos quatro últimos nós do caule, com folhas desenvolvidas
$\mathbf{R_5}$	Início de formação dos grãos	Grãos com três milímetros em um legume dos quatro últimos nós do caule, com folhas desenvolvidas
$\mathbf{R_6}$	Grãos desenvolvidos	Legume contendo ao menos um grão verde que ocupa toda a sua cavidade em um dos últimos nós do caule, com folha desenvolvida
$\mathbf{R_7}$	Maturação fisiológica	Um legume normal que atingiu a cor de legume maduro
$\mathbf{R_8}$	Ponto de colheita	95 % dos legumes atingiram a cor de legume maduro

A partir do momento de maior peso de matéria seca, os grãos começam a perder gradualmente a água até atingir o estádio final de maturação (R_8), quando a soja é colhida. Neste estádio 95 % dos legumes atingirem coloração marrom. Essa degradação da clorofila pode ser inibida em períodos chuvosos que levam à antecipação da colheita, que implica em uma maturação incompleta dos grãos (CERQUEIRA & POPINIGIS, 1981). As condições climáticas e fatores ambientais afetam a qualidade da semente de soja, principalmente a partir da fase de maturação fisiológica. É recomendado que a colheita ocorra quando a umidade do grão chegue a 12-14 %.

2.1.4 Sistemas de classificação

No comércio internacional existem vários sistemas de classificação de grãos oleaginosas, visando controlar a produção e estabelecer padrões de comercialização, levando em consideração as diversas finalidades da matéria-prima. De acordo com PRITCHARD (1983), cerca de 80 % do mercado internacional de óleos e gorduras é controlado pelo FOSFA (Federation of Oils and Fats Associations). Para promover as relações de comercialização de soja entre produtores e compradores, tanto nos mercados nacionais como nos internacionais, cada país desenvolveu suas normas quanto aos procedimentos de padronização, classificação e comercialização de soja. Em geral, os parâmetros para a classificação são similares e baseiam-se em fatores físicos e subjetivos, tais como defeitos dos grãos, cor e teor de umidade. Esses parâmetros são aceitos internacionalmente como critérios para exportação (LIU, 2000; PRITCHARD, 1983).

Nos Estados Unidos da América os padrões para classificação e comercialização de grãos de soja são estabelecidos pelo USDA (United States Department of Agriculture). Existem quatro níveis de classificação, sendo que para grãos de primeira qualidade, os limites máximos permitidos de grãos quebrados, impurezas e/ou matérias estranhas, grãos avariados e grãos de outras cores (não amarelo) são 10 %, 1 %, 2 % e 1 %, respectivamente (USDA, US STANDARDS FOR SOYBEANS, 2008).

No Brasil, os padrões de qualidade para a comercialização de soja foram estabelecidos em 1983 e vigoraram sem qualquer alteração até 2007. Apenas recentemente as antigas leis foram revogadas e foram estabelecidos novos padrões pela INSTRUÇÃO NORMATIVA nº 11 de 15 de maio de 2007, aproximando-se um pouco da legislação internacional (BRASIL, MINISTÉRIO DE AGRICULTURA, 2007). A nova forma de classificação divide os grãos em dois grupos, conforme a sua utilização. O grupo I refere-se a grãos destinados ao consumo *in natura* e tem limites de tolerância mais rigorosos, sendo dividido ainda em dois subgrupos, 1 e 2. O grupo II refere-se à soja destinada para outros usos, especialmente a extração de óleo. Os parâmetros de tolerância deste grupo estão apresentados na ***tabela 2***.

Tabela 2: Padrões de qualidade em % para a comercialização de soja do grupo II, segundo a Instrução Normativa nº 11 do Ministério da Agricultura, de 15 de maio de 2007.

Tipo	Avariados				Esverdeados	Partidos Quebrados e Amassados	Matérias Estranhas e Impurezas
	Total de Ardidos e Queimados	Máximos de Queimados	Mofados	Total(1)			
Padrão Básico	4,0	1,0	6,0	8,0	8,0	30,0	1,0

(1) A soma de queimados, ardidos, mofados, fermentados, germinados, danificados, imaturos e chochos.

O teor de umidade não é incluso nas tabelas de classificação, mas continua com um limite de 14 %, que representa um valor máximo para armazenamento seguro.

A incidência de grãos verdes na soja é muito comum em países tropicais como o Brasil, em que as condições climáticas são caracterizadas por altas temperaturas associadas a grandes variações nos índices pluviométricos e elevada umidade relativa do ar (SINNECKER *et al.*, 2002). As altas temperaturas durante a maturação das sementes levam a um déficit hídrico, ou seja, as plantas perdem água muito rapidamente o que pode resultar na retenção da cor verde. Outra condição que propicia a retenção da clorofila e manutenção da cor verde é um período de chuva na época de colheita que obriga o agricultor a antecipar a colheita dos grãos antes do estado de maturação comercial para evitar grandes perdas (SINNECKER *et al.*, 2005). Principalmente na região sul do Brasil, onde ocorrem muitas chuvas perto da época de colheita, é comum recorrer colheitas prematuras, o que aumenta a ocorrência de retenção da clorofila nas sementes. A presença de grãos verdes eleva os custos de refinação para a produção de óleos de soja, como já mencionado anteriormente.

Nos Estados Unidos da America e no Canadá a incidência de grãos verdes é observada na canola e a intensidade da cor verde ou o número de grãos verdes são usados como parâmetros de controle de qualidade. No Canadá, segundo CENKOWSKI & JAYAS (1993), o teor máximo de clorofila permitido para sementes de canola de primeira qualidade é 22 mg/kg (base seca). Na Suécia, desde 1970 o preço da canola depende também do teor de clorofila no óleo, e sementes de primeira qualidade correspondem a um óleo com um teor máximo de 30 mg/kg de clorofila total (MOUNTS *et al.*, 1990, DAHLÉN, 1973).

Embora no Brasil a concentração de clorofila nos grãos de soja ainda não seja um parâmetro de qualidade exigido pela legislação, o controle do teor deste pigmento torna-se cada vez mais importante, frente à freqüência com que ocorre este defeito. Mudanças nas práticas agrícolas e o estabelecimento de parâmetros de colheita para garantir homogeneidade e qualidade na produção de soja tornaram-se necessários.

2.1.5 Ocorrência de déficit hídrico no campo

A temperatura e a disponibilidade de água no solo influenciam diretamente o desenvolvimento da soja no campo. Em condições climáticas desfavoráveis, com altas temperaturas e falta de precipitação, o desenvolvimento das sementes de soja é retardado ou em extremo caso, até inibido. A quantidade de água disponível no solo para as plantas está diretamente ligada à quantidade e distribuição das chuvas e à capacidade do solo de reter a água. O déficit hídrico é definido como falta de água acessível à planta, o que resulta em modificações fisiológicas, químicas e bioquímicas da planta e de suas sementes.

O efeito do déficit hídrico depende da época de ocorrência e de sua severidade. Em geral, a perda de água altera a tensão física e o potencial osmótico das células. Isso provoca alterações na membrana celular e em vários de seus componentes, assim como na concentração celular de metabólitos. Alterações na conformação da membrana celular provocam mudanças em canais de transporte ativados por pressão, modificam a conformação de proteínas e alteram a continuidade entre a parede e a membrana celular (SHINOZAKI & YAMAGUCHI-SHINOZAKI 1997; HARE *et al.*, 1996). Estas

modificações ativam complexos enzimáticos, que iniciam uma cascata de eventos moleculares que levam a respostas fisiológicas, metabólicas e de desenvolvimento (BRAY, 1993). As rotas de transmissão dos sinais moleculares de percepção do estresse em plantas foram propostas de serem semelhantes às da maioria dos seres vivos (SHINOZAKI & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 1996).

As respostas da planta ao déficit hídrico geralmente resultam em grãos de tamanho e peso menores do que em condições climáticas favoráveis, porém, a capacidade de germinação não é afetada. A partir de experimentos com sementes produzidas sob déficit hídrico e semeadas, concluiu-se que o tamanho da semente não interfere na altura da planta, quantidade de vagens nas plantas ou produtividade da cultura, nem na massa e no tamanho das sementes colhidas (LIMA & CARMONA, 1999).

Em soja que sofre déficit hídrico durante a fase de enchimento dos grãos, os grãos são reduzidos em tamanho e peso (NOGUEIRA & NAGAI, 1988). Porém, é importante ressaltar que grãos pequenos não necessariamente são resultados de déficit hídrico, mas sim, que existem variedades que naturalmente produzem grãos menores. Uma resposta comum ao déficit hídrico é a retenção da cor verde nos grãos. A falta de água prejudica a atividade das enzimas responsáveis pela degradação da clorofila, o que resulta em alto teor de grãos verdes (ADAMS, 1983).

2.2 Clorofila

2.2.1 Propriedades físicas e químicas da clorofila

A clorofila é o pigmento mais abundante na natureza cujo principal papel é a absorção da luz solar e sua conversão para energia química durante a fotossíntese, processo este fundamental para toda vida terrestre. A fotossíntese abrange dois sistemas, as reações luminosas, que ocorrem apenas quando as plantas estão iluminadas, e as reações de fixação de carbono, que ocorrem tanto na luz quanto na escuridão. Nas reações luminosas, a clorofila e outros pigmentos das células fotossintetizantes absorvem a energia luminosa e a conservam na forma química de dois produtos ricos em energia, o ATP e o NADPH. Simultaneamente, é produzido o O_2. Nas reações de fixação de carbono, o ATP e o NADPH são utilizados para reduzir o CO_2 para formar glicose e outros compostos orgânicos.

Nas plantas superiores, a clorofila é localizada em pequenas organelas subcelulares, os plastídeos, que por conta da sua cor verde são chamados de cloroplastos ***(Figura 1)***. Os cloroplastos têm aproximadamente 7 µm de diâmetro e uma largura de 3 µm. Eles são envolvidos por um envelope, formado por duas membranas lipoprotéicas, que atuam como uma barreira seletiva ao transporte de vários metabólitos para dentro e fora dos cloroplastos. No compartimento inteiro há uma matriz, o estroma, onde se encontram muitas vesículas ou sacos achatados chamados de tilacóides, que também são revestidos por uma membrana. O conjunto de vários tilacóides chama-se granum.

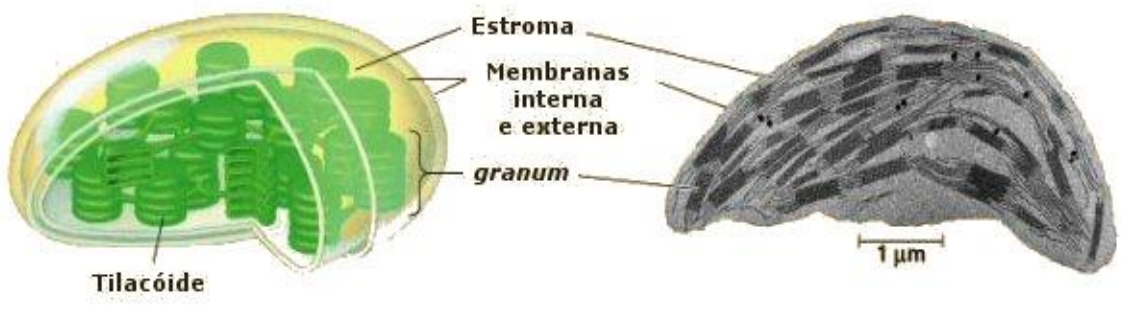


***Figura 1**: Estrutura dos cloroplastos (fonte http://www.calazans.ccems.pt/cn/).*

A clorofila e as enzimas requeridas para as reações luminosas encontram-se armazenadas, incrustadas nestas membranas tilacóides, associadas a proteínas (GROSS, 1991), enquanto as enzimas necessárias para as reações de fixadoras de carbono encontram-se no estroma (RÜDIGER & SCHOCH, 1988).

A clorofila é uma molécula planar que está sempre ligada a proteínas de forma não-covalente, e acompanhada de carotenóides. As plantas verdes contêm principalmente clorofila *a*, que corresponde a aproximadamente 75 % dos pigmentos verdes totais, e a clorofila *b*, que é um pigmento suplementar, na razão aproximada de 3:1, embora razões entre 2,5 e 4,0 já tenham sido reportadas na literatura. A proporção varia com as condições de crescimento e fatores ambientais, etapa no ciclo de vida da planta e espécie vegetal. Por exemplo, plantas que crescem na sombra apresentam uma quantidade elevada de clorofila *b*, o que pode ser explicado com base nas suas propriedades de absorção da luz. A clorofila *b* é capaz de absorver fortemente entre 450 e 480 nm, enquanto a clorofila *a* absorve fortemente entre 400 e 450 nm (GROSS, 1991). Assim, a clorofila *b* complementa a captação da luz para fazer a fotossíntese,

mesmo em condições de pouca insolação. Na ***figura 2*** é apresentado o espectro das clorofilas *a* e *b*.

As plantas são capazes de transformar clorofila *b* em clorofila *a* através da ação da clorofila *b* redutase (ROCA *et al.*, 2004), tendo assim a capacidade de adaptar o aparelho fotossintético à intensidade da luz solar, mas o processo responsável não é descrito (KRÄUTLER, 2003).

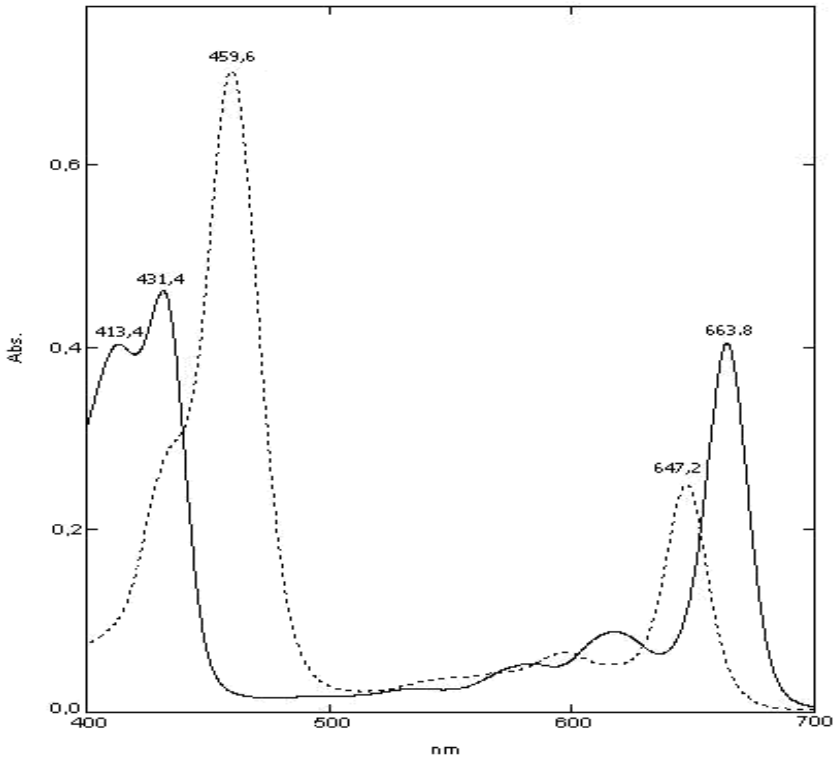
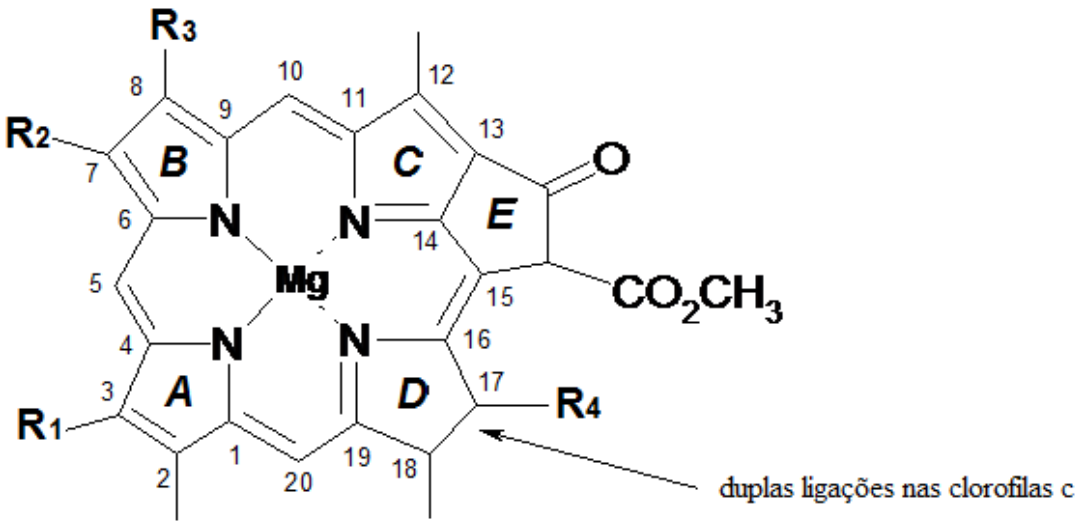


Figura 2: Espectro de absorbância de clorofila *a* (linha contínua) e clorofila *b* (linha pontuada).

Além das clorofilas *a* e *b*, que são presentes em vegetais superiores, algas verdes e em algumas bactérias, existe ainda a clorofila *c*, que é encontrada em algas marinhas, dinoflagelados e diatomáceas marinhas, e a clorofila *d*, presente em algas vermelhas

(SCHWARTZ & LORENZO, 1990). As estruturas das moléculas estão apresentadas em ***figura 3.***



	R_1	R_2	R_3	R_4
Clorofila *a*	$CH=CH_2$	CH_3	CH_2CH_3	$(CH_2)_2$-COO-$C_{20}H_{39}$
Clorofila *b*	$CH=CH_2$	CHO	CH_2CH_3	$(CH_2)_2$-COO-$C_{20}H_{39}$
Clorofila c_1	$CH=CH_2$	CH_3	CH_2CH_3	CH_2=CH-COOH
Clorofila c_2	$CH=CH_2$	CH_3	$CH=CH_2$	CH_2=CH-COOH
Clorofila c_3	$CH=CH_2$	$COOCH_3$	$CH=CH_2$	CH_2=CH-COOH
Clorofila *d*	CHO	CH_3	CH_2CH_3	$(CH_2)_2$-COO-$C_{20}H_{39}$

Figura 3. Estrutura molecular das clorofilas.

Quimicamente, as clorofilas *a* e *b* são alcoóis diterpenóides, têm uma estrutura tetrapírrólica e são ésteres, derivados de diidroporfirina, quelatados com um íon de magnésio localizado centralmente. Um quinto anel isocíclico (E) é localizado ao lado do

anel pirrólico C. Adicionalmente, as clorofilas possuem um álcool isoprenóide monoinsaturado, um diterpeno, o fitol ($C_{20}H_{39}OH$), que é esterificado com o quarto anel, e se encontra na configuração *trans*. O fitol representa o lado hidrofóbico da molécula, enquanto o resto da molécula é hidrofílico. A presença do fitol confere à clorofila uma característica apolar e lipofílica.

2.2.2 A clorofila no ciclo de vida da planta

A clorofila é um metabólito secundário indispensável a partir do momento em que a planta necessita da biossíntese de nutrientes. A ***figura 4*** mostra o esquema da biossíntese da clorofila.

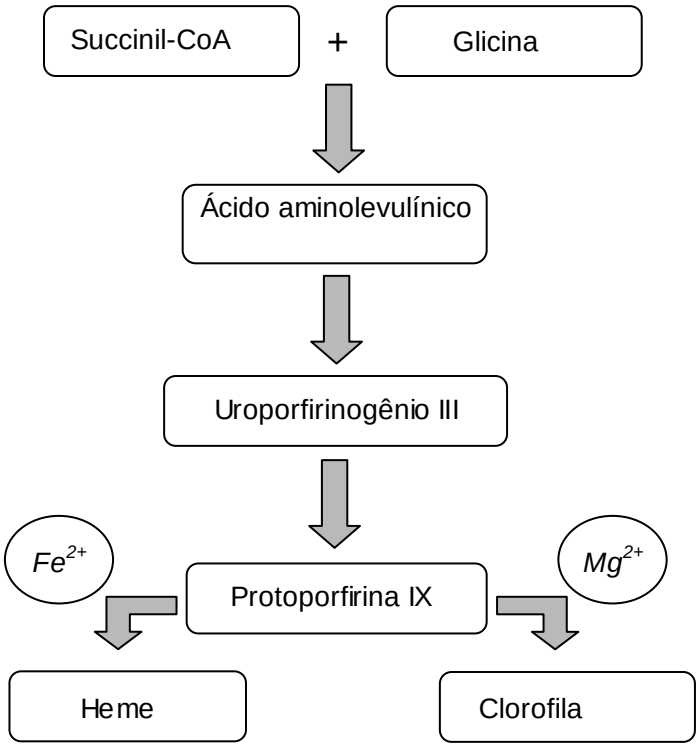


Figure 4: Esquema da biossíntese de clorofila.

Sendo uma porfirina, a clorofila é formada a partir do precursor ácido δ-aminolevulínico (ALA) que por sua vez é originário da condensão de succinil-CoA com glicina. O ALA é transformado para uroporfirinogênio III, que é o primeiro macrociclo tetrapirrólico e precursor de todos os tetrapirróis naturais (clorofilas e hemes). Uma modificação enzimática leva à protoporfirina IX, e depois disso a biossíntese difere entre os grupos tetrapirrólicos. Quando ferro é incluído no centro da porfirina, forma se heme, e quando se insere magnésio, a molécula formada é a clorofila.

No ciclo da vida da planta, da mesma maneira que a clorofila é sintetizada, ela também é degradada quando a planta entra em senescência, com exceção de alguns vegetais "sempre-verdes". A degradação natural da clorofila visa o aumento da solubilidade do pigmento e a abolição das suas propriedades fotodinâmicas através da interrupção do sistema de π-elétrons conjugados.

A primeira etapa da degradação da clorofila é iniciada na senescência por fatores endógenos, mas pode ser influenciada por fatores externos, tais como déficit hídrico, redução de luz, mudanças de temperatura, aumento do teor de etileno ou por fatores internos, como aumento de permeabilidade da membrana e mudança de pH. Esses fatores interferem no processo natural, levando a aumentar ou retardar a degradação da clorofila (TAKAMIYA *et al.*, 2000; HEATON & MARANGONI, 1996).

A remoção do grupo fitol causa um drástico aumento da polaridade da molécula da clorofila que, por conseqüência, diminui a sua estabilidade na membrana tilacóide. Isto resulta em ruptura das ligações entre proteínas e lipídeos e possivelmente em desnaturação do conjunto de clorofila com proteínas. A ruptura da membrana pode também liberar plastoquinonas e carotenóides e, assim, reduzir o transporte de elétrons e

a habilidade de suprimir radicais livres, respectivamente. O aumento dos radicais livres pode causar alterações de conformação nas pontes de proteínas com as clorofilas *a* e *b* e, desse modo, aumentar sua susceptibilidade ao ataque proteolítico (HEATON & MARANGONI, 1996).

O processo inicial da degradação resulta em catabólitos coloridos, verde-amarronzados que ainda possuem propriedades fotodinâmicas. O processo final da degradação envolve a formação de produtos incolores, fluorescentes e não-fluorescentes, que se diferenciam pela localização das duplas ligações nos anéis pirrólicos (GANDUL-ROJAS *et al.*, 2004). Ainda não foi completamente revelado se os NCC são os produtos finais da degradação ou se ainda são posteriormente degradados.

De uma forma geral, seguindo MATILE *et al.* (1999), a degradação da clorofila nos vegetais tem seu início na remoção do fitol, de ambas as moléculas, tanto clorofila *a* como clorofila *b*, promovida pela enzima clorofilase, formando os clorofilídeos. O clorofilídeo *b* precisa ser transformado em clorofilídeo *a* pela clorofila *b*- redutase, para que em seguida, a Mg-dequelatase possa eliminar o átomo de magnésio e produzir os feoforbídeos *a*. A clorofila *b*-redutase também age como redutor de clorofila *b* para clorofila *a* para que depois a clorofilase possa formar o clorofilídeo *a* (ROCA *et al.*, 2004; KRÄUTLER, 2003). Depois, a feoforbídeo *a* oxigenase (PaO) conduz à abertura oxigenolítica do anel tetrapirrólico, formando os catabólitos vermelhos, chamados de "red chlorophyll catabolites" (RCC). Essa reação é considerada o passo chave na degradação da clorofila. A PaO introduz um átomo de oxigênio na posição C_5 dos feoforbídeos *a*. O segundo átomo de oxigênio é reduzido para formar água (HÖRTENSTEINER *et al.*, 1998). A PaO é localizada no envelope interno do

cloroplasto e há atividade detectável somente durante a senescência. A atividade da enzima é restrita para o substrato feoforbídeo *a*, enquanto o feoforbídeo *b* atua como inibidor competitivo (PRUŽINSKÁ *et al.*, 2003). Por isso, a ação da clorofila *b*-redutase é indispensável para a degradação natural da clorofila (MATILE *et al.*, 1999, HÖRTENSTEINER *et al.*, 1998).

Em um experimento com uma mutante da *Arabidopsis thaliana*, planta modelo para estudos biológicos, isenta de PaO as plantas tiveram prejuízo no desenvolvimento das flores e alto índice de frutos abortados. Isso significa que a PaO tem uma função importante no desenvolvimento de flores e frutos. A ausência de PaO levou a um acúmulo de feoforbídeo *a* que apresentou correlação com a morte das células (PRUŽINSKÁ *et al.*, 2005). Os RCC então dão origem aos compostos incolores, os "fluorescent chlorophyll catabolites", (FCC), através da ação da enzima RCC redutase que reduz uma dupla ligação no anel tetrapirrólico. A ação desta enzima é específica para os RCC, sendo que outros compostos tetrapirrólicos similares não são aceitos como substratos (RODONI *et al.*, 1997). Finalmente, a desconjugação das duplas ligações na unidade tetrapirrólica leva aos compostos incolores e não-fluorescentes, os "non-fluorescent chlorophyll catabolites", (NCC), sem que se conheça a participação de alguma enzima (KRÄUTLER, 2002).

Na ***Figura 5*** são apresentadas as etapas da degradação da clorofila *a* com as enzimas necessárias.

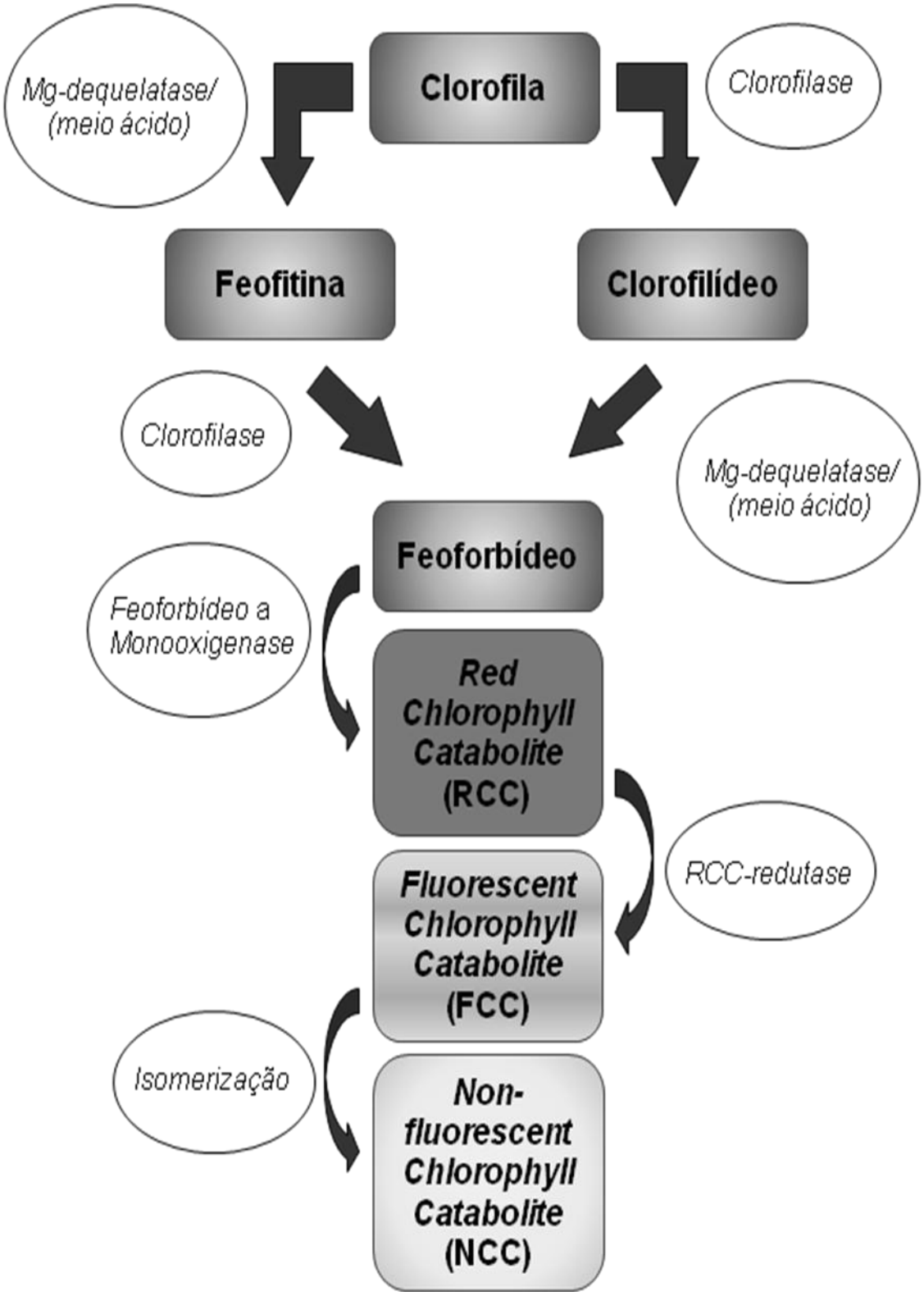


***Figura 5**:* Degradação da clorofila em folhas senescentes.

O acúmulo de catabólitos fotoreativos produz espécies reativas de oxigênio que induziriam a morte celular. Portanto, o metabolismo funcional da clorofila, incluindo biossíntese e degradação, é importante para prevenir o acúmulo desses intermediários. As propriedades fotodinâmicas da clorofila, que possibilitam a conversão da energia luminosa em energia química durante a fotossíntese podem se tornar uma ameaça durante a senescência. Por isso, a degradação da clorofila pode ser considerada um processo de detoxificação (HÖRTENSTEINER *et al*, 2004). A própria clorofila na sua forma livre é fotossensível e atua como pró-oxidante, provocando a morte prematura da célula (PRUŽINSKÁ *et al*., 2003).

É possível que os NCC sejam oxidados para outros tetrapirróis ou até para fragmentos monopirrólicos, sendo assim reutilizados para a germinação de sementes (OBERHUBER *et al*., 2003, KRÄUTLER, 2003). Por exemplo, substâncias incolores, lineares e tetrapirrólicas, produtos da degradação da clorofila foram identificados em folhas senescentes de cevada (LOSEY & ENGEL, 2001; SUZUKI & SHIOI, 1999). Um estudo recente mostrou que os NCC estão presentes na casca de pêra e maçã onde desempenham eficiente atividade antioxidante. Em um ensaio *in vitro* os NCC inibiram a formação de hidroperóxidos de ácido linoléico, devido a um potencial para capturar e neutralizar radicais peróxidos, parecido com o da bilirubina (MÜLLER *et al.*, 2007). O destino dos NCC ainda não foi descoberto.

O processo de degradação da clorofila é muito mais facilmente visualizado em folhas do que em sementes, uma vez que as folhas contêm maiores quantidades de clorofilas do que as sementes, o que dificulta comprovar se o mecanismo de degradação é semelhante. Por exemplo, não existe comprovação de que os catabólitos finais sejam

acumulados nos vacúolos, como foi descrito por alguns autores (KRÄUTLER, 2002; OBERHUBER *et al.*, 2003). Existe a hipótese de que eles sejam reaproveitados para a síntese de substâncias importantes para a germinação da semente (KRÄUTLER, 2003). Além das modificações enzimáticas da clorofila já mencionadas, outras alterações estão associadas, na maioria das vezes, com reações oxidativas. A presença de clorofilas oxidadas, as hidroxiclorofilas, em certos estágios do desenvolvimento de frutos sugere que uma oxidação direta da clorofila pode estar envolvida no seu catabolismo, juntamente com a rota de degradação iniciada pela clorofilase. Nessa degradação oxidativa, em estudos *in vitro*, tem sido observado o envolvimento de três tipos de processos, catalisados por enzimas: i) uma descoloração dependente de oxigênio e ácidos graxos insaturados, causada pela clorofila oxidase, ii) uma co-oxidação da clorofila na presença de hidroperóxidos de ácidos graxos insaturados catalisada pela lipoxigenase e iii) uma oxidação por peróxido de hidrogênio (H_2O_2), por intermédio de uma peroxidase, na presença de fenóis (GANDUL-ROJAS *et al.*, 2004). Entretanto, não há clareza sobre o tipo de participação dessas enzimas na degradação da clorofila *in vivo*.

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

2.2.3 Análise de clorofilas e seus derivados

Vários autores estudaram a síntese e degradação da clorofila em diversos vegetais e sementes oleaginosas, tais como canola (ENDO *et al.*, 1992; JOHNSON-FLANAGAN & THIAGARAJAH, 1990), azeitona (BOEKEL, 2000; MÍNGUEZ-MOSQUERA & GALLARDO-GUERRERO, 1995; MÍNGUEZ-MOSQUERA *et al.*, 1994), salsa (YAMAUCHI & WATADA, 1993), couve, espinafre, brócolis, repolho (TENG & CHEN, 1999; WEEMAES *et al.*, 1999; LÓPEZ-AYERRA *et al.*, 1998; MANGOS & BERGER, 1997, HEATON *et al.*, 1996; KHACHIK *et al.*, 1986; SCHWARTZ *et al.*, 1981), feijão verde (MONREAL *et al.*, 1999; CANO *et al.*, 1998) e broto de batata (KOZUKUE *et al.*, 2001). As metodologias analíticas aplicadas nestes estudos foram variadas; algumas se basearam em indicadores do teor de clorofila, como, por exemplo, medida de cor ou atividade enzimática. Outros métodos investigaram os pigmentos diretamente, monitorando o acúmulo e a retenção da clorofila e seus derivados através de técnicas conjugadas (espectrofotometria, cromatografia de camada delgada, cromatografia líquida de alta eficiência, espectrometria de massas, ressonância magnética nuclear). A utilização de técnicas conjugadas é necessária em matrizes onde tem um conjunto complexo de pigmentos a serem identificados e quantificados (TENG & CHEN, 1999; BREEMEN *et al.*, 1991; SCHWARTZ & LORENZO, 1990). No caso da complexa mistura de pigmentos esverdeados (clorofilas e derivados) e amarelados (xantofilas e carotenos), com todos os respectivos epímeros (substâncias cuja estereoquímica difere apenas na configuração em um carbono) e isômeros (substâncias com a mesma fórmula molecular, mas diferentes

arranjos atômicos, e, portanto diferentes propriedades físicas), a análise por HPLC exige isolamento prévio dos pigmentos de interesse, caso contrário os cromatogramas apresentariam muitos picos difíceis de serem identificados. Nesses casos, a utilização de técnicas como espectrometria de massas ou de ressonância magnética nuclear permite a confirmação da identidade dos picos, pois essas técnicas complementam as informações obtidas por cromatografia líquida. No caso de alômeros de clorofila e derivados constatam-se espectros de absorção eletromagnética idênticos, porém eles têm pesos moleculares diferentes e, portanto, diferentes espectros de massa. Por outro lado, os epímeros são compostos da mesma massa atômica, porém de diferentes absorções eletromagnéticas (ZISSIS *et al.*, 1999). O método oficial publicado pela AOAC (Association of Official Analytical Chemists, 1995) baseia-se em espectrofotometria estimando o teor total de clorofila e feofitina através de fórmulas que consideram as absorções máximas de cada pigmento em determinados comprimentos de onda, dependendo do solvente utilizado. Porém, é uma estimativa grosseira do ponto de vista quantitativo, já que o método não consegue distinguir entre clorofilas e feofitinas.

2.3 Ocorrência de sementes oleaginosas com alto teor de clorofila

Há uma forte correlação entre os níveis de clorofila e a maturidade da semente na época da colheita (LIU, 1996, CENKOWSKI *et al.* 1989 [a, b]). Antes de as vagens ficarem secas, a semente de soja atinge a maior capacidade germinativa e maior vigor e apresenta um teor máximo de matéria seca. Esse ponto é definido como maturação fisiológica (R_8) e ocorre aproximadamente 60-65 dias após a fecundação, coincidindo

com 28-30 % de umidade na semente. No entanto, o período de maturação fisiológica e o teor de umidade podem variar em função das condições climáticas e da variedade da soja. A maturação de colheita é caracterizada por teor de umidade inferior a 13 %, o que garante a preservação dos grãos em relação ao desenvolvimento microbiano.

As sementes de soja podem ser colhidas a partir da maturação fisiológica, até a maturação comercial, embora seja usual a colheita ocorrer quando a planta atinge uma umidade por volta de 13 %. Na prática, a presença de sementes verdes é resultado de condições climáticas desfavoráveis e de procedimentos de colheita prematura, quando a colheita é antecipada para reduzir as quebras ou perdas (CENKOWSKI & JAYAS, 1993; LEVADOUX *et al.*, 1987). Na maturação fisiológica, a clorofila e a umidade ainda estão presentes em concentrações elevadas, mas o pigmento pode ser degradado naturalmente se as sementes forem secas lentamente à temperatura ambiente. Nestas condições, o óleo resultante apresentará índices de qualidade aceitáveis (ADAMS *et al.*, 1983). Em comparação, quando a colheita é feita em condições de alta temperatura e baixa umidade relativa, com rápida perda de umidade, ou quando são aplicados produtos químicos dessecantes na cultura para acelerar o amadurecimento, as sementes podem manter a cor verde (WARD *et al.*, 1995; NWUFO, 1994, WARD *et al.*, 1992, CENKOWSKI *et al.*, 1989[a]; ADAMS *et al.*, 1983).

Outro motivo pelo qual os grãos de soja podem manter a cor verde é um inseto chamado percevejo, da família Blissinae. Ele causa a retenção da cor verde, liberando uma toxina que provoca retenção foliar

2.4 Degradação da clorofila durante armazenamento e processamento de vegetais

Durante o armazenamento de vegetais verdes ocorrem, além das reações enzimáticas já descritas, reações causadas por fatores externos, tanto físicos como químicos. A ação de ácidos, oxigênio, luz e calor pode formar um grande número de produtos de degradação (MANGOS & BERGER, 1997). O átomo central de magnésio é facilmente removido, principalmente em condições ácidas, sendo substituído por dois átomos de hidrogênio, formando as feofitinas. A hidrólise do grupo fitol das feofitinas dá origem aos feoforbídeos. A clivagem do grupo fitol, geralmente catalisada enzimaticamente pela clorofilase endógena, mas sem a remoção do átomo de magnésio, produz os clorofilídeos (KRÄUTLER, 2003).

O passo inicial da degradação da clorofila em alimentos processados é iniciado por fatores externos, tais como déficit hídrico, luminosidade ou alterações térmicas. O rompimento do tecido pelas forças externas do processamento resulta em alterações químicas, enzimáticas e possivelmente de expressão gênica, que conduzem a uma redução da concentração de clorofila. A ocorrência de feoforbídeos e feofitinas confere coloração amarronzada ao vegetal, que leva o consumidor à rejeição do produto (HEATON *et al.*, 1996).

Durante o processamento térmico, a principal via de degradação de clorofila é a substituição do átomo de magnésio por dois átomos de hidrogênio em decorrência do pH ácido, processo conhecido por feofitinização. As feofitinas possuem coloração próxima ao verde oliva e ainda estão sujeitas à hidrólise do fitol, formando um feoforbídeo hidrossolúvel. O tratamento térmico prolongado pode resultar na perda do grupo

metilcarboxila, dando origem a pirofeofitinas (SCHWARTZ & LORENZO, 1991; 1990). Na ***figura 6*** essa degradação está demonstrada. Segundo JOHNSON-FLANAGAN & THIAGARAJAH (1990), a clorofila *a* é mais sensível à feofitinização do que a clorofila *b*. O grupo fitol da feofitina pode ser removido com uma mudança de pH, para o ácido ou alcalino, formando assim feoforbídeo sem participação enzimática.

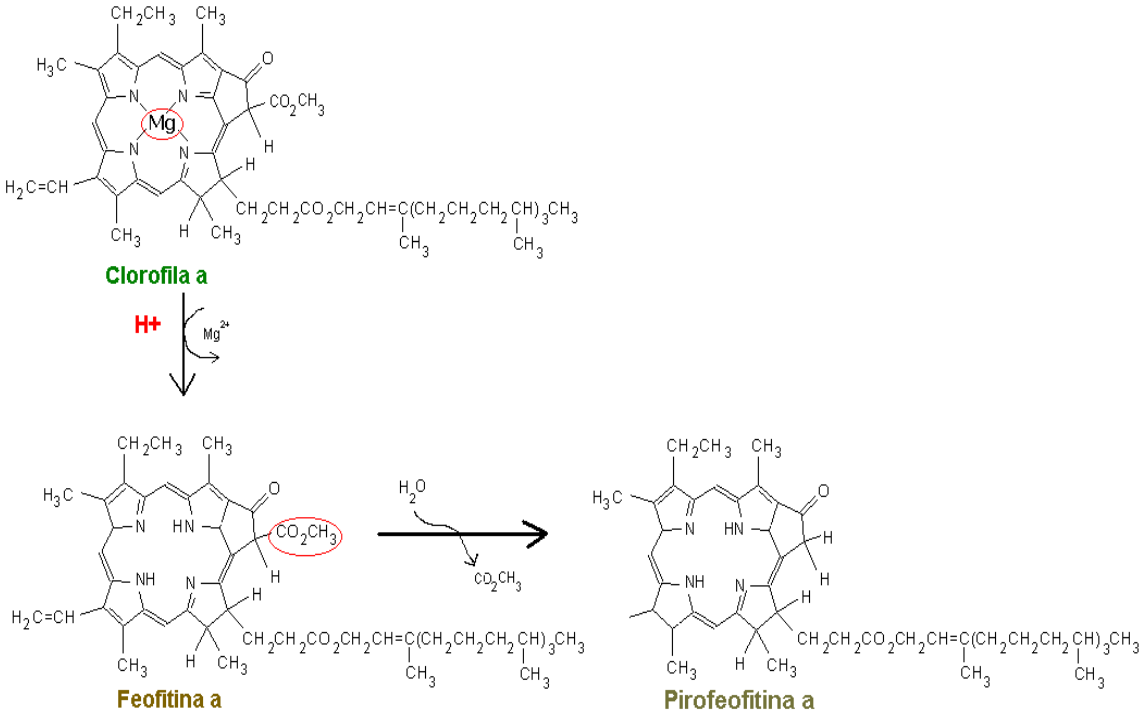


***Figura 6*:** Degradação química da clorofila.

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

cor verde. Visando a preservação da clorofila, alguns pesquisadores recomendam o uso de matéria-prima de alta qualidade, o controle de pH, mínima exposição ao calor aplicando técnicas com altas temperaturas por pouco tempo (HTST – High Temperature Short Time), ou a associação dessas técnicas (SCHWARTZ & LORENZO, 1990).

Em sementes como soja, canola e seus óleos derivados, a presença do pigmento verde é indesejável.

Conforme demonstrado, durante a degradação da clorofila em alimentos, seja no campo ou durante o armazenamento e processamento, aparecem vários produtos intermediários. Todos os derivados podem ser detectados devido às características de absorção de luz no espectro. Porém, essas substâncias têm uma vida útil demasiadamente curta e aparecem e rapidamente desaparecem durante a senescência. Isso dificulta imensamente a comprovação da seqüência e do local em que os compostos são formados (HEATON & MARANGONI, 1996). A falta de acúmulo dos intermediários da degradação da clorofila durante a senescência e a maturação de plantas sugere que existem diversas reações de degradação ocorrendo ao mesmo tempo (TAKAMYIA *et al.*,2000).

2.5 Degradação da clorofila durante a secagem e estocagem da soja

A secagem tem por finalidade principal reduzir o teor de água das sementes até atingir níveis seguros para a sua conservação durante o período de estocagem e obter um grau de umidade adequado para a comercialização. Após a maturidade fisiológica, o produtor dispõe de duas alternativas. A primeira é aguardar a secagem dos grãos na

própria planta, até que eles atinjam um grau de umidade igual ou inferior a 13 %, favorável à colheita mecânica e mais seguro para o armazenamento. Uma alternativa seria realizar a colheita antes de atingir este teor de umidade. Porém, sementes com um teor de umidade ainda elevado devem ser submetidas à secagem rápida para evitar a deterioração por reações enzimáticas ou por desenvolvimento de microrganismos e fungos, que produzem lipases hidrolíticas e, conseqüentemente, aumentam o teor de ácidos graxos livres (PRITCHARD, 1983). A secagem rápida na indústria é geralmente feita em estufas com temperaturas variando entre 38 e 80°C, dependendo do destino dos grãos. Para isolados protéicos são utilizadas temperaturas mais baixas enquanto para a produção de óleo são aplicadas temperaturas mais altas (CERQUEIRA & POPINIGIS, 1981). Nessas condições, ao final da secagem, uma significativa porcentagem dos grãos se mantém verde, comprometendo a qualidade do óleo.

O estádio de maturação e as condições de secagem após a colheita da soja interferem significativamente com os teores de clorofila, cuja presença é considerada um fator depreciador da qualidade dos grãos. Em estudos realizados por GOMES *et al.*, (2003), a secagem dos grãos a 25˚C levou a uma redução maior da clorofila, comparado com os grãos que foram secos a 40˚C. Portanto, a retenção da clorofila no grão depende tanto do estado de maturação tanto como das condições de secagem do grão. Os autores sugeriram como motivos para a manutenção da cor verde a perda de umidade do grão e a velocidade de desidratação. Embora tanto a umidade quanto a clorofila sejam reduzidos durante a secagem, os dois parâmetros não dependem um do outro.

Outro experimento confirmou os resultados obtidos anteriormente. Nele foram aplicadas três temperaturas para secar os grãos, 25, 40 e 75˚C, e a quantidade de clorofila e seus derivados foram analisados por HPLC (SINNECKER *et al.*, 2005). Grãos que não foram submetidos às altas temperaturas apresentaram um padrão simples de pigmentos, sendo os pigmentos predominantes a luteína, clorofila *a* e *b* e feofitina *a* e *b*. Em menores quantidades encontraram-se clorofilídeo *a* e *b* e feoforbídeo *a*. Dentre as colheitas feitas em diferentes estádios de maturação observou-se desaparecimento dos pigmentos, sendo que na última colheita foi detectada apenas a luteína. Nos grãos secos a 25˚C os pigmentos verdes desapareceram quase por completo e clorofilídeos e feoforbídeos já não foram encontrados. Após secagem a 40˚C, os grãos apresentaram altos níveis de clorofila e acúmulo de feofitina, o que faz presumir que a Mg-dequelatase ainda está ativa nessa temperatura. Porém, pode ter ocorrido também uma feofitinização sem participação enzimática, mas por dano às membranas plasmáticas, facilitando o transporte de ácidos. Uma vez que foram encontradas pequenas quantidades de clorofilídeos e feoforbídeos, a clorofilase parece estar ativa também. Por outro lado, a feoforbídeo *a* oxigenase parece ter sido desativada, pois não foram detectados derivados incolores. Já os grãos secos a 75˚C mostraram quantidades menores de clorofila e feofitina em relação aos grãos secos a 40˚C. Os autores associaram esse fato à ocorrência de outras reações, devido à elevada temperatura. Por exemplo, poderiam ter acontecido reações de Maillard ou Strecker que destruíram a clorofila ou impediram a sua extração. A ausência de clorofilídeos e feoforbídeos nessa temperatura comprovou que a clorofilase perdera sua atividade.

Experimentos em que foi avaliada a atividade da lipoxigenase em soja comercial (safra 2005/2006) que havia sofrido déficit hídrico no campo revelaram alta atividade dessa enzima, embora os grãos estivessem verdes. A degradação da clorofila foi bloqueada e a lipoxigenase não foi capaz de atuar na degradação do pigmento. Foi proposta a existência de uma barreira física, talvez a própria membrana do cloroplasto, que dificulta o acesso da enzima. A membrana do cloroplasto é extremamente estável, sendo que a célula procura sempre manter sua atividade fotossintética pelo máximo tempo possível. Essa estabilidade é essencial para o controle de importação e exportação de material (HEATON & MARANGONI, 1996). Por isso, o cloroplasto é uma das últimas organelas a ser degradada durante a senescência. Parece que a lipoxigenase só começa a degradar a clorofila, quando a célula já se encontra num estado final de senescência, havendo desestruturação das membranas tilacóides.

Durante o armazenamento tanto a umidade do próprio grão de soja, quanto a temperatura e umidade relativa do ambiente devem ser controlados. A semente de soja é de natureza higroscópica, absorvendo ou perdendo água para a atmosfera circundante, até que a pressão de vapor da semente e do ar atinja o equilíbrio. Embora a qualidade da semente não possa ser melhorada durante o armazenamento, boas condições durante esse período contribuem para preservar sua viabilidade. A umidade dos grãos e a temperatura do ar são determinantes primários das mudanças de qualidade durante o armazenamento (TECKRONY *et al.*, 1987; MACHADO, 1981). Deterioração durante a estocagem, manejo ou carregamento, pode resultar em um óleo de difícil processamento e com grande perda no refinamento (MOUNTS *et al.*, 1990).

Apesar da importância da transformação da clorofila em seus derivados durante o amadurecimento da soja, pouco se conhece sobre o mecanismo de degradação durante o processo de maturação e armazenamento. Aparentemente, trata-se de um processo enzimático, evidenciado pelo aumento de clorofilídeos, embora acoplado a um mecanismo químico não-enzimático, que resulta em um aumento de feofitinas e outros derivados fitilados (SUZUKI *et al.*, 1999; MANGOS & BERGER, 1997; HEATON & MARANGONI, 1996; SCHWARTZ & LORENZO, 1990).

2.6 Óleos de soja provenientes de grãos verdes

Óleos com elevado teores de clorofila, provenientes da extração de grãos verdes, são um problema nas indústrias esmagadoras de sementes oleaginosas. O conteúdo de clorofila é um parâmetro na avaliação da qualidade do óleo e a sua presença confere uma coloração escura indesejável ao óleo. Por ser uma molécula próoxidante, a clorofila reduz a estabilidade oxidativa do óleo (CENKOWSKI & JAYAS, 1993; TAUTORUS & LOW, 1993; MÍNGUEZ-MOSQUERA *et al.*, 1990; LEVADOUX *et al.*, 1987).

A presença de clorofila também é relacionada com a diminuição da velocidade do processo de hidrogenação. A clorofila bloqueia os centros ativos do catalisador, inibindo a taxa de hidrogenação do óleo de canola (WARD *et al.*, 1995; ABRAHAM & DeMAN, 1986).

Alguns autores, que estudaram a estabilidade oxidativa de óleos de soja e de canola, relataram que a atividade próoxidante da feofitina é até três vezes maior do que a da clorofila. Tanto a clorofila quanto a feofitina promovem, de forma similar, a

fotooxidação do óleo em uma ampla faixa de comprimento de onda, provavelmente porque elas possuem espectros de absorção semelhantes. Porém, a maior atividade próoxidante da feofitina foi relacionada com sua maior estabilidade química. Durante a fotooxidação ou autooxidação do óleo vegetal, a clorofila é degradada mais rapidamente do que a feofitina.

Outra observação importante é que óleos vegetais refinados contêm teores de feofitina bem maiores do que os de clorofila. Este fato, juntamente com a maior atividade próoxidante e maior estabilidade da feofitina na autooxidação do óleo comparada à da clorofila, torna-se muito importante a medida do teor de feofitina como medida de controle da estabilidade oxidativa de óleos vegetais (TAUTORUS & LOW, 1993; USUKI *et al.*, 1984[a,b]).

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

3 OBJETIVOS

- Estudar a influência do déficit hídrico na degradação da clorofila e na qualidade da soja.

- Estudar a degradação da clorofila durante seis estádios de maturação da soja no campo, bem como a influência de secagem pós-colheita a 40 e 60°C empregando métodos analíticos de espectrofotometria e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – High Performance Liquid Chromatography).

- Avaliar o perfil de clorofilas *a* e *b* e seus principais compostos de degradação, coloridos e incolores, e correlacionar o acúmulo destes metabólitos com possíveis mecanismos químicos e bioquímicos envolvidos na degradação da clorofila.

- Estudar o comportamento dos metabólitos incolores (NCC), supostos produtos finais da degradação da clorofila, em sementes de soja e avaliar se eles, de fato, são acumulados ou não.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Soja que sofreu déficit hídrico

4.1.1 Amostras de soja

Foram analisadas cinco amostras comerciais de soja (duas das cultivares Embrapa BRS 184, duas da Embrapa BRS 133 e uma Coodetec 201). Todas as amostras foram provenientes da safra 2004/2005 de fazendas da região de Palmital - SP e foram fornecidas pela CEAGESP (Companhia de Entreposto e Armazéns Gerais de São Paulo). Os grãos foram debulhados automaticamente e secos com ar seco de 100°C até atingirem uma umidade inferior a 13 %, procedimento padrão para sua estocagem na CEAGESP. Estima-se que a temperatura no interior da massa dos grãos nesse processo atinge aproximadamente 60 - 70°C.

Os grãos de soja para análise foram selecionados, excluindo-se impurezas, grãos partidos ou avariados. Foram triturados em moinho (Kinematica A10 Analysenmühle, Switzerland) e todas as análises foram feitas com soja recém moída.

4.1.2 Massa de 100 sementes

A massa de 100 sementes de cada variedade em triplicata foi medida em balança analítica, dispensando-se grãos partidos e quebrados.

4.1.3 Análises químicas e bioquímicas

4.1.3.1 Determinação da umidade

A umidade foi medida após a colheita e após 20 meses de estocagem. A determinação da umidade foi realizada por gravimetria, após secagem do material em estufa a 105°C até peso constante (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985). Pesaram-se precisamente dois gramas de grãos de soja em cápsulas de porcelana, previamente taradas.

4.1.3.2 Atividade de água

A medida da atividade de água foi realizada em equipamento Novasina Thermoconstanter Humidat, Switzerland, a 25ºC, conforme metodologia descrita por JONSTON & LIN (1987). O método é baseado na capacidade de uma lâmina de cloreto de lítio de alterar sua resistência elétrica ou condutividade, devido a uma mudança de umidade relativa no espaço do porta-amostra.

4.1.3.3 Determinação de proteínas

O teor de proteínas foi determinado pelo método de micro-Kjeldahl (N x 6,25) (AOAC, 1984). Utilizou-se 30 mg de soja triturada, previamente desengordurada. A quantidade de nitrogênio total foi calculada pela fórmula abaixo:

$$\%Nitrogênio = \frac{(V_{HCL} - V_{branco}).0{,}02.fc.14{,}007}{m_{soja}} \times 100$$

4.1.3.4 Determinação de lipídeos

Os lipídeos totais foram quantificados por extração contínua em aparelho tipo Soxhlet, empregando-se éter etílico como solvente (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985). Os cartuchos para extração foram preparados com papel de filtro, com algodão nas extremidades e no seu interior foram adicionados cinco gramas de soja moída. O cartucho foi posto no extrator de Soxhlet, que era acoplado a um balão previamente tarado. Adicionou-se aproximadamente 300 mL de éter etílico e o sistema foi aquecido durante oito horas, provocando o refluxo do éter, que arrastou consigo os lipídeos da amostra. O solvente foi eliminado em rotaevaporador e a seguir, o balão contendo o óleo foi posto em estufa a 105°C durante uma hora, para eliminar o solvente e depois colocado por 30 min em um dessecador. O teor de lipídeos foi calculado pela diferença entre a massa do balão antes e após o procedimento e sua proporção na amostra foi convertida para base seca.

4.1.3.5 Extração do óleo

Para extração do óleo, amostras de 50 g de soja triturada em moinho foram imersas em 250 mL de *n*-hexano (p.a.), durante 18 h a temperatura ambiente. O solvente foi eliminado em rotoevaporador até secura (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1976).

4.1.3.6 Índice de Acidez

O óleo extraído foi avaliado quanto à presença de ácidos graxos livres, representando a acidez, após a colheita e após 20 e 30 meses de estocagem. A análise foi realizada após dissolução de dois gramas de óleo em 25 mL de solução álcool/éter etílico (2:1) (v/v), titulada com hidróxido de potássio 0,1 M, utilizando fenolftaleína 1 % como indicador (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1976). O cálculo do índice de acidez foi feito da seguinte forma:

$$acidez = \frac{V_{KOH} \cdot f_{KOH} . 5{,}61}{m_{amostra}}$$

4.1.3.7 Índice de Peróxidos

O índice de peróxidos foi medido após a colheita e após 20 meses de estocagem a temperatura ambiente. O conteúdo total de hidroperóxidos foi determinado por iodometria, ou seja, o iodo produzido a partir da oxidação do iodeto de potássio pelos peróxidos da amostra foi titulado com solução de tiossulfato de sódio, utilizando amido como indicador. Utilizou-se cinco gramas de óleo dissolvido em 30 mL de solução clorofórmio/ácido acético glacial (3:2, v:v) e adicionou-se 0,5 mL de solução saturada

de iodeto de potássio, agitando durante 60 s. Acrescentou-se 30 mL de água e a solução foi titulada com tiossulfato de sódio 0,01 N. O índice de peróxidos foi calculado conforme segue:

$$índice = \frac{(a-b).0{,}01}{m} \times 1000$$

a= volume de tiossulfato gasto na titulação (mL) das amostras;

b= volume de tiossulfato gasto na titulação (mL) do branco;

m= massa da amostra (g).

4.1.3.9 Medida de atividade da lipoxigenase 1

Seguiram-se as metodologias descritas por AXELROD *et al.* (1981) e OLIVEIRA *et al.* (1998), que definem que uma unidade de enzima corresponde a um aumento de 0,001 na absorbância por minuto (a 234 nm) em pH 9, a 25 ^{o}C, equivalente a oxidação de 0,12 µmol de ácido linoléico. As proteínas solúveis foram extraídas de 20 mg de soja moída com 1,2 mL de tampão de extração gelado (Tris 60 mM, $CaCl_2$ 15 mM e 13 % sacarose; pH 8,2) em almofariz previamente congelado. A suspensão obtida foi centrifugada a 14000 x g por 20 min a 4°C e o sobrenadante utilizado para a análise da atividade enzimática. A atividade da lipoxigenase no sobrenadante foi avaliada pela leitura da absorbância em 234 nm, que representa a formação de hidroperóxidos do ácido linoléico. Mediu-se a variação de absorbância a cada dez segundos pelo período de dois minutos, do meio de reação, contendo 2,5 µL de extrato de soja, um mililitro de tampão borato de sódio 0,1 M (pH 9,5) e seis microlitros

de linoleato de sódio 10 mM (ácido linoléico 99 %, Tween-20, NaOH 2 N), que foi empregado como substrato. Os valores de atividade enzimática foram expressos em U/mg em base seca.

4.1.3.10 Quantificação de clorofila por espectrofotometria

Seguindo o método descrito por PORRA *et al.* (1989), foram utilizados oito gramas de soja triturada e extraídos com dez mililitros de acetona 80 % em tubos de centrífuga. Todos os procedimentos foram realizados no menor tempo possível, não ultrapassando dez minutos, e com a mínima exposição à luz e ao oxigênio. Após agitação as suspensões foram centrifugadas a 15000 x g por 15 min. Os sobrenadantes foram analisados em espectrofotômetro (Shimadzu, UV-1650PC, Japan), fazendo leituras a 663,6, 646,3 e 750 nm contra um branco contendo acetona 80 %. As quantidades de clorofila *a* e *b* e clorofila total foram calculadas por meio de absorbâncias específicas e equações estabelecidas por PORRA *et al.* (1989) e expressas em μg/g de soja em base seca.

$$\text{Clorofila } a = 13{,}71 * abs^{663{,}6nm-750nm} - 2{,}85 * abs^{646{,}6nm-750nm}$$

$$\text{Clorofila } b = 22{,}39 * abs^{646{,}6nm-750nm} - 5{,}42 * abs^{663{,}6nm-750nm}$$

$$\text{Clorofilas } a \text{ e } b = 19{,}54 * abs^{646{,}6nm-750nm} + 8{,}29 * abs^{663{,}6nm-750nm}$$

4.1.3.11 Extração e separação das clorofilas e derivados esverdeados por HPLC

O procedimento de extração foi realizado de forma que os efeitos da luz, da temperatura e da ação enzimática sobre a degradação da clorofila foram minimizados.

As vidrarias contendo as amostras foram protegidas contra a luz e os solventes de extração foram utilizados gelados. O tempo de extração foi mantido ao seu mínimo possível, diminuindo assim a possibilidade de degradação dos pigmentos analisados.

A extração dos pigmentos seguiu o método descrito por SINNECKER *et al.* (2005), utilizando-se cinco gramas de grãos de soja triturada, que foi homogeneizada com 30 mL de acetona p.a. 80 % e filtrados sob vácuo. O resíduo foi imerso em acetona p.a. 80 % por mais duas vezes, para garantir completa extração. A clorofila e derivados presentes na solução de acetona foram transferidos para cerca de 100 mL de éter de petróleo p.a. em funil de separação. A solução foi lavada com água destilada para remoção de impurezas hidrossolúveis, e seca com sulfato de sódio p.a. anidro. A solução foi concentrada em rotoevaporador e o material obtido foi re-dissolvido em acetona (grau HPLC) e completado o volume para cinco mililitros.

A separação dos pigmentos (SINNECKER *et al.* 2005) foi realizada por cromatografia líquida de alta pressão em equipamento Shimadzu, (CLASS-M10A, Japan), equipado com um sistema de três bombas (Shimadzu LC-10ADVP, Japan), detector de arranjo de diodos UV/Vis (Shimadzu, SPD-M10AVP, Japan), coluna Nucleosil ODS 100 (Phenomenex, 5 µm, 250 mm x 4 mm, USA) e uma coluna de guarda (11 mm x 4 mm). A fase móvel era constituída de (A) metanol, (B) acetato de amônio 1M e (C) acetona, aplicando o seguinte gradiente: 0 min (80:20:0 v/v/v), 15 min (80:0:20), 17,5 min (80:0:20), 30 min (0:0:100), 34 min (80:20:0), 40 min (80:20:0). O gradiente está apresentado graficamente na ***figura 7.*** Esse gradiente foi eficiente para a separação dos principais pigmentos verdes, polares e não-polares, em uma mesma coluna de fase reversa, sem necessidade de uma etapa de pré-fracionamento em coluna aberta. O acetato de amônio é necessário para manter os compostos polares parcialmente

dissociados, permitindo assim a sua eluição (MANGOS & BERGER, 1997). A mudança de concentração entre acetona e metanol permite a separação das xantofilas e clorofilas dos feoforbídeos e clorofilídeos. A acetona é necessária para eluir as feofitinas, que são os pigmentos mais apolares.

As substâncias foram analisadas a 410, 432 e 459 nm e a identificação e quantificação foram feitas por comparação dos espectros e dos tempos de retenção com padrões (MANGOS & BERGER, 1997). Todos os reagentes usados para a análise por HPLC foram de grau HPLC e previamente filtrados por membranas adequadas de 0,45 µm (PTFE para acetona e PVDF para metanol e acetato de amônio). No preparo do acetato de amônio 1M foi utilizada água purificada (MilliQ). Antes de cada corrida em HPLC, os solventes foram desgaseificados durante dez minutos, com um desgaseificador de hélio.

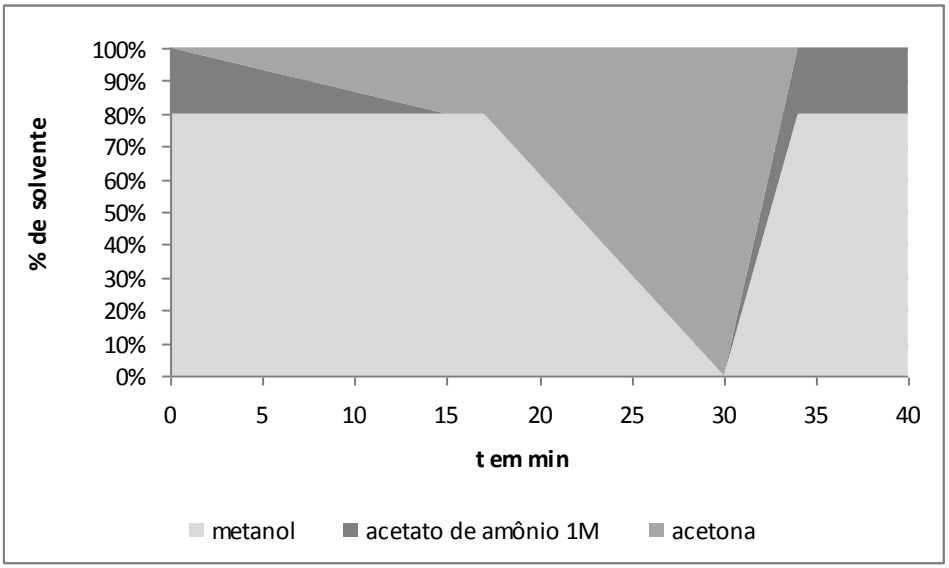


Figura 7: Gradiente de eluição para a análise de clorofilas e derivados esverdeados por HPLC.

4.1.3.12 Extração e análise dos derivados incolores da clorofila por HPLC

A extração dos derivados incolores foi realizada com base nos métodos descritos por OBERHUBER *et al.* (2001), HÖRTENSTEINER *et al.* (1998); MÜHLECKER *et al.* (1997), RODONI *et al.* (1997); HÖRTENSTEINER *et al.* (1995) e GINSBURG & MATILE (1993). Os catabólitos incolores foram extraídos de 0,5 g de soja moída com um mililitro de solução metanol: tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0) (1:1 v/v) em tubo Eppendorf. A suspensão foi agitada vigorosamente durante 30 s e a seguir centrifugada por dez minutos a 13000 x g. Este procedimento foi feito em quadruplicata e os sobrenadantes foram transferidos para tubos limpos e centrifugados novamente (13000 x g por cinco minutos). Os sobrenadantes foram reunidos e o solvente evaporado em rotoevaporador. O resíduo foi ressuspenso em um mililitro de água milli-Q e filtrado por uma membrana de PVDF de 0,45 µm. Uma alíquota de 50 µL deste extrato contendo os derivados incolores foi injetada em HPLC imediatamente após a extração.

A separação dos derivados incolores foi obtida em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (Shimadzu, CLASS-M10A, Japan) utilizando-se uma coluna analítica Nucleosil ODS 100 (Phenomenex, 5 µm, 250 mm x 4 mm, USA) e uma coluna de guarda (11 mm x 4 mm), acopladas a um sistema de HPLC de três bombas (Shimadzu, LC-10ADVP) (SINNECKER *et al.*, 2005) com fluxo de 0,5 mL/min. O detector de arranjo de diodos UV/Vis (SPD-M10AVP, Shimadzu) foi monitorado a 459, 320 e 210 nm. O espectro de absorção foi gravado na faixa de comprimento de onda de 190 a 800 nm e os dados foram processados por um software (Class-VP 5.032). O volume de injeção foi de 50 µL de cada amostra.

O sistema de solventes consistiu em: (A) água, (B) tampão K_3PO_4 100 mM pH 7.0 e (C) metanol. Todos os solventes utilizados foram de grau HPLC e previamente filtradas por membranas de PVDF de 0,45 µm. No preparo do tampão K_3PO_4 100 mM foi utilizada água purificada (MilliQ). Antes de cada corrida em HPLC, os solventes foram desgaseificados durante dez minutos, com um desgaseificador de hélio.

O gradiente de eluição está apresentado na ***figura 8*** e foi desenvolvido na seguinte sequência: 0 min (0:80:20 v/v/v), 10 min (0:80:20), 70 min (0:40:60), 80 min (0:40:60), 82 min (20:20:60), 87 min (20:10:70), 90 min (15:5:80), 96 min (9:1:90), 97min (4.5:0.5:95), 98 min (5:0:95), 100 min (0:0:100), 115 min (0:0:100), 120 min (80:0:20), 125 min (80:0:20), 135 min (0:80:20) (OBERHUBER *et al.*, 2001).

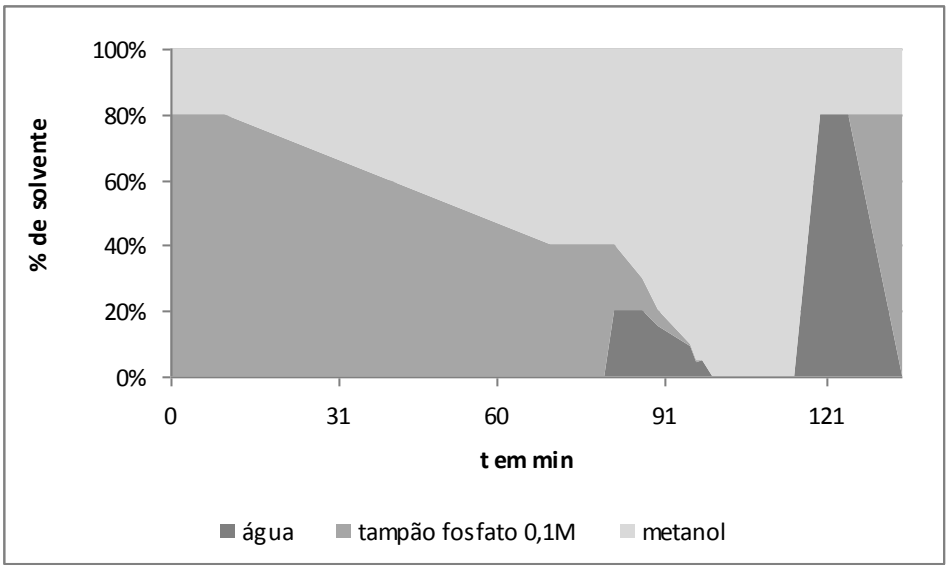


Figura 8: Gradiente de eluição para a análise de HPLC de compostos incolores da clorofila.

4.2 Soja cultivada em condições normais de irrigação

4.2.1 Amostragem

O experimento foi conduzido com a cultivar de soja IAC-18, fornecida pelo Instituto Agronômico de Campinas (IAC), seguindo GOMES *et al.* (2003). A IAC-18 é uma cultivar com um ciclo de 120 a 130 dias e o seu florescimento acontece 45 a 50 dias após a semeadura, dependendo das condições climáticas. A IAC-18 é indicada para solos de média fertilidade em áreas do Brasil Central (SP, MG, GO, MT e MS), onde o rendimento é de aproximadamente 2400 a 3000 kg por hectare. As plantas alcançam uma altura de 70 a 90 cm e as sementes atingem um peso médio de 18 g/100 sementes (APASSUL, 2008).

A área reservada para a semeadura da soja é localizada num Latossolo Eutroférrico e recebeu adubação durante a semeadura de 350 kg por hectare. No terreno para a semeadura foram marcadas 10 fileiras de 10 m de comprimento e de 50 cm de distância entre elas. Após o preparo do solo as semeaduras foram realizadas em 12 de dezembro de 2007. Após o florescimento ocorreram pulverizações para controle químico de insetos mastigadores e sugadores, bem como para controle de doenças fúngicas na parte aérea das plantas.

As sementes foram colhidas de acordo com a escala de FEHR & CAVINESS (1977), entre os estádios R_6 e R_8.

Foram realizadas seis colheitas em intervalos regulares. A primeira colheita foi realizada no estádio R_6, caracterizado pela existência de legumes contendo sementes verdes de tamanho máximo em qualquer um dos quatro nós superiores que tivesse a

folha completamente desenrolada, 101 dias após a semeadura. Mais quatro colheitas foram realizadas no estádio R_7, caracterizado pela cor amarela das vagens, com 50 % das folhas amareladas, indicando a maturação fisiológica. A última colheita foi realizada no estádio R_8, 123 dias após a semeadura. As datas de colheita são apresentadas na ***Tabela 3.***

Tabela 3. Datas de colheita das amostras de soja IAC-18.

Colheita	Data da colheita	Idade da planta	Estádio de maturação conforme Fehr e Caviness (1977)
1	20/03/2008	101 dias	R_6
2	24/03/2008	105 dias	R_7
3	28/03/2008	109 dias	R_7
4	02/04/2008	114 dias	R_7
5	07/04/2008	119 dias	R_7
6	11/04/2008	123 dias	R_8

As colheitas foram realizadas sempre entre sete e oito horas da manhã, colhendo sementes de plantas de duas fileiras intercaladas para minimizar os efeitos de localização da planta na área de semeadura. As sementes ainda em suas vagens foram colocadas em sacos de papel e transportadas imediatamente para São Paulo.

Chegando ao laboratório, as sementes foram divididas em três partes, sendo uma parte avaliada imediatamente após a colheita, a segunda após secagem a 40˚C e a terceira após 60˚C. A secagem foi realizada em estufa ventilada com os grãos ainda dentro das vagens, até atingirem peso constante. Depois da secagem as vagens foram debulhadas manualmente e os grãos congelados a -20°C até o momento das análises.

4.2.2 Análises químicas e bioquímicas

Todas as análises a seguir foram realizadas em todos os tratamentos estudados (sementes recém-colhidas e secas a 40°C e 60°C). Dependendo da quantidade de amostra necessária para cada tipo de análise, preparava-se uma amostragem de sementes adequada para a realização de triplicatas autênticas, ou seja, separava-se uma quantidade de sementes adequada para obter três amostras representativas para cada análise. Todas as análises foram realizadas em triplicata, se não mencionado diferentemente.

4.2.2.1 Determinação de umidade, atividade de água e proteínas

Essas análises foram feitas conforme descrito nos itens 4.1.3.1 - 4.1.3.3, com a exceção da análise de proteínas ter sido realizada com 50 mg de soja triturada.

4.2.2.2 Quantificação de clorofila a *e* b *por espectrofotometria*

O protocolo para a quantificação dos pigmentos verdes foi modificado em relação às análises realizadas com a soja da CEAGESP. Com altas concentrações de clorofilas em sementes de soja imaturas, observou-se que não era possível extrair todos os pigmentos verdes com acetona 80 %, de forma que o resíduo ficasse incolor. A água presente nas células, principalmente nos primeiros estádios de maturação, diluía a acetona e dificultava a extração. Outro ponto negativo da acetona é sua volatilidade. Por isso, substituiu-se com êxito a acetona por dimetilformamida, frequentemente indicada

na literatura para a extração de clorofilas em amostras contendo elevados teores de lipídeos (MÍNGUEZ-MOSQUERA *et al.*, 1989).

Um grama de grãos inteiros foi misturado com quatro mililitros de dimetilformamida e homogeneizado em homogeneizador tipo "ultra turrax". Depois, a suspensão foi centrifugada a 5°C e 10000 x g por dez minutos. Esse procedimento foi repetido e após duas extrações o resíduo não apresentou mais cor verde. Os sobrenadantes das centrifugações foram reunidos em balão volumétrico, completado para dez mililitros e analisado em espectrofotômetro (Shimadzu, UV-1650PC), com leituras em 663,8, 646,8 e 750 nm. Todo processo foi feito sob proteção de luz e oxigênio, o mais rapidamente possível e com reagentes e material gelado. As quantidades de clorofila *a* e *b* foram calculadas através de equações estabelecidas por PORRA *et al.* (1989) e expressas em μg/g de soja em base seca.

$$\text{Clorofila } a = 12{,}00 * abs^{663{,}8nm-750nm} - 3{,}11 * abs^{646{,}8nm-750nm}$$

$$\text{Clorofila } b = 20{,}67 * abs^{646{,}8nm-750nm} - 4{,}88 * abs^{663{,}8nm-750nm}$$

$$\text{Clorofilas } a \text{ e } b = 17{,}67 * abs^{646{,}8nm-750nm} + 7{,}12 * abs^{663{,}8nm-750nm}$$

4.2.2.3 Extração das clorofilas e derivados esverdeados e análise por HPLC

Para a análise de clorofilas e seus derivados por HPLC, cerca de cinco gramas de soja em cada estádio de maturação foram moídos (Polymix KCH-Analysenmühle A-10, Kinematika, AG, Luzern, Suiça) e em seguida 0,5 g da soja moída foram pesadas em cadinhos de porcelana. As análises foram efetuadas em triplicata, com o máximo cuidado para proteger os pigmentos da exposição à luz e ao oxigênio, manuseando as

amostras no menor tempo possível. Em cada cadinho foram adicionados dois mililitros de dimetilformamida (DMF) p.a. e homogeneizado com pistilo. A suspensão foi transferida quantitativamente para um tubo de centrífuga, lavando o cadinho com poucos microlitros de DMF. A suspensão foi centrifugada em seguida por dez minutos a 10000 x g. O sobrenadante contendo os pigmentos foi transferido para um balão de cinco mililitros e o resíduo no tubo de centrífuga foi diluído novamente em dois mililitros de DMF. Após agitar, a suspensão foi centrifugada de novo por dez minutos a 10000 x g. O resíduo ficou incolor e o sobrenadante foi transferido para o balão de cinco mililitros, completando o volume com DMF. Uma alíquota dessa solução foi filtrada por uma membrana de PTFE de 0,22 µm e encaminhada imediatamente para a análise de HPLC, com injeção de 50 µL.

A análise de HPLC foi feita da mesma forma como descrito em 4.1.2.11. Os pigmentos que se espera encontrar em um extrato obtido pelo método descrito, são apresentados na ***tabela 4.***

Os pigmentos isolados foram identificados comparando seus espectros de absorbância e tempos de retenção com os de padrões de clorofila *a* (Sigma C5753, Sigma Chemicals Co. St. Louis, MO, USA) e clorofila *b* (Sigma C5878). Esses padrões são provenientes do espinafre e tem um grau de pureza de 99,99 %. Devido à inexistência de padrões dos derivados da clorofila no mercado, os padrões de feotitina *a* e *b* foram obtidos no laboratório por acidificação dos padrões de clorofila *a* e *b*, respectivamente, com duas gotas de 1M HCl, deixando-os por 15 min no escuro para garantir a completa remoção do átomo de magnésio do centro do anel pirrólico (SCHWARTZ *et al.*, 1981).

***Tabela 4*:** Pigmentos investigados nas amostras de sementes de soja.

Nome	Peso molecular (g/mol)	Fórmula química
Clorofila a	893,5	$C_{55}H_{72}MgN_4O_5$
Clorofila b	907,5	$C_{55}H_{70}MgN_4O_6$
Feofitina a	871,2	$C_{55}H_{74}N_4O_5$
Feofitina b	885,2	$C_{55}H_{72}N_4O_6$
Clorofilídeo a	615,0	$C_{35}H_{34}MgN_4O_5$
Clorofilídeo b	628,9	$C_{35}H_{32}MgN_4O_6$
Feoforbídeo a	592,7	$C_{35}H_{36}N_4O_5$
Feoforbídeo b	606,6	$C_{35}H_{34}N_4O_6$

Todos os pigmentos foram identificados de acordo com seus respectivos comportamentos cromatográficos, caracterizados pelo tempo de retenção e pelo espectro de absorção UV/Vis, na faixa de comprimento de onda entre 200 e 700 nm. O perfil espectral de cada substância encontrada foi sobreposto ao do padrão referencial correspondente, permitindo assim a identificação dos pigmentos.

As curvas padrão para clorofila *a* e *b* foram preparadas em triplicata entre 0,001-0,04 mg/mL e 0,001-0,015 mg/mL, respectivamente. As curvas das feofitinas *a* e *b* foram preparadas entre 0,001-0,04 mg/mL e 0,0002-0,003 mg/mL, respectivamente. Com as concentrações aplicadas e as áreas obtidas para cada pico, efetuou-se uma análise de regressão linear, obtendo-se assim as curvas padrão. Todas as curvas foram lineares com um coeficiente de correlação de no mínimo 0,9948. As áreas dos picos

encontrados nos extratos das amostras foram interpoladas nas curvas padrão para quantificar a concentração dos pigmentos existentes nas amostras analisadas. Em seguida, o teor do pigmento na amostra foi calculado levando em consideração todas as diluições feitas ao longo do procedimento. A unidade final dos cálculos foi dada em mg/kg em base seca.

4.2.2.4 Extração e análise de derivados incolores de clorofila por HPLC

Anteriormente à análise de NCC nas amostras do IAC, fez-se um teste para observar se seria possível moer e liofilizar a soja antes da extração para análise de compostos incolores. Assim, os produtos incolores da degradação da clorofila, que aparecem em concentrações muito baixas, apresentariam um enriquecimento e uma absorbância maior durante a análise por HPLC. O teste revelou que a liofilização prévia resultava em picos maiores e melhor separados dos derivados de interesse, o que resultou na modificação do protocolo, incluindo a liofilização prévia dos grãos.

A extração e separação dos derivados incolores foram realizadas conforme descrito no item 4.1.3.12, porém, a partir de dois gramas de soja moída e liofilizada, extraída com dez mililitros de solução metanol: tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0) (1:1 v/v) em tubos de centrífuga. As análises foram feitas em triplicata.

4.3 Tratamento estatístico dos dados

Os resultados obtidos são apresentados como média ± desvio padrão das análises em triplicata, quando não mencionado diferentemente. As diferenças entre os dados foram submetidos ao teste Tukey, com um intervalo de confidência de 0.95 (STATGRAPHICS, Versão 2,6).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Soja que sofreu déficit hídrico

5.1.1 Classificação dos grãos pela CEAGESP

As amostras de soja comercial que sofreram déficit hídrico foram classificadas oficialmente pela CEAGESP e apresentaram diferenças significativas quando comparadas com soja que cresceu sob condições climáticas normais. As sementes de todas as amostras encontravam-se fora do padrão de comercialização, que até muito recentemente era regido pela Portaria 262 do Ministério da Agricultura, de 23 de Novembro de 1983. De acordo com aquela norma era permitida umidade de 14 %, 30 % de grãos quebrados, 1 % de impurezas e matérias estranhas, 8 % de grãos avariados e 10 % de grãos esverdeados.

Na ***tabela 5*** são apresentadas as características das amostras de soja recebidas, de acordo com a legislação que estava vigente na época de recebimento destes grãos. A classificação havia sido feita pela CEAGESP, na época da colheita.

A tabela mostra que as amostras não atendem à Portaria da lei antiga, tanto no quesito de matérias estranhas e impurezas, como no quesito de grãos esverdeados. Se os grãos na hora da colheita fossem analisados seguindo a nova legislação vigente desde 2007 (Instrução Normativa nº 11 do Ministério da Agricultura, de 15 de maio de 2007), também estariam fora dos limites para comercialização, considerando os parâmetros de esverdeados, matérias estranhas e impurezas.

Tabela 5: Classificação das amostras de soja prejudicada por déficit hídrico, pela CEAGESP, conforme a portaria 262 do Ministério da Agricultura, de 23 de Novembro de 1983.

Variedade	BRS 184 a	BRS 184 b	BRS 133 a	BRS 133 b	COODETEC 201	Permitido no Brasil
Umidade	10,5 %	14,0 %	14,2 %	13,7 %	11,0 %	**14 %**
Matérias estranhas e impurezas	1,6 %	3,2 %	3,9 %	1,6 %	1,4 %	**1 %**
Partidos e quebrados	10,0 %	6,0 %	13,0 %	13,0 %	12,0 %	
Imaturos e chocos	0,5 %	4,5 %	1,0 %	2,0 %	4,0 %	
Ardidos	3,0 %	1,0 %	2,0 %	2,5 %	2,0 %	
Avariados	5,5 %	1,0 %	4,0 %	3,5 %	2,0 %	
Esverdeados	12,0 %	5,0 %	22,0 %	5,0 %	5,0 %	**10 %**

Verificou-se ainda que a soja que cresceu em condições climáticas adversas apresentou grãos pequenos e de aspecto anormal. Foi avaliado o peso de 100 sementes de cada uma das amostras, bem como de uma amostra de soja comercial que cresceu em condições adequadas (IAC-18) e que estava dentro dos padrões de comercialização. O peso médio das sementes prejudicadas foi de 14,2 ± 2,2 g/100 sementes, inferior à soja padrão com 17,5 ± 0,2 g/100 sementes **(*tabela 6*).** Em geral, quando a soja sofre déficit hídrico durante o enchimento de grãos, seus grãos são reduzidos em tamanho e peso (NOGUEIRA & NAGAI, 1988). Porém, os padrões de qualidade não mencionam restrições quanto ao tamanho do grão porque esse varia também em função dos diferentes cultivares.

Tabela 6: Peso de 100 sementes de soja prejudicada por déficit hídrico comparado com um controle de soja que cresceu em condições normais.

Variedade	Peso de 100 sementes (g)
BRS 184 a	14,69 ± 0,21
BRS 184 b	11,98 ± 0,58
BRS 133 a	14,73 ± 0,39
BRS 133 b	11,37 ± 0,07
COODETEC 201	15,20 ± 0,49
Controle (IAC-18)	17,49 ± 0,22

Médias de análises em triplicata, com desvio padrão

5.1.2 Presença de pigmentos verdes

A presença de clorofilas foi medida por espectrofotometria diretamente após a colheita e após 20 meses de estocagem a temperatura ambiente.

A análise imediatamente após a colheita revelou teores variáveis de clorofilas em todas as amostras, com uma média de 4,88 ± 1,48 mg/kg (***tabela 7***). Observou-se que os pigmentos verdes encontravam-se acumulados debaixo da casca do grão, dando uma aparência verde às sementes. Essa heterogeneidade da distribuição das clorofilas levou a um elevado número de grãos verdes na classificação pela CEAGESP, embora a concentração da clorofila por peso de semente tenha sido relativamente baixa, já que essa classificação foi feita de forma empírica e visual, levando em conta apenas a cor da semente. Por isso, a análise por espectrofotometria revelou teores menores do que era esperado em amostras com 5 a 22 % de grãos verdes.

Sementes maduras, em estádio de maturação comercial (R_8 na escala de FEHR & CAVINESS), geralmente contêm concentrações de clorofila inferiores a um miligrama por quilograma. Por isso, uma propriedade importante para a avaliação da

qualidade dos grãos é o seu estádio de maturação. Conseqüentemente, a presença de grãos verdes geralmente é considerada um indicador de imaturidade dos grãos. No entanto, a retenção da cor verde pode também ser resultado de condições inapropriadas de secagem pós-colheita, ou resultado de uso de dessecantes, aplicadas na cultura no campo para provocar a queda das folhas. Teores elevados de clorofilas são prejudiciais para a indústria produtora de óleos, uma vez que esses pigmentos podem atuar como pró-oxidantes, reduzindo assim a estabilidade oxidativa e a vida de prateleira dos óleos (TAUTORUS & LOW, 1993).

Nestas amostras de soja que cresceram sob condições de déficit hídrico, a clorofila foi retida mesmo no estado maduro do grão. Provavelmente a pequena precipitação no período de maturação causou a inativação das enzimas responsáveis pela degradação da clorofila. Contudo, observou-se que ao longo do período de armazenamento houve desaparecimento quase total da clorofila, o que fez com que os grãos adquirissem coloração amarela típica, similares a de grãos que cresceram em condições normais**.**

Tabela 7: Quantidade de clorofila na soja prejudicada por déficit hídrico, após colheita e após armazenamento.

Variedade	**Clorofila total (mg/kg)**	
	Após colheita	**Após 20 meses**
BRS 184 a	6,253	0,015
BRS 184 b	4,089	0,014
BRS 133 a	4,993	0,004
BRS 133 b	2,809	0,003
COODETEC 201	6,269	0,027

Todavia, cumpre observar que a análise de pigmentos por espectrofotometria fornece dados relativos ao conteúdo total de pigmentos esverdeados, incluindo clorofila *a*, clorofila *b* e seus derivados, como feofitinas e feoforbídeos, e não diferencia individualmente entre os seus componentes, uma vez que seus espectros e máximos de absorbância são muito parecidos. Por isso, foi necessário fazer uma análise por HPLC, para identificar os pigmentos presentes nas amostras.

A separação dos pigmentos por HPLC revelou que imediatamente após a colheita, os pigmentos predominantes já não eram mais clorofilas. A maioria dos pigmentos nas sementes verdes já se encontrava na forma de feofitina *a*, seguida por feofitina *b*. Foram encontradas apenas pequenas quantidades de clorofila *a* e *b* intactos, além de traços de outros derivados de degradação, como clorofilídeos e feoforbídeos. Os teores anormalmente altos de feofitinas nestes grãos provavelmente eram devidos ao meio ácido que causou a remoção do átomo de magnésio do centro da molécula, formando feofitinas, e não causado pela enzima Mg-dequelatase. A explicação mais plausível para a feofitinização é que o déficit hídrico prejudicou o desenvolvimento dos grãos durante sua maturação e causou desorganização das membranas celulares e aumento de permeabilidade o que levou a um abaixamento do pH e promoveu a transformação de clorofila para feofitina (SCHWARTZ & LORENZO, 1991).

O perfil incomum de pigmentos com a predominância de feofitinas já foi reportado na literatura (SINNECKER *et al*, 2005). Nesse trabalho, os autores descreveram altos teores de feofitinas em soja colhida em diferentes estádios de maturação e seca a 40°C ou temperaturas mais altas. Os autores ainda concluíram que ocorreu uma feofitinização e que as feofitinas não são degradadas para metabólitos incolores.

A análise após 20 meses de armazenamento revelou que a maioria dos pigmentos verdes havia desaparecido, provavelmente devido a uma atividade enzimática residual, uma vez que a atividade de água se situou ao redor de 0,6 e 0,7. Esta atividade enzimática permitiu a transformação de clorofila *b* para clorofila *a* pela clorofila *b* redutase (ROCA *et al*, 2004) e subseqüentemente a degradação para clorofilídeo *a* e feoforbídeo *a* pelas enzimas clorofilase e Mg-dequelatase, respectivamente. Em seguida, a feoforbídeo *a* monoxigenase produziu os RCC, e a RCC- redutase formou os FCC (HÖRTENSTEINER *et al*, 1998). No último passo formaram-se os NCC sem participação conhecida de enzimas.

Após 20 meses de armazenamento somente traços de clorofilas foram encontrados e as sementes haviam adquirido uma cor amarelada, similar à cor de soja madura que cresceu sob condições normais.

É importante ressaltar, que a concentração da luteína, pigmento amarelo predominante nas sementes de soja, não diminuiu durante o tempo de armazenamento.

Na ***figura 9*** são apresentados os índices pluviométricos da região de Palmital, São Paulo, incluindo o volume de chuva e as temperaturas mínimas e máximas, no período em que a soja foi produzida. O gráfico ilustra uma relevante falta de precipitação que se estendeu durante todo o mês de fevereiro e o início de março daquele ano. Nesse estádio avançado da maturação da soja a degradação da clorofila normalmente se encontra mais pronunciada. A deficiência de chuva acompanhada por temperaturas altas e a rápida perda de água das sementes nessa situação específica suporta a hipótese de ter causado redução parcial da atividade das enzimas envolvidas na degradação da clorofila, o que promoveu a feofitinização química. É importante ressaltar, que cada enzima tem suas características próprias e diferentes sensibilidades a

condições climáticas e déficit hídrico, tendo suas atividades diferentemente influenciadas por esses fatores.

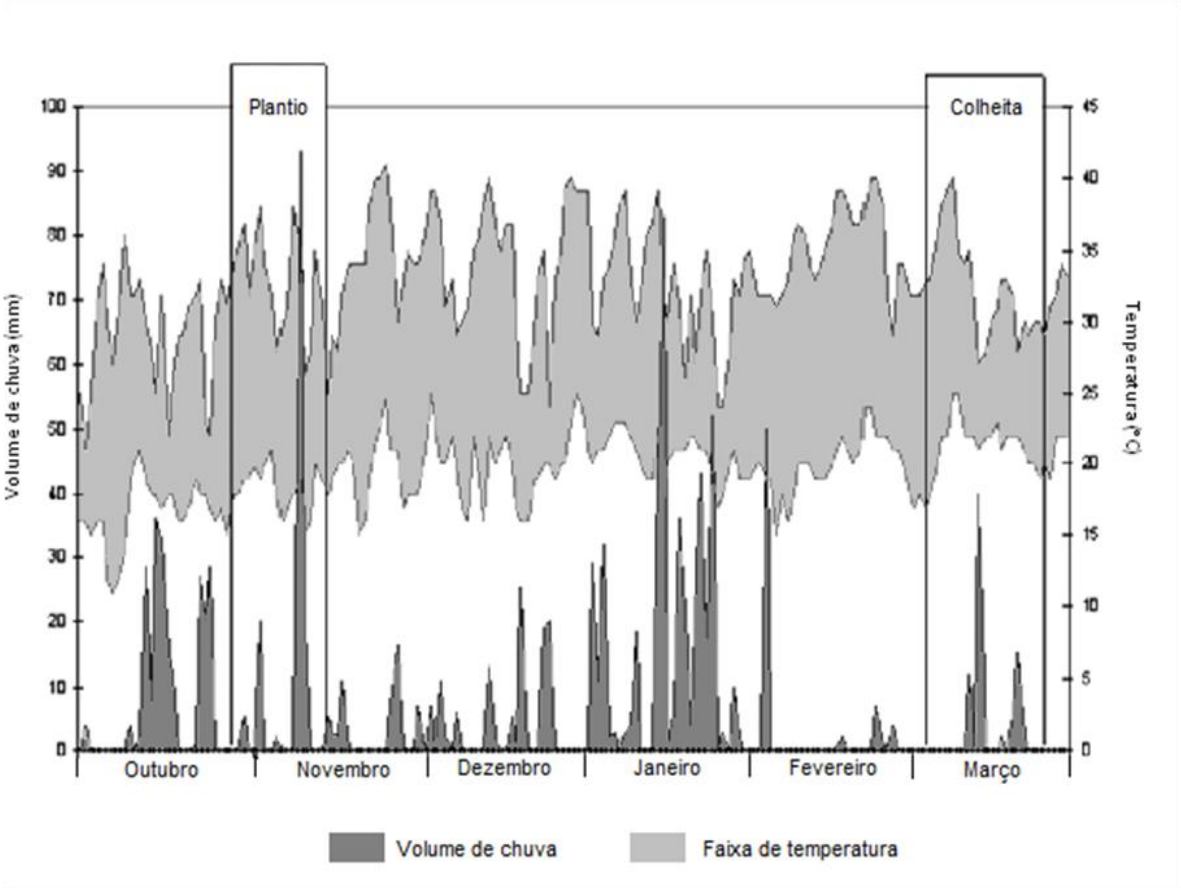


Figura 9: Volume de precipitação e temperaturas na região Palmital de outubro 2004 a março 2005.

5.1.3 Atividade da lipoxigenase 1

A atividade da lipoxigenase 1 foi avaliada como indicador da atividade enzimática endógena nos grãos. A atividade foi medida após a colheita e subseqüente secagem a 100°C e após o armazenamento de 20 meses. As amostras tiveram atividades variáveis, dependendo da variedade, entre 7,9 e 14,8 U/mg b.s. após a colheita e secagem (***tabela 8***). Estes valores representam apenas 30 % a 50 % da atividade enzimática encontrada em soja que cresceu sob condições normais e foi utilizada como

controle, que teve atividade de cerca de 25 U/mg de amostra em base seca. Os teores de atividade enzimática na soja prejudicada foram também inferiores a dados de literatura que descreveram teores de aproximadamente 20 U/mg b.s. (RICE *et al*, 1981). A baixa atividade enzimática logo após a colheita parece ser devido à secagem a qual os grãos foram submetidos, e não parece estar relacionada com o déficit hídrico, pois os valores são parecidos com os valores de uma amostra controle de soja que cresceu em condições adequadas e foi seca a 60°C. A redução da atividade da lipoxigenase por secagem a altas temperaturas foi reportado por RICE *et al*.,(1981).

Após o armazenamento aparentemente houve diminuição na atividade da lipoxigenase, com exceção das duas amostras da variedade BRS 184, que apresentaram aparentemente aumento da atividade enzimática. Infelizmente, até o momento não foi possível encontrar uma explicação para este aumento da atividade enzimática nessas amostras. No entanto, os desvios padrão das amostras foram muito altos. Foi necessário fazer uma análise em quadruplicata para diminuir o desvio, mas mesmo assim os valores variam muito. Porém, apesar das diferenças encontradas na atividade enzimática das variedades, foi possível encontrar uma atividade residual em todas as amostras.

Tabela 8: Comparação da atividade da lipoxigenase em soja prejudicada por déficit hídrico, depois da colheita e depois de 20 meses de armazenamento.

Variedade	**Atividade LOX 1 (U/mg** b.s.**)** **Após colheita***	**Atividade LOX 1 (U/mg** b.s.**)** **Após 20 meses***
BRS 184 a	11,16	14,30
BRS 184 b	10,60	12,54
BRS 133 a	13,53	5,28
BRS 133 b	14,76	8,50
COODETEC 201	7,89	4,50

* Resultados expressos como média de análises realizadas em quadruplicata

5.1.4 Análise de acidez e peróxidos

A acidez das amostras foi medida após a colheita, e após 20 e 30 meses de armazenamento a temperatura ambiente. Os resultados estão apresentados na ***tabela 9***. A acidez em todas as amostras aumentou significativamente durante a estocagem o que indica atividade de lipases, responsáveis pela hidrólise de triacilgliceróis.

Por outro lado, em nenhum dos óleos extraídos das amostras de soja após a colheita e após 20 meses de armazenamento foi possível detectar peróxidos. Este resultado indica que a presença de compostos antioxidantes, como por exemplo, a luteína presente em elevadas concentrações na soja, conferiu proteção contra a autooxidação durante o período de armazenamento.

Tabela 9: Acidez em % medida nas amostras após a colheita e após 20 e 30 meses de armazenamento a temperatura ambiente.

	Acidez (%)				
	BRS 184a	**BRS 184b**	**BRS 133a**	**BRS 133b**	**COODETEC 201**
Após colheita	$1,41^{a} \pm 0,07$	$1,42^{a} \pm 0,24$	$1,32^{a} \pm 0,12$	$1,29^{a} \pm 0,06$	$1,11^{a} \pm 0,21$
Após 20 meses	$1,76^{a} \pm 0,47$	$2,76^{b} \pm 0,07$	$2,93^{b} \pm 0,13$	$3,32^{b} \pm 0,15$	$1,84^{b} \pm 0,02$
Após 30 meses	$3,42^{b} \pm 0,04$	$3,46^{b} \pm 0,69$	$3,49^{c} \pm 0,03$	$3,92^{c} \pm 0,09$	$2,53^{c} \pm 0,01$

Médias de análises em triplicata, com desvio padrão
Médias com letra diferente na mesma coluna tem diferença significativa no nível de 0.05 no teste de Tukey

5.1.5 Análise de proteínas, lipídeos, atividade de água e umidade

Na ***tabela 10*** são apresentados os resultados referentes à análise química e de atividade de água das cinco amostras de soja analisadas. Essa análise foi feita para

identificar a eventual imaturidade dos grãos na data da colheita. No entanto, os valores médios de lipídeos totais foram de 20,02 a 25,15 g/100g, e os valores de proteínas encontrados nas amostras foram de 33,23 a 35,69 g/100g.

Tabela 10: Teores de proteínas, lipídeos e atividade de água na soja recém-colhida, prejudicada pelo déficit hídrico.

Variedade	Proteínas (g/100g soja b.s.)	Lipídeos (g/100g soja b.s.)	Atividade de água
BRS 184 a	35,69 ^{a} ± 1,24	20,02 ^{a} ± 0,26	0,60 ^{a} ± 0,01
BRS 184 b	34,00 ^{a} ± 0,48	22,81 ^{b} ± 0,84	0,68 ^{b} ± 0,00
BRS 133 a	35,60 ^{abc} ± 1,76	22,96 ^{b} ± 0,74	0,70 ^{d} ± 0,01
BRS 133 b	33,23 ^{a} ± 0,53	25,15 ^{c} ± 1,27	0,61 ^{d} ± 0,01
COODETEC 201	35,45 ^{bc} ± 0,67	24,47 ^{bc} ± 0,46	0,70 ^{a} ± 0,01

Medias de análises em triplicata, com desvio padrão
Médias com letra diferente nas colunas têm diferença significativa em nível de 0,05

Os valores não diferiram significativamente dos conteúdos conhecidos para soja que cresceu sob condições normais. Em média, a soja contém 40,5 % de proteína e 22,1 % de lipídeos (TABELA BRASILEIRA DE COMPOSIÇÃO DE ALIMENTOS da USP). A TABELA BRASILEIRA DE COMPOSIÇÃO DE ALIMENTOS da UNICAMP (http://www.unicamp.br/nepa/taco) reporta valores de 14,6 % de lipídeos e 36,0 % de proteínas para farinha de soja brasileira. Na tabela de nutrição e composição de alimentos de SOUCI, FACHMANN & KRAUT (2007) constam valores médios de 18,1 % para lipídeos e 33,7 % para proteínas. Aparentemente o déficit hídrico não interferiu na síntese de lipídeos e proteínas, o que implica que os grãos no momento em que ocorreu o déficit hídrico já haviam alcançado a sua maturidade fisiológica. Por isso, a retenção de pigmentos verdes nos grãos não é devido à imaturidade, mas parece estar causado pelo déficit hídrico que ocorreu no período da maturação.

A análise de atividade de água revelou valores entre 0,60 e 0,70 em todas as amostras o que é uma faixa em que a atividade de algumas enzimas pode estar prejudicada, mas não totalmente inibida.

A umidade das sementes foi medida na hora do recebimento das amostras e após 20 meses de armazenamento (***tabela 11***). Na época da colheita os grãos apresentaram conteúdos de umidade inferiores a 14 g/100g, exigidos pela legislação para o armazenamento seguro. Os valores estavam entre 8,7 e 11,9 g/100g e foram mantidos durante todo o período em que os grãos haviam sido armazenados à temperatura ambiente, mostrando apenas uma ligeira queda, chegando a umidades de 8,5 a 11,3 g/100g. Por isso, o decaimento da umidade pode ser considerado insignificante e os valores de atividade enzimática e concentrações de pigmentos são comparativos sem necessidade de considerar as umidades das amostras.

Tabela 11: Umidade das amostras de soja após a colheita e após 20 meses de armazenamento.

	Umidade (g/100g)	
Variedade	**Após colheita**	**Após 20 meses**
BRS 184 a	8,7	8,5
BRS 184 b	10,8	10,3
BRS 133 a	11,9	10,2
BRS 133 b	11,8	11,3
COODETEC 201	9,5	9,4

5.1.6 Análise de compostos incolores da degradação da clorofila

Pelo fato do armazenamento ter levado ao desaparecimento dos pigmentos verdes, foi realizada análise dos extratos por HPLC para verificar se houve formação de catabólitos incolores, não-fluorescentes da clorofila (NCC), após 20 meses de armazenamento a temperatura ambiente. Nesta análise foram separadas, a partir de todas as amostras, pequenas quantidades de frações com características espectrais similares aos NCC. A identificação presumida dessas substâncias foi feita por comparação dos seus espectros e máximos de absorção com aqueles de NCC que já foram mencionados na literatura (BERGHOLD *et al*, 2002). Na ***Figura 10 (A-C)*** é mostrado um cromatograma representativo da amostra COODETEC 201. Nesta amostra foram encontrados ao redor de 15 picos cujos espectros foram avaliados individualmente. Quatorze picos apresentavam um espectro com máximos de absorbância em 329 ou 332 nm, enquanto apenas um pico apresentava espectro com máximo de absorbância em 320 nm, que é reportado na literatura como sendo característico de NCC. Na ***Figura 10-B*** e ***C*** são mostrados exemplos dos espectros mencionados.

Os NCC já mencionados na literatura têm um máximo de absorbância característico em 320 nm e são parecidos com o espectro da ***Figura 10-C***. O espectro apresentado na ***Figura 10-B*** tem um máximo de absorbância em 329 nm, que não é descrito na literatura como sendo característico para os NCC, porém, chamou atenção a repetida presença de frações com este espectro nas amostras analisadas.

A presença de derivados incolores da clorofila nas sementes depois de um longo período de armazenamento a temperatura ambiente indica que as enzimas envolvidas na degradação da clorofila ainda são ativas, já que os NCC são produtos da abertura

oxigenolítica da molécula da clorofila, via atividade enzimática. Além disso, a degradação das clorofilas e subseqüentemente das NCC não é completa em grãos de soja que sofreram déficit hídrico. Nesse caso, parece haver um acúmulo de NCC. Os NCC são considerados os produtos finais da degradação da clorofila e de acordo com alguns trabalhos publicados, seriam armazenados nos vacúolos das células (OBERHUBER *et al.*, 2003). Entretanto, este acúmulo ainda necessita de confirmação, uma vez que já foram encontradas estruturas monopirrólicas de degradação da clorofila (KRÄUTLER, 2006).

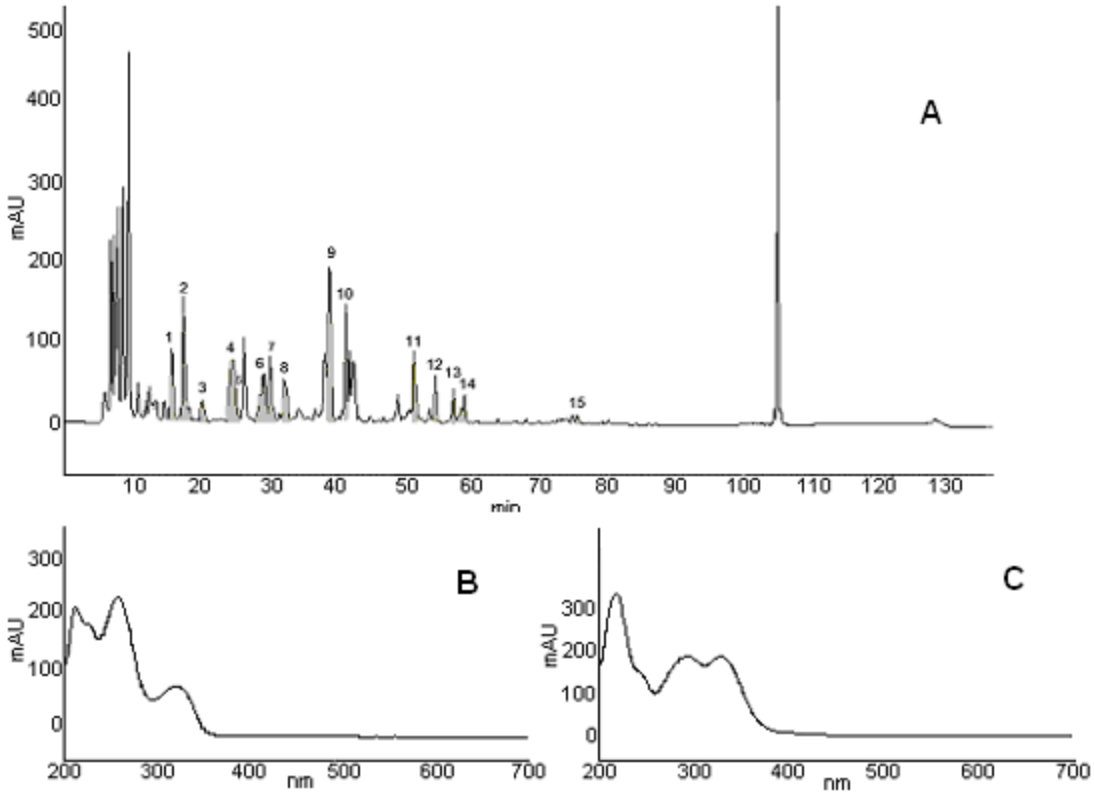


Figura 10 **[*A-C*]**: Análise de derivados incolores por HPLC, de soja prejudicada por déficit hídrico. **[*A*]** Cromatograma típico com os picos numerados representando frações com máxima de absorção de 329 nm, exceto pico 11 com máximo de absorção em 320 nm; **[*B*]** Espectro representativo de todos os picos com máximos de absorção em 218, 295 e 329 nm; **[*C*]** Espectro do pico 11 com máximos de absorção em 212, 256 e 320 nm.

5.2 Soja cultivada em condições normais de irrigação

5.2.1 Umidade e atividade de água

A ***Tabela 12*** mostra a umidade e atividade de água dos grãos no momento da colheita. Todas as médias apresentaram um coeficiente de variação menor que 5 %.

A umidade e a atividade de água diminuíram constante- mas lentamente, até a quinta colheita, havendo uma diminuição de 19 % em 18 dias, e depois uma queda rápida até o estádio R_8, com uma perda de 30 % em apenas quatro dias. Quando as sementes atingiram o estádio R_8 ainda apresentaram um valor elevado (40,64 ± 1,74 %), devido ao elevado índice de precipitação no período da última colheita.

Tabela 12: Umidade e atividade de água das amostras de soja IAC-18.

Colheita	Umidade (g/100g)	Atividade de água
101 d	71,61 ± 0,35	0,955 ± 0,017
105 d	68,53 ± 1,75	0,965 ± 0,013
109 d	65,18 ± 0,85	0,959 ± 0,016
114 d	63,03 ± 2,06	0,981 ± 0,002
119 d	57,85 ± 1,16	0,966 ± 0,016
123 d	40,64 ± 1,74	0,917 ± 0,001

Valores médias de análises em triplicata, com desvio padrão

Estes valores podem variar em função das condições climáticas e da variedade da soja (MARCOS FILHO, 1986). Conforme a tabela de FEHR & CAVINESS, os grãos atingem sua maturação comercial cerca de quatorze dias após a maturação fisiológica (R_8), e devem apresentar umidade inferior a 13 %.

A brusca perda de umidade observada nos dois estádios finais da maturação, comparada à lenta perda de umidade nos estádios iniciais, ocorreu pela interrupção de translocação de água e matéria orgânica para as sementes, fato que ocorre a partir da maturação fisiológica. A planta inicia a senescência e perde água por transpiração.

Segundo PRITCHARD (1983) os grãos devem atingir um grau de umidade igual ou inferior a 13 % para evitar a deterioração por reações enzimáticas ou por desenvolvimento de microrganismos e fungos, que produzem lipases hidrolíticas e, conseqüentemente, aumentam o teor de ácidos graxos livres. Porém, mesmo colhendo a soja no estádio de maturação R_8, não se tem a garantia de obter sementes com conteúdo de umidade adequado, já que este pode mudar conforme os índices pluviométricos na época de colheita.

As amostras que foram submetidas à secagem pós-colheita a 40 e 60°C foram analisadas para medir o teor de umidade residual depois da secagem em cada estádio de maturação. Os resultados estão apresentados na ***tabela 13.***

Tabela 13: Umidade e atividade de água nas amostras de soja IAC-18, após serem submetidos à secagem a 40 e 60 °C.

	Soja seca a 40°C		**Soja seca a 60°C**	
Colheita	**Umidade (g/100g)**	**Atividade de água**	**Umidade (g/100g)**	**Atividade de água**
101 d	8,23 ± 0,29	0,474 ± 0,003	6,28 ± 0,03	0,396 ± 0,008
105 d	8,22 ± 0,09	0,469 ± 0,012	7,42 ± 0,12	0,476 ± 0,003
109 d	8,50 ± 0,26	0,484 ± 0,004	7,15 ± 0,04	0,479 ± 0,003
114 d	10,91 ± 0,40	0,561 ± 0,003	5,74 ± 0,13	0,353 ± 0,010
119 d	12,68 ± 0,23	0,655 ± 0,008	7,46 ± 0,22	0,448 ± 0,005
123 d	7,28 ± 0,13	0,434 ± 0,004	5,58 ± 0,18	0,322 ± 0,004

Médias de análises em triplicata ± desvio padrão

Todos os tratamentos de secagem garantiram um teor de umidade seguro para comercialização e estocagem dos grãos; ou seja, abaixo de 13 %. A secagem a 60°C diminuiu a umidade mais fortemente do que a secagem a 40°C. Os grãos que foram secos a 40 e 60°C apresentaram um leve escurecimento na superfície após a secagem, mais pronunciado nas sementes secas a 60°C do que naquelas que foram secas a 40°C. Aqui provavelmente ocorreram reações de escurecimento não-enzimático, como a reação de Maillard ou Strecker.

5.2.2 Teor de proteínas

Com relação ao teor de proteínas, observou-se que durante a maturação, a partir da segunda colheita, não houve diferença significativa entre as amostras (***tabela 14***). Apenas a primeira colheita diferenciou-se com um menor teor de proteínas. Concluiu-se que essa amostra foi colhida em um estádio muito imaturo, onde a síntese protéica ainda não tinha sido concluída. Esse dado é importante para as conclusões a serem tiradas quanto às atividades enzimáticas das amostras.

Tabela 14: Teor protéico nas amostras de soja IAC-18, em base seca.

Dias após semeadura	Teor de proteínas (%, b.s.)
101 d	$33{,}96^{a} \pm 0{,}55$
105 d	$39{,}69^{b} \pm 1{,}81$
109 d	$40{,}13^{b} \pm 0{,}60$
114 d	$39{,}72^{b} \pm 1{,}49$
119 d	$40{,}86^{b} \pm 0{,}45$
123 d	$39{,}58^{b} \pm 1{,}41$

Médias de análises em triplicata, com desvio padrão
Médias com letra diferente têm diferença significativa no nível 0,05 (teste Tukey)

5.2.3 Teores de clorofila analisados por espectrofotometria

A análise da concentração das clorofilas por espectrofotometria revelou rápida redução dos teores dos pigmentos verdes durante o processo de maturação **(*Figura 11*)**.

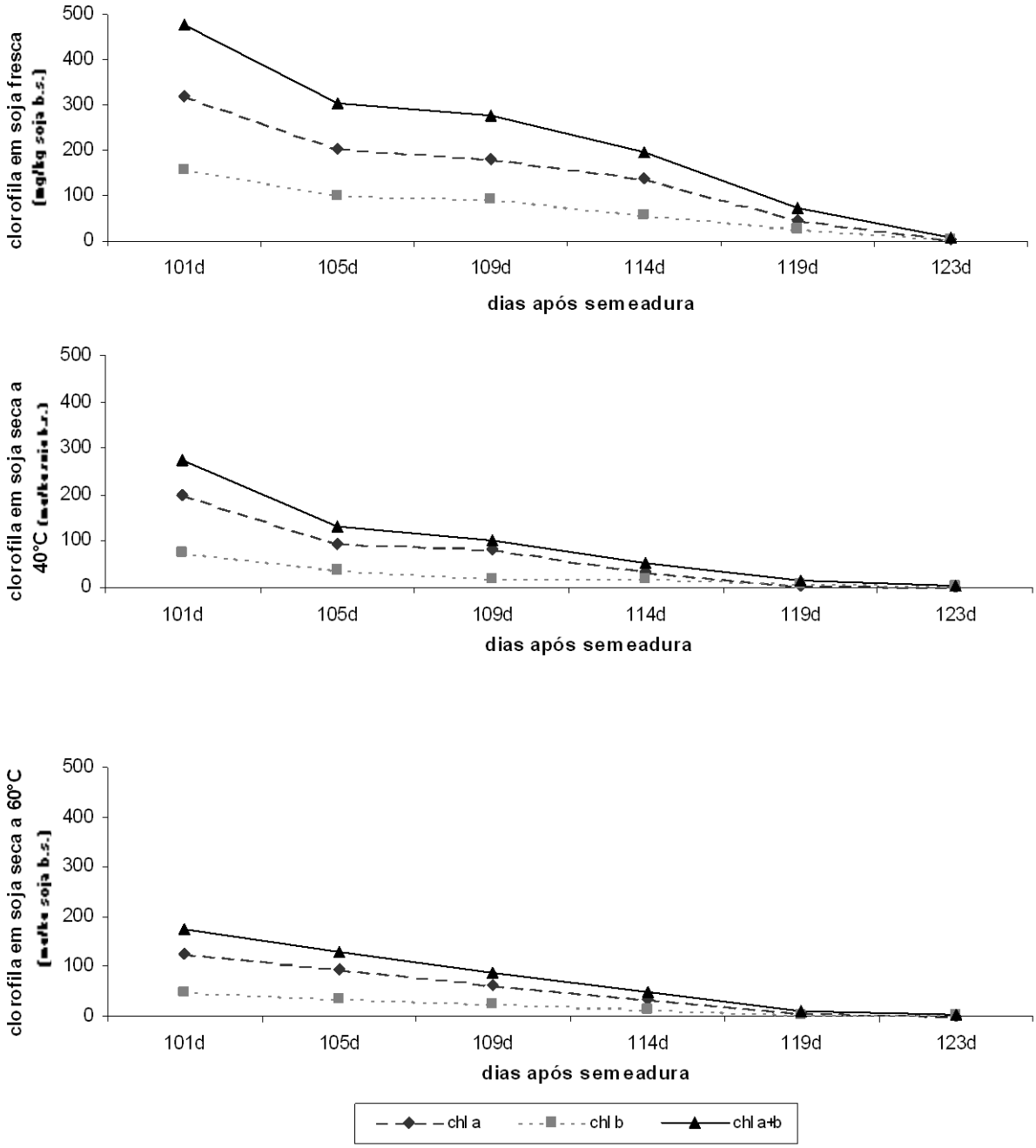


Figura 11: Teores de clorofila durante a maturação das sementes de soja IAC-18 fresca e influência da secagem pós-colheita a 40 e 60°C, medidos por espectrofotometria.

.

A secagem pós-colheita a 40°C diminuiu a concentração de clorofila em aproximadamente 43 %, enquanto a 60°C houve degradação de 63 % no primeiro ponto de colheita. Porém, essa diminuição pode ser resultado de uma desnaturação das proteínas às quais a clorofila está ligada, provocado pela temperatura alta de 60°C, e que dificultou a extração dos pigmentos.

É importante lembrar, que o método espectrofotométrico usado foi desenvolvido para a análise apenas de clorofilas e não considera a presença de outros pigmentos verdes na amostra. O método não diferencia entre clorofilas e feofitinas e outros derivados que possuem um espectro de absorbância muito parecido com o das clorofilas. Por isso, o método não é adequado para a identificação dos pigmentos, e é usado apenas para quantificar a soma de pigmentos verdes. A separação por HPLC é indispensável para a identificação e quantificação dos pigmentos.

5.2.4 Análise da concentração de clorofila e derivados verdes por HPLC

A separação dos pigmentos verdes por HPLC foi realizada para identificar e quantificar os pigmentos presentes nos extratos de soja. Na ***Figura 12*** é apresentado um cromatograma representativo de um extrato de sementes de soja IAC-18 da primeira colheita (101 dias após a semeadura), secas a 60°C, contendo ainda grande concentração dos pigmentos.

O cromatograma ilustra a complexidade dos extratos, devido à diversidade dos compostos existentes, mas também demonstra a boa separação dos picos. Independente do estádio de maturação, os pigmentos mais freqüentemente encontrados e em maior abundância foram luteína, clorofila *a*, clorofila *b*, feofitina *a* e feofitina *b*, em ordem

decrescente. Os tempos de retenção foram de 19 min para a luteína, 21 min para a clorofila *b*, 23 min para a clorofila *a*, 30 min para a feofitina *b* e 33 min para a feofitina *a*. Alguns outros picos menores, que não foram identificados, parecem ser xantofilas, por comparação com dados na literatura. Esses são eluídos entre 15 e 18 minutos. De modo geral, ao longo da maturação, a quantidade de clorofilas e derivados coloridos decresceu. Os pigmentos encontrados nestes experimentos e a ordem de eluição foram os mesmos daqueles encontrados por MANGOS & BERGER (1997), porém os tempos de retenção foram ligeiramente diferentes, porque o gradiente utilizado nesse trabalho diferiu do gradiente usado por MANGOS & BERGER (1997).

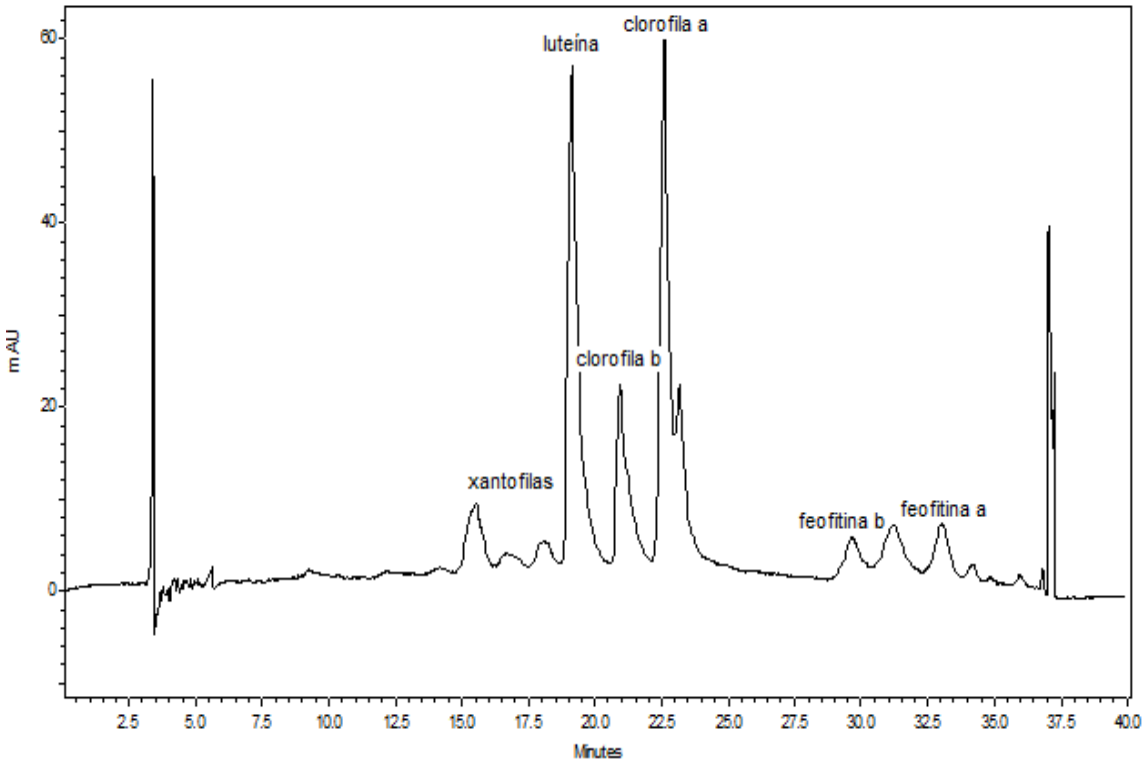


Figura 12: Cromatograma representativo de análise por HPLC de extrato de soja colhida 101 dias após a semeadura e seca a 60°C.

A confirmação da identidade desses compostos foi realizada pela comparação das características espectrais de absorção e do tempo de retenção com as dos padrões.

Os padrões obtidos segundo item 4.2.2.4, foram utilizados para a quantificação dos principais pigmentos existentes nas amostras. Na ***Tabela 15*** estão apresentadas as regressões lineares obtidas das curvas de calibração para clorofila *a*, clorofila *b*, feofitina *a* e feofitina *b*. As concentrações de cada padrão nas soluções utilizadas para a construção das curvas foram adequadas aos valores encontrados nas amostras. As curvas padrão tiveram uma alta linearidade, como pode ser observado na ***Tabela 15***. Os valores dos coeficientes de determinação R^2 foram superiores a 0,9693.

Tabela 15: Concentrações, equações e coeficientes de determinação dos padrões utilizados.

Pigmento	Concentração (mg/mL)	**y** = a**x** + b	R^2
Clorofila a	0,001-0,04	y = 2E+09x - 71617	0,9994
Clorofila b	0,001-0,015	y = 1E+09x - 2265,7	0,9997
Feofitina a	0,001-0,04	y = 3E+09x - 88321	0,9948
Feofitina b	0,0002-0,003	y = 8E+09x - 24890	0,9693

y=concentração (mg/mL)
x= área do pico

Os espectros de absorção (UV/Vis) dos padrões de clorofila *a*, clorofila *b* (Sigma), e feofitina *a* e feofitina *b* são apresentados na ***figura 13*** e na ***figura 14*** são apresentadas as curvas padrão.

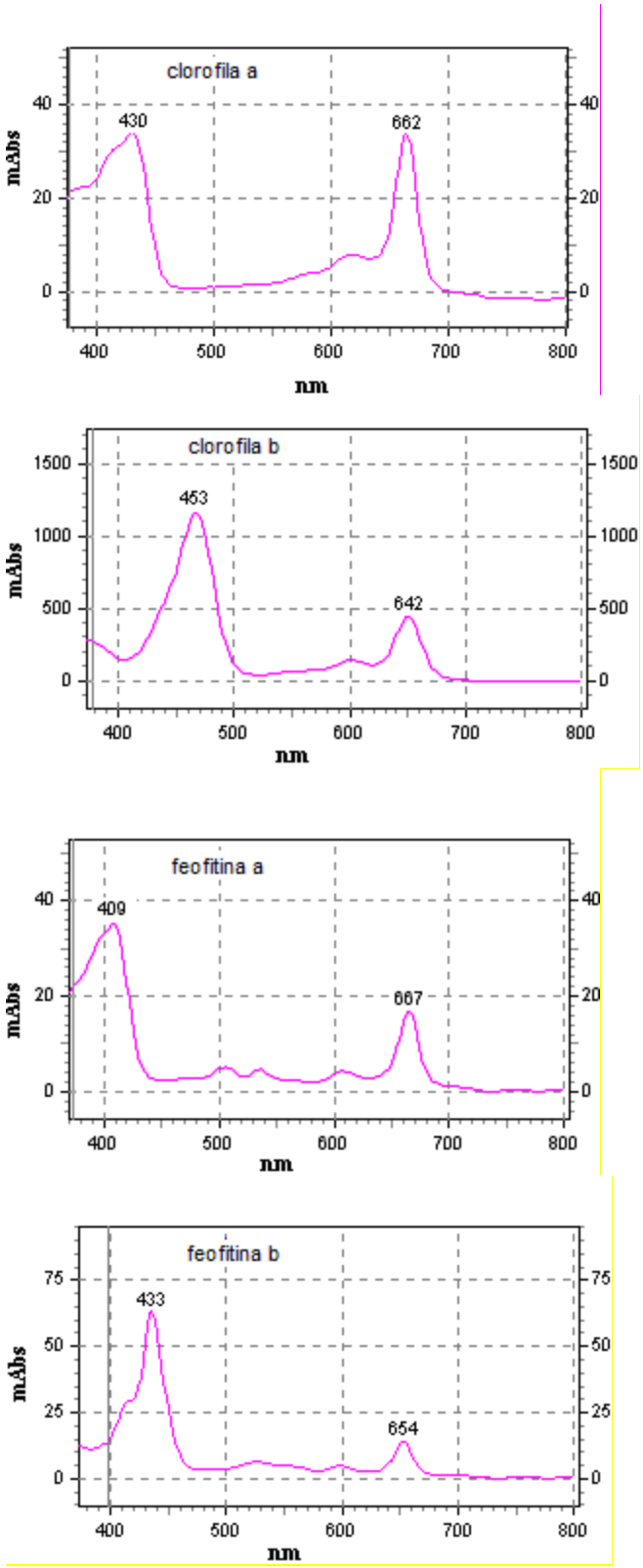


Figura 13: Espectros de absorção visível obtidos para clorofila *a*, clorofila *b*, feofitina *a* e feofitina *b*.

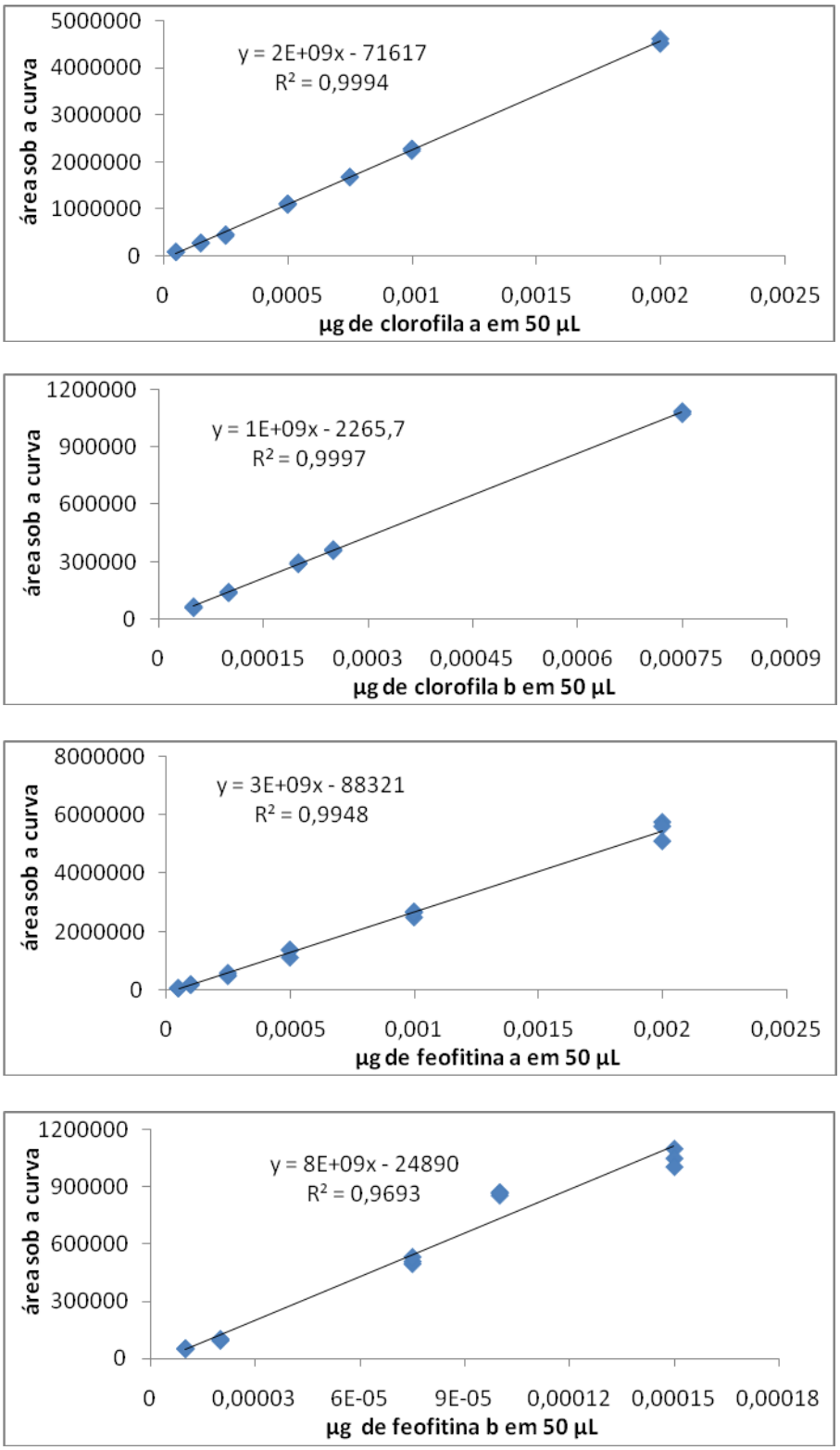


Figura 14: Curvas padrão dos pigmentos clorofila *a*, clorofila *b*, feofitina *a* e feofitina *b*.

A ***Figura 15*** apresenta os teores de clorofilas encontrados nas amostras de soja frescas.

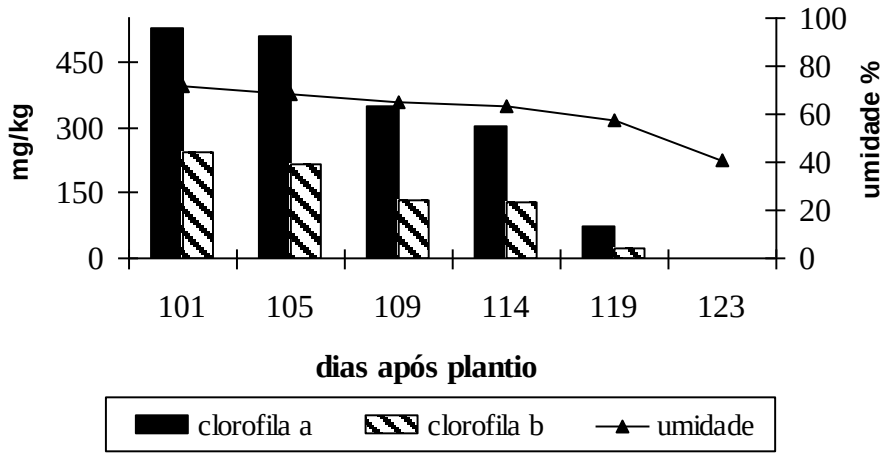


Figura 15: Teores de clorofilas e de umidade de soja IAC-18, durante o período de maturação, medidos por HPLC.

Nas amostras frescas, que foram analisadas nos estádio de maturação entre R_6 e R_8 para investigar as alterações dos pigmentos durante a maturação no campo, apenas as clorofilas *a* e *b* foram encontradas em concentrações significativas durante todo o período de maturação.

Os teores de clorofilas *a* e *b* no primeiro ponto de colheita (101 dias, referente ao estádio R_6) foram muito altos, 527,7 ± 21,6 mg/kg e 243,4 ± 11,1 mg/kg, respectivamente.

No segundo ponto de colheita (105 dias), os teores ainda continuavam similares e somente a partir de 109 dias após a colheita observou-se lenta redução nos teores de clorofilas.

Era de se esperar que a degradação da clorofila fosse acompanhada de síntese de feofitina, aumentando os seus teores numa proporção inversa, ou então, que houvesse,

paralelamente, formação de outros derivados provenientes de degradação por via enzimática (clorofilídeos e feoforbídeos). Porém, esses pigmentos não foram encontrados, o que sugere que a síntese de feofitina é acompanhada de uma rápida degradação, provavelmente por via enzimática, e não se consegue observar o seu acúmulo. Essas substâncias podem ter sido formadas e subseqüentemente degradadas imediatamente para compostos incolores, de forma que não foi possível detectá-las. Isso implica que as reações enzimáticas de degradação natural da clorofila funcionaram normalmente. Como as umidades foram altas quando a soja foi colhida prematuramente, as enzimas tiveram atividade normal e degradaram as clorofilas até as sementes atingirem maturidade comercial (R_8), 123 dias após a semeadura. Dados na literatura mostram que após atingir o estádio R_8, dentro de aproximadamente duas semanas a umidade decai drasticamente, a atividade enzimática é inibida e os grãos atingem a maturidade comercial com umidades inferiores a 13 % (FEHR & CAVINESS, 1977).

Esses resultados, com ausência de feofitinas detectáveis, são diferentes aos reportados por CENKOWSKI *et al.* (1993) e por JOHNSON-FLANAGAN & THIAGARAJAH (1990), que estudaram o amadurecimento de sementes de canola. Estes autores observaram teores de feofitina e outros derivados defitilados nas amostras frescas, porém significativamente menores (cerca de 80 vezes) do que os de clorofila. Vários trabalhos com espinafre (TENG & CHEN, 1999), azeitona (MÍNGUEZ-MOSQUERA *et al.*, 1994), feijão verde (MONREAL *et al.*, 1999; CANO *et al.*, 1998) e salsa (YAMAUCHI & WATADA, 1993), mostraram que grande parte da clorofila foi preferencialmente convertida em feofitina e uma menor porcentagem foi convertida em derivados defitilados, sugerindo diferentes vias de degradação da clorofila. Provavelmente no presente trabalho as feofitinas e outros

derivados da degradação da clorofila estiveram presentes, porém em concentrações tão baixas que não foi possível detectá-las.

Outra possibilidade seria a degradação da clorofila para outras substâncias, que não a feofitina. Apesar da umidade alta, que facilita uma degradação por via enzimática, não foram encontrados catabólitos defitilados, (clorofilídeos e feoforbídeos), que indica que não houve ação da enzima clorofilase. Outros autores (TAKAMYIA *et al.*, 2000; HEATON & MARANGONI, 1996;) relataram a possibilidade de outras enzimas, além da clorofilase, estarem atuando sobre a clorofila. Enzimas como a Mg-dequelatase e oxigenases poderiam atuar diretamente na clorofila ou nos derivados. As oxigenases clivam o anel tetrapirrólico, formando compostos incolores fluorescentes, e estes compostos fluorescentes são convertidos em compostos incolores não fluorescentes. Segundo TAKAMYIA *et al.* (2000), as clorofilases em sementes de canola, têm atividade latente *in vivo*, o que poderia explicar a ausência de derivados defitilados nessas amostras.

Os resultados deste trabalho fortalecem a hipótese dos autores acima citados, que propõem que a degradação da clorofila ocorre por múltiplas vias enzimáticas, simultaneamente, não se restringindo apenas à clorofilase, e que a velocidade da degradação dos metabólitos formados é mais alta do que a velocidade da síntese dos mesmos. Os metabólitos desaparecem rapidamente, sem deixar rastros, o que dificulta o estudo de cinética.

Visando a qualidade dos grãos de soja, ressalta-se que a colheita realizada no estádio de maturação fisiológica não é uma garantia de um conteúdo de clorofila e de umidade reduzidos. Teores de umidade superiores a 13 % exigem que os grãos sejam secos para viabilizar o seu armazenamento antes do processamento.

As amostras que foram colhidas durante a maturação e depois secas a 40 °C foram analisadas por HPLC e os resultados estão apresentados em ***figura 16.***

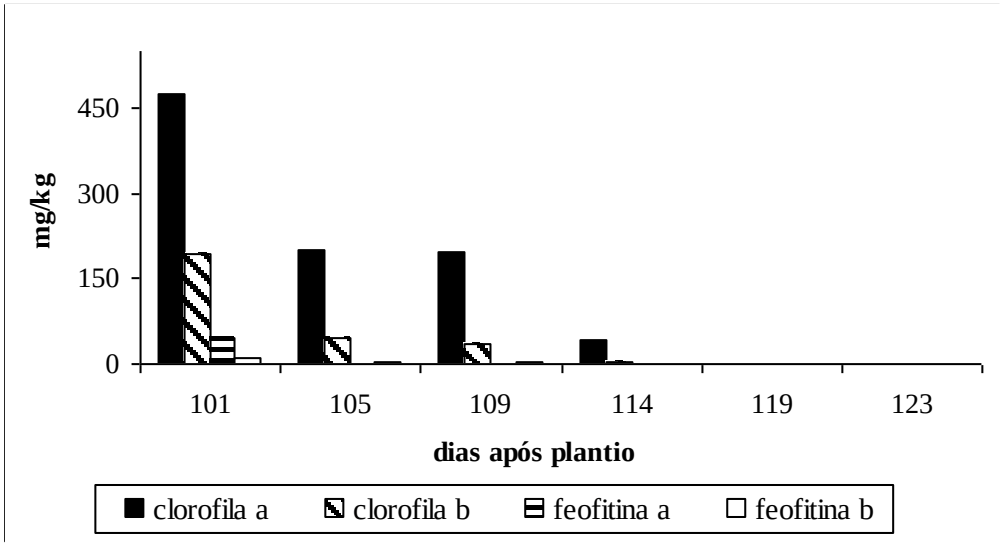


Figura 16: Teores de clorofilas e feofitinas em soja IAC-18, seca a 40°C, medidos por HPLC.

A figura mostra um perfil de degradação similar às amostras analisadas frescas, mas os teores de clorofilas *a* e *b* foram ligeiramente menores (476,9 ± 22,2 mg/kg e 192,6 ± 2,2 mg/kg, respectivamente) no primeiro ponto de colheita.

Ao mesmo tempo, traços de 47,0 ± 2,3 mg/kg de feofitina *a* e 9,9 ± 0,3 mg/kg de feofitina *b* foram detectados. Os teores das feofitinas *a* e *b* correspondem a 8,9 e 4,1 % de clorofila *a* e *b* nas amostras frescas, respectivamente. Esses valores diminuíram para zero ao longo da maturação. Esse fato indica que feofitinização ocorreu durante o processo de secagem a 40°C, junto com a remanescente degradação enzimática.

A feofitina é uma substância com potencial pró-oxidante ainda mais alto que o da clorofila, motivo de preocupação em relação à elevada concentração destes pigmentos em óleos de canola ou de soja (ENDO *et al.*, 1984; USUKI *et al.*, 1984[a,b]). Nesse sentido, DAUN & THORSTEINSON (1989) propuseram que o teor de clorofila total

deveria ser expresso em teor de feofitina, considerando que a maior parte da clorofila se convertia em feofitina, durante a produção do óleo.

O aparecimento de feofitinas nas amostras secas a 40°C sugere que houve uma mudança no mecanismo de degradação da clorofila. Enquanto na maturação da soja no campo sem subseqüente secagem a clorofila degradou sem formação significativa de feofitinas ou outros intermediários, na secagem a 40°C a via de degradação da clorofila incluiu a formação de feofitinas.

As amostras secas a 60°C mostraram uma perda significante de pigmentos durante o tratamento térmico, restando apenas 183,9 ± 7,7 mg/kg e 111,9 ± 3,7 mg/kg de clorofila *a* e *b*, respectivamente, no primeiro ponto de colheita ***(figura 17***).

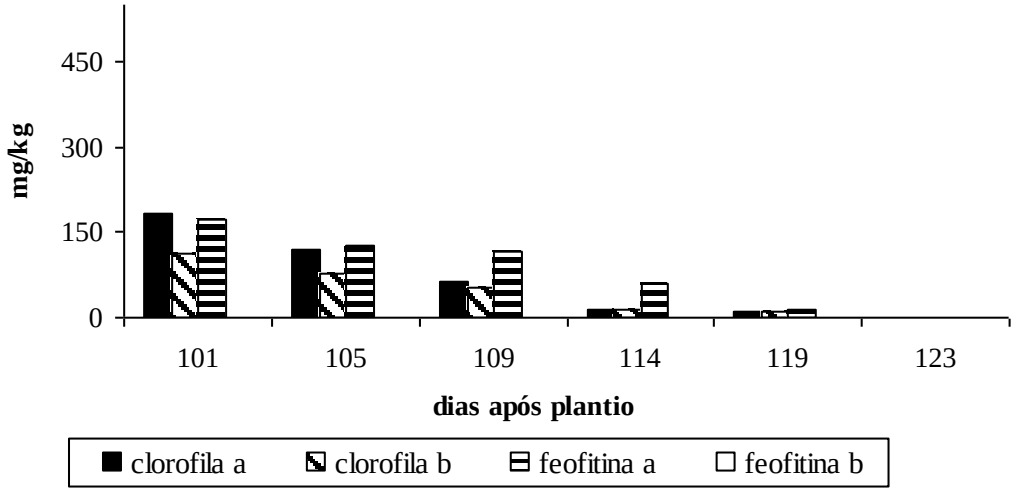


Figura 17: Teores de clorofilas e feofitinas em soja IAC-18, seca a 60°C, medidos por HPLC.

Essa perda parece ser resultado da susceptibilidade das clorofilas a temperaturas altas, meio ácido, oxigênio e luz solar, implicando em subseqüente degradação para outras substâncias (MANGOS & BERGER, 1997). Mesmo assim, no presente caso, teores relativamente altos de feofitina *a* (172,0 ± 8,5 mg/kg) e traços de feofitina *b*

(0,9 ± 0,05 mg/kg) foram encontrados. A soma de clorofilas e feofitinas foi de 468,7 mg/kg e corresponde a 60,8 % dos conteúdos de clorofila em amostras frescas.

Todas as amostras analisadas contiveram mais clorofila *a* e feofitina *a* do que clorofila *b* e feofitina *b*, respectivamente, e todos os pigmentos sofreram uma redução rápida durante o processo de maturação. A partir do quinto ponto de colheita (119 dias após a semeadura) os valores de todos os pigmentos encontravam-se perto do zero, tanto nas amostras frescas como nas secas a 40 e 60°C.

5.2.5 Análise de derivados incolores da clorofila por HPLC

As amostras das seis colheitas entre os estádios R_6 e R_8, frescas e secas a 40 e 60°C, foram analisadas por HPLC para encontrar os derivados incolores (NCC) da degradação da clorofila, e identificar o seu comportamento durante a maturação e secagem pós-colheita.

A ***figura 18*** mostra os cromatogramas das seis amostras de soja fresca colhidas entre os estádios R_6 e R_8 de maturação. Todas as amostras apresentavam cromatogramas complexos, mas três picos tiveram espectros típicos para NCC (BERGHOLD *et al.*, 2002), denominados A, B e C, conforme seus tempos de retenção.

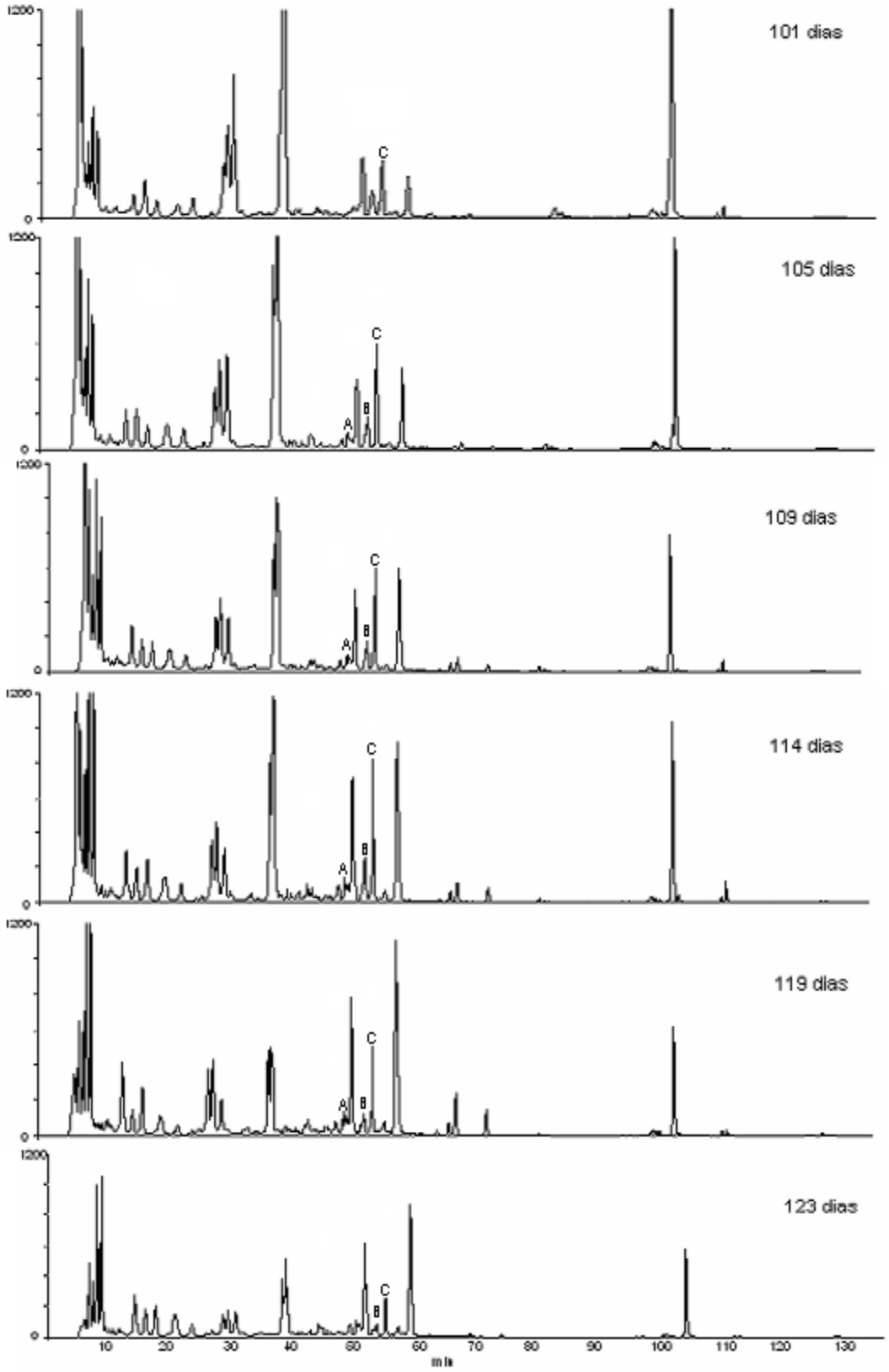


Figura 18 Cromatogramas de HPLC dos extratos de NCC das seis amostras de soja IAC-18 frescas e colhidas entre os estádios R_6 e R_8 de maturação, gravados em 320 nm. Os picos provisoriamente identificados como NCC foram denominados A, B e C.

O pico C foi predominante, mas os outros dois picos mostraram o mesmo comportamento e as mesmas características espectrais. Os outros picos nos cromatogramas correspondem a um grande número de substâncias desconhecidas com um máximo de absorbância a 330 nm. Como as extrações dos pigmentos e a análise por HPLC foram baseados no mesmo peso seco das amostras, foi possível expressar as concentrações relativas como áreas sob a curva, desde que não existem padrões comerciais de NCC disponíveis no mercado.

Os NCC são os primeiros intermediários lineares da degradação da clorofila, em que as quatro unidades pirrólicas são completamente desconjugadas e que contêm um grupo formil-pirrólico (KRÄUTLER, 2006). Por isso, a identificação provisória dos NCC foi feita procurando um máximo de absorbância a 320 nm, o que é típico para o grupo formil-pirrólico. A ***figura 19*** mostra os espectros de absorção das frações A, B e C, que são idênticos aos espectros de NCC já publicados na literatura (BERGHOLD *et al.*, 2002).

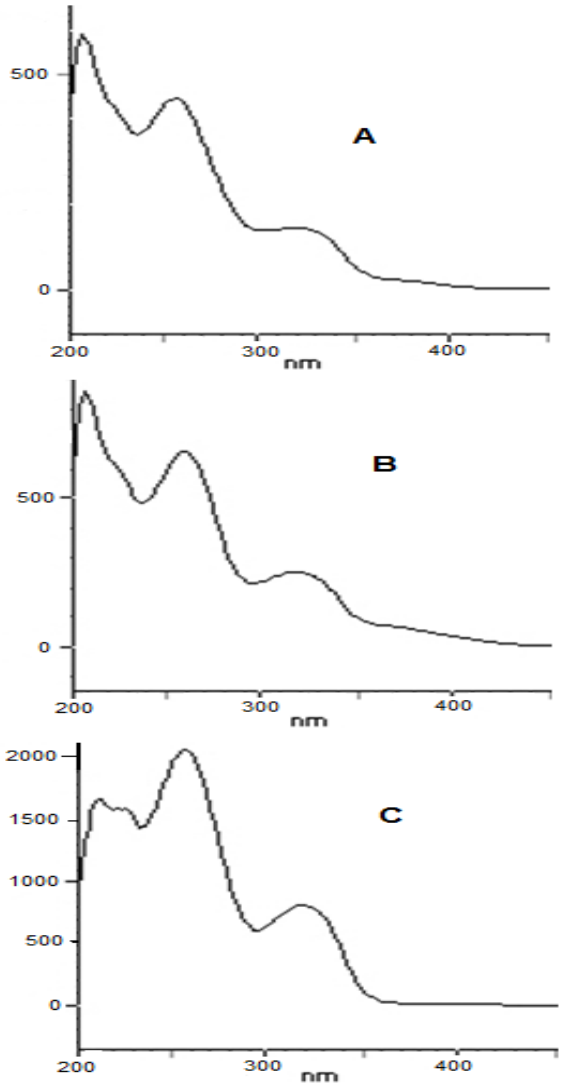


Figura 19. Espectros de absorção UV/Vis dos NCC gravados durante a análise de HPLC dos extratos de soja IAC-18. As letras A, B e C indicam as frações identificadas como NCC.

Na ***figura 20*** são apresentadas as médias das áreas sob as curves das frações A, B e C, analisadas em triplicata. A figura mostra os NCC encontrados durante todo período de maturação em soja fresca e seca a 40 e 60°C. Foi evidente que os picos A, B e C de soja fresca corresponderam a apenas uma parte muito pequena das clorofilas degradadas. No entanto, os teores relativos cresceram até o quarto ponto de colheita (114 dias após a semeadura), devido aos altos teores iniciais de clorofilas, que foram constantemente

degradadas para NCC. Após o quarto ponto de colheita os NCC diminuíram, devido à menor concentração de clorofilas disponíveis para a formação de NCC e porque os próprios NCC foram degradados.

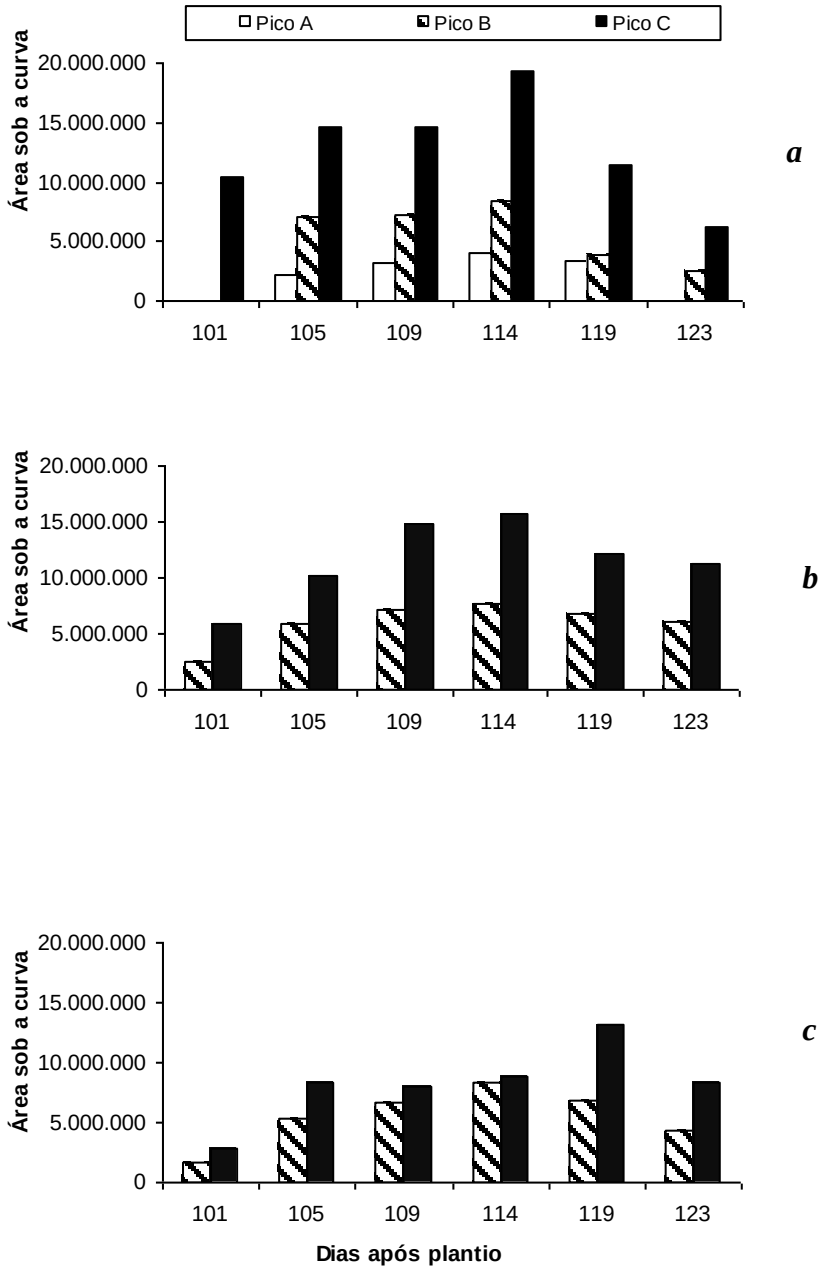


Figura 20(a-c). Áreas médias sob a curva das frações identificadas como NCC durante a maturação natural da soja IAC-18. As letras A, B e C correspondem às frações A, B e C das cromatogramas, respectivamente; ***(a)*** Soja fresca; ***(b)*** Soja seca a 40°C; ***(c)*** Soja seca a 60°C.

Nas amostras secas a 40°C valores menores de NCC foram encontrados, mas o perfil de formação de subseqüente desaparecimento dos NCC foi similar ao das amostras frescas. O pico A não foi identificado, provavelmente devido à sua concentração muito baixa.

Nas amostras secas a 60°C, a baixa concentração de clorofilas além do fato das enzimas terem sido parcialmente degradadas devido à secagem a temperatura alta, resultaram em retardo da formação dos NCC e menores áreas sob as curvas de NCC. Esses resultados estão de acordo com a hipótese de KRÄUTLER (2006) e com a revisão de TAKAMYIA *et al.*, (2000), que propuseram uma possível degradação dos NCC para estruturas monopirrólicas em folhas senescentes e cotilédones de varias plantas.

6 CONCLUSÕES

6.1 Soja que sofreu déficit hídrico

- O déficit hídrico que ocorreu no período que antecedeu a colheita causou retenção da cor verde e foram detectados elevados teores de feofitinas produzidos por reações não-enzimáticas.

- A atividade enzimática residual de lipases provocou aumento da acidez durante o armazenamento, embora peróxidos não tenham sido encontrados, possivelmente devido à proteção contra a oxidação oferecida por carotenóides.

- Houve desaparecimento gradativo da cor verde durante o armazenamento da soja por 20 meses, conferindo-lhe uma aparência quase normal.

6.2 Soja cultivada em condições normais de irrigação

- Os pigmentos verdes predominantes são clorofila *a* e clorofila *b*, cuja concentração diminui até níveis residuais até o final da maturação sem formação de feofitinas ou outros derivados verdes, o que implica em degradação enzimática da clorofila.

- A secagem pós-colheita a 40 e 60°C resultou em transformação parcial das clorofilas em feofitinas por feofitinização química.

- Houve formação de catabólitos incolores, que não parecem ser acumulados, apoiando a hipótese de estes serem utilizados na síntese de novas substâncias importantes para a germinação da semente.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ÓLEOS VEGETAIS (ABIOVE). Disponível em: http://www.abiove.com.br, Acesso: 17.06.2009.

ABRAHAM, V.; DeMAN, J.D. Hydrogenation of canola oil as affected by chlorophyll. **JAOCS**, Champaign, v.63, n.9, p.1185-1188, 1986.

ADAMS, C.A.; FJERSTAD, M.C.; RINNE, R.W. Characteristics of soybean seed maturation: necessity for slow dehydration. **Crop Science**, Madison, v.23, march-april, p.265-267, 1983.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÃNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e de Saúde.** Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno.htm., Acesso: 17.06.2009.

ASSOCIAÇÃO DOS PRODUTORES E COMERCIANTES DE SEMENTES E MUDAS DO RS (APASSUL), **Descrição de cultivares.** Disponível em: http://www.apassul.com.br/conteudo.asp?content=12&a=details&ID=290, Acesso: 30.10.2008.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC), **Official Methods of Analysis**. 16ed. v. 1, cap.3, p.26-28, 1995.

ASSOCIACIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC), **Official Methods of Analysis**. 14ed. cap. 3, p. 26-27, 1984.

AXELROD, B.; CHEESBROUGH, T.M.; LAASKO, S. Lipoxigenase from soybeans. **Methods in Enzymology,** v.71, p.441-451, 1981.

BERGHOLD, J.; BREUKER, K.; OBERHUBER, M.; HÖRTENSTEINER, S.; KRÄUTLER, B. Chlorophyll breakdown in spinach: on the structure of five non-fluorescent chlorophyll catabolites. **Photosynthesis Research**, v. 74, p.109-119, 2002.

BOEKEL, M.A.J.S. Anniversary review: kinetic modeling in food science: a case study on chlorophyll degradation in olives. **Journal of Science in Food and Agriculture**, Bognor Regis, v.80, p.3-9, 2000.

BRASIL. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). Disponível em: http://www.conab.gov.br, January 24th; 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Abastecimento. **PORTARIA n.162, de 23 de novembro de 1983.** Publicado em 29 Nov 1983, Instrução Normativa de 15 de maio de 2007.

BRASIL. **Resolução n° 19 de 30 de abril de 1999**. Diário Oficial da União, Brasília, 3 de maio de 1999. Disponível em: http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=110&word, Acesso:30.10.2008.

BRASIL SECEX. Ministério de Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Secretaria de Comércio Exterior. **Balança comercial do Brasil**, dezembro, 1998-2001.

BRAY, E. A. Molecular responses to water deficit. **Plant Physiology**, v.103, p.1035-1040, 1993.

BREEMEN, R.B.; CANJURA, F.L.; SCHWARTZ, S.J. Identification of chlorophyll derivatives by mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v.39, p.1452-1456, 1991.

CANO, M.P.; MONREAL, M.; ANCOS, B.; ALIQUE, R. Effects of oxygen levels on pigment concentrations in cold-stored green beans (*Phaseolus vulgaris* L. Cv. Perona). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v.46, p.4164-4170, 1998.

CARUSO, R. **Soja - Uma caminhada sem fim**. Fundação Cargill: Campinas, 1997, 95p.

CENKOWSKI, S.; SOKHANSANJ, S.; SOSULSKI, F.W. The effect of drying temperature on green color and chlorophyll content of canola seed. **Journal of the Canadian Institute of Food Science and Technology**, Ottawa, v.22 ,n.4, p.383-386, 1989a.

CENKOWSKI, S., SOKHANSANJ, S., SOSULSKI, F.W. Effect of harvest date and swathing on moisture content and chlorophyll content of canola seed. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v.69, n.7, p.925-928, 1989b.

CENKOWSKI, S., JAYAS, D.S. Potencial of in-field and low-temperature drying for reducing chlorophyll contents in canola (*Brassica napus* L). **Journal of Science in Food and Agriculture**, Bognor Regis, v.63, p.377-383, 1993.

CERQUEIRA, N.P., POPINIGIS, F. Qualidade da semente. In: MIYASAKA, S.; MEDINA, J.C. **A soja no Brasil**. São Paulo: IAC, 1981. 1061p.

DAHLÉN, J.A.H. Chlorophyll content monitoring of Swedish rapeseed and its significance in oil quality. **Journal of the American Oil Chemists Society**, Champaign, v.50, n.8, p.312-327, 1973.

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

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISAS AGROPECUÁRIAS (EMBRAPA). Centro Nacional de Pesquisa de Soja, http://www.cnpso.embrapa.br, Acesso: 17 de junho de 2009.

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

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

FEHR, W.R.; CAVINESS, C.E. **Stages of soybean development**. Ames, Iowa State University of Science and Technology, 1977. 11p.

GANDUL-ROJAS, B., ROCA, M., MÍNGUEZ-MOSQUEIRA, M.I. Chlorophyll and carotenoid degradation mediated by thylakoid-associated peroxidative activity in olives (*Olea europaea*) cv. Hojiblanca. **Journal of Plant Physiology**, v.161, p. 499-507, 2004.

GINSBURG, S.; MATILE, P. Identification of catabolites of chlorophyll-porphyrin in senescent rape cotiledons. **Plant Physiology**, v.103, pp.521-527, 1993.

GOLBITZ, P. **Soyfoods: State of the industry and market.** In: SOYFOODS 2000, Orlando, Abstract. Florida: Feb. 16-18, 2000.

GOMES, M. SALETE O.; SINNECKER, PATRÍCIA; TANAKA; ROBERTO T.; LANFER-MARQUEZ, U. M. Effect of harvesting and drying conditions on chlorophyll levels of soybean (*Glycine Max* L. Merr). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.1634-1639, 2003.

GROSS, J. **Pigments in vegetables: chlorophylls and carotenoids**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1991. 351p.

HARE, P., PLESSIS, S. D., CRESS, W., STADEN, J. V.Stress-induced changes in plant gene expression. **South African Journal of Science,**. v.92, p.431-439, 1996.

HEATON, J.W., YADA, R.Y., MARANGONI, A.G. Discoloration of coleslaw is caused by chlorophyll degradation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v.44, n.2, p.395-402, 1996.

HEATON, J.W., MARANGONI, A.G. Chlorophyll degradation in processed foods and senescent plant tissues. **Trends of Food Science and Technology**, Amsterdam, v.7, n.1, p.8-15, 1996.

HÖRTENSTEINER, S.; VICENTINI, F.; MATILE, P. Chlorophyll breakdown in senescent cotyledons of rape, *Brassica napus* L.: enzymatic cleavage of pheophorbide *a in vitro*. **New Phytology**., v.129, p.237-246, 1995.

HÖRTENSTEINER, S., WÜTHRICH, K.L., MATILE, P., ONGANIA, K.H., KRÄUTLER, B. The key step in chlorophyll breakdown in higher plants: cleavage of pheophorbide *a* macrocycle by a monooxygenase. **Journal of Biological Chemistry**, v.273, n.25, pp.15335-15339, 1998.

HÖRTENSTEINER, S. The loss of green color during chlorophyll degradation: A prerequisite to prevent cell death? **Planta**, v.219, n.2, p.191-194; 2004.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ**. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 3ed. v.1, p. 21-22; 42-43, 1985.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 2ed. v.1, p.38; 188-189, 1976.

JOHNSON-FLANAGAN, A.M., THIAGARAJAH, M.R. Degreening in canola (*Brassica napus*, c.v. Westar) embryos under optimum conditions. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v.136, p.180-186, 1990.

JOINT FAO/WHO EXPERT CONSULTATION PROTEIN QUALITY EVALUATION, Bethesda, 1989. Protein quality evaluation. Rome: FAO, 1990. (FAO food and nutrition papers, 51).

JONSTON, M.R.; LIN, R.C. FDA Views on the importance of water activity in good manufaturing pratice. Em: **Water Activity: Theory and Applications to Food**. Institute of Food Technologists, 1987.

KHACHIK, F., BEECHER, G.R., WHITTAKER, N.F. Separation, identification and quantification of major carotenoid and chlorophyll constituents in extracts of several green vegetables liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v.34, p.603-616, 1986.

KOZUKUE, N., TSUCHIDA, H., FRIEDMAN, M. Tracer studies on the incorporation of [2-^{14}C]-DL-mevalonate into chlorophylls *a* and *b*, α-solanine of potato sprouts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v.49, p.92-97, 2001.

KRÄUTLER, B. Unravelling chlorophyll catabolism in higher plants. **Biochemical Society Transactions**, v. 30, p. 625-630. 2002.

KRÄUTLER, B. Chlorophyll breakdown and chlorophyll catabolites. In **The Porphyrin Handbook**: Kadish, K.M., Smith, K.M., Guilard, R., Eds.; Publisher: Elsevier Science Publishing, New York, v. 13, p. 183-209, 2003.

KRÄUTLER, B. Chlorophyll catabolites and the biochemistry of chlorophyll breakdown. In: **Chlorophylls and bacteriochlorophylls: Biochemistry, biophysics, functions and applications**. p.237-260; 2006.

LEVADOUX, W.L., KALMOKOFF, M.L., PICKARD, M.D., GROOFWASSINK, J.W.D. Pigment removal from canola oil using chlorophyllase. **Journal of the American Oil Chemists Society**, Champaign, v.64, n.1, p.139-144, 1987.

LIMA, A.M.M.P.; CARMONA, R. Influência do tamanho da semente no desempenho produtivo da soja. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.21, n.1, p.157-163, 1999.

LIU, K. Expanding soybean food utilization. **Food Technology**, Chicago, v.54, n.7, p. 46-58, 2000.

LÓPEZ-AYERRA, B., MURCIA, M.A., GARCIA-CARMONA, F. Lipid peroxidation and chlorophyll levels in spinach during refrigerated storage and after industrial processing. **Food Chemistry**, Amsterdam, v.61, n.1/2, p.113-118, 1998.

LOSEY, F.G., ENGEL, N. Isolation and characterization of a urobilinogenoidic chlorophyll catabolite from *Hordeum vulgare L*. **Journal of Biological Chemistry**, 276, 8643-8647. 2001.

MACHADO, E.C. Disponibilidade de água como fator de crescimento da planta. In: MIYASAKA, S., MEDINA, J.C. **A soja no Brasil**. São Paulo: IAC, 1981. 1062p.

MANGOS, T.J., BERGER, R.G. Determination of major chlorophyll degradation products. **Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A**, Berlin, v.204, p.345-350, 1997.

MARCOS FILHO, J. **Produção de sementes de soja**. Campinas, Fundação Cargill, 1986. 86p.

MATILE, P., HÖRTENSTEINER, S., THOMAS, H. Chlorophyll degradation. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.50, pp.67-95, 1999.

MESSINA, M. Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.70, p.439S-450S, 1999.

MÍNGUEZ-MOSQUERA, M.I., GARRIDO-FERNANDEZ, J., GANDUL-ROJAS, B. Pigment changes in olives during fermentation and brine storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.37, p.8-11, 1989.

MÍNGUEZ-MOSQUERA, M.I., GANDUL-ROJAS, B., GARRIDO-FERNANDEZ, J., GALLARDO-GUERRERO, L. Pigments present in virgin oil. **Journal of the American Oil Chemists Society**, Champaign, v.67, n.3, p.192-196, 1990.

MÍNGUEZ-MOSQUERA, M.I., GANDUL-ROJAS, B., MÍNGUEZ-MOSQUERA, J. Mechanism and kinetics of the degradation of chlorophylls during the processing of green table olives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v.42, p.1089-1095, 1994.

MÍNGUEZ-MOSQUERA, M.I., GALLARDO-GUERRERO, L. Disappearance of chlorophylls and carotenoids during the ripening of the olive. **Journal of Science for Food and Agriculture**, Bognor Regis, v.69, p.1-6, 1995.

MIYASAKA, S.; MEDINA, J.C. **A soja no Brasil**. São Paulo: IAC, 1981. cap.3, p.145-157.

MÜHLECKER, W.; ONGANIA, K.H.; KRÄULTLER, B.; MATILE, P.; HÖRTENSTEINER, S. Tracking down chlorophyll breakdown in plants: elucidation of the constitution of a fluorescent chlorophyll catabolite. **Angewandte Chemie International Edition.** V.36, pp.401-404, 1997.

MONREAL, M., ANCOS, B., CANO, M.P. Influence of critical storage temperatures on degradative pathways of pigments in green beans (*Phaseolus vulgaris* cvs. Perona and Boby). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, n.47, p.19-24, 1999.

MOUNTS, T.L., SNYDER, J.M., HINSCH, R.T., BONGERS, A.J., CLASS, A.R. Quality of soybeans in export. **Journal of the American Oil Chemists Society**, Champaign, v.67, n.11, p.743-746, 1990.

MÜLLER, T., ULRICH, M., ONGANIA, KH., KRÄUTLER, B. Colorless tetrapyrrolic chlorophyll catabolites found in ripening fruit are effective antioxidants. **Angewandte Chemie International Edition**, v.46, p.8699-8702, 2007.

NOGUEIRA, S.S.S., NAGAI, V. Effect of simulated water stress during different stages of the early soybean cultivars Paraná. **Bragantia.** v. 47, n.1; 1988.

NWUFO, M.I. Effects of water stress on the post harvest quality of two leafy vegetables, *Telfairia occidentalis* and *Pterocarpus soyauxii* during storage. **Journal of Science for Food and Agriculture.**, Bognor Regis, v.64, p.265-269, 1994.

OBERHUBER, M.; BERGHOLD, J.; MÜHLECKER, W.; HÖRTENSTEINER, S.; KRÄUTLER, B. Chlorophyll breakdown – on a nonflurescent chlorophyll catabolite from spinach. **Helvetica Chimica Acta**, v.84, pp.2615-2627, 2001.

OBERHUBER, M., BERGHOLD, J., BREUKER, K., HÖRTENSTEINER, S., KRÄUTLER, B. Breakdown of chlorophyll: a nonenzymatic reaction accounts for the formation of the colorless "nonfluorescent" chlorophyll catabolites. **Proceedings of the National Academy of Science**, v.100, n.12, pp.6910-6915, 2003.

OLIVEIRA, D.A., PIOVESAN, N.D., MORAES, R.M.A., ROCHEBOIS, G.B., OLIVEIRA, M.G.A., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. Identification of three genotypic classes for soybean lipoxigenases *1* and *3* on enzymatic activity. **Biotechnology Techniques**, v.12, n.1, pp.71-74, 1998.

PORRA, R., THOMPSON, W.A., KRIEDEMANN, P.E. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls *a* and *b* extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. **Biochimica e Biophysica Acta**, Amsterdam, v.975, p.384-94, 1989.

PRITCHARD, J.R. Oilseed quality requirements for processing. **Journal of the American Oil Chemists Society**, Champaign, v.60, n.2, p.174-184, 1983.

PRUŽINSKÁ, A., TANNER, G., ANDERS, I., ROCA, M., HÖRTENSTEINER, S. Chlorophyll breakdown: Pheophorbide *a* oxygenase is a Rieske-type iron-sulfur protein, encoded by the *accelerated cell death 1* gene. **Proceedings of the National Academy of Science**, v.100, n.25, p.15259-15264; 2003.

PRUŽINSKÁ, A., TANNER, G., AUBRY, S., ANDERS, I., MOSER, S., MÜLLER, T., ONGANIA, K. H., KRÄUTLER, B., YOUN, J.Y., LILJEGREN, S.J., HÖRTENSTEINER, S. Chlorophyll breakdown in senescent *Arabidopsis* leaves. Characterization of chlorophyll catabolites and of chlorophyll catabolic enzymes involved in the degreening reaction. **Plant Physiology,** v.139, pp.52-63, 2005.

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

RICE R.D., WEI L.S., STEINBERG M.P., NELSON A.I. Effect of enzyme inactivation on the extracted soybean meal and oil. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.58, n.5, p. 578-583; 1981.

ROCA M., JAMES, C., PRUŽINSKÁ, A., HÖRTENSTEINER, S., THOMAS, H., OUGHAM, H. Analysis of the chlorophyll catabolism pathway in leaves of an introgression senescence mutant of *Lolium Temulentum*. **Phytochemistry**, v.65, p.1231-1238; 2004.

RODONI, S., VICENTINI, F., SCHELLENBERGER, M., MATILE, P., HÖRTENSTEINER, S. Partial purification and characterization of red chlorophyll catabolite reductase, a stroma protein involved in chlorophyll breakdown. **Plant Physiology**, v.115, pp.677-682, 1997.

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

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

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

SCHWARTZ S.J., LORENZO, T.V. Chlorophyll stability during continuous aseptic processing and storage. **Journal of Food Science**, v.56, n.4, p.1059-1062; 1991.

SHINOZAKI, K., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Molecular responses to drought and cold stress. **Current Opinion in Biotechnology**, v.7, p.161-167, 1996.

SHINOZAKI, K., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene expression and signal transduction in water-stress response. **Plant Physiology**, v.115, p.327-334, 1997.

SINNECKER, P., GOMES, M.S.O., ARÊAS, A.G., LANFER-MARQUEZ, U.M. Relationship between color (instrumental and visual) and chlorophyll contents in soybean seeds during ripening. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v.50, p.3961-3966, 2002.

SINNECKER, P., BRAGA, N., MACCIONE, E.L.A., LANFER-MARQUEZ, U.M. Mechanism of soybean (*Glycine max* L. Merrill) degreening related to maturity stage and postharvest drying temperature. **Postharvest Biology and Technology**, v.38, pp.269-279, 2005.

SOUCI, S.W.; FACHMANN, W.; KRAUT, H. Food composition and nutrition tables. **Stuttgart Medpharm Scientific Publishers**, 7th ed; 2007.

SUZUKI, Y., SHIOI, Y. Detection of chlorophyll breakdown products in the senescent leaves of higher plants. **Plant and Cell Physiology**. v.40, p.909-915, 1999**.**

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

TABELA BRASILEIRA DE COMPOSIÇÃO DE ALIMENTOS da UNICAMP (http://www.fcf.usp.br/tabela), Acesso: 19/06/2009

TABELA BRASILEIRA DE COMPOSIÇÃO DE ALIMENTOS da USP (http://www.unicamp.br/nepa/taco), Acesso: 19/06/2009

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

TAUTORUS, C.L., LOW, N.H. Chemical aspects of chlorophyll breakdown products and their relevance to canola oil stability. **Journal of the American Oil Chemists Society**, Champaign, v.70, n.9, p.843-847, 1993.

TECKRONI, D.M., EGLI, D.B., WHITE, G.M. Seed production and technology. In: WILCOX, J.R. **Soybeans: Improvement, production and uses.** 2.ed. Madison: ASA, 1987. cap.8, p.295-353.

TENG, S.S., CHEN, B.H. Formation of pyrochlorophylls and their derivatives in spinach leaves during heating. **Food Chemistry**, Amsterdam, n.65, p.367-373, 1999.

UNITED STATES STANDARS FOR SOYBEANS, United States Department of Agriculture, Disponível em:http://www.usda.gov, Acesso em: 28.09.2008

UNITED STATES. Food and Drug Administration (FDA). **Food labeling: Health claims; soy protein and coronary heart disease. Food and Drug Administration**, 21 CFR Part 101, Oct. 26, 1999.

USUKI, R., SUZUKI, T., ENDO, Y., KANEDA, T.K. Residual amounts of chlorophylls and pheophytins in refined edible oils. **Journal of the American Oil Chemists Society.**, Champaign, v.61, n.4, p.785-788, 1984a.

USUKI, R., ENDO, Y., KANEDA, T. Prooxidant activities of chlorophylls and pheophytins on the photooxidation of edible oils. **Journal of Agricultural and Biological Chemistry**, v.48, n.4, p.991-994, 1984b.

WARD, K., SCARTH, R., DAUN, J., McVETTY, P.B.E. Effects of genotype and environment on seed chlorophyll degradation during ripening in four cultivars of oilseed rape (*Brassica napus*). **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v.72, n.7, p.643-649, 1992.

WARD, K., SCARTH, R., DAUN, J., VESSEY, J.K. Chlorophyll degradation in summer rape and summer turnip rape during seed ripening. **Canadian Journal of Plant Science,** Ottawa, v.75, p.413-420, 1995.

WEEMAES, C.A., OOMS, V., VAN LOEY, A.M., HENDRICKX, M.E. Kinetics of chlorophyll degradation and color loss in heated broccoli juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, n.47, p.2404-2409, 1999.

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

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