

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS

BRUNO DELAFRONTTE

**DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS LIPOXIGENASES  
(L1 E L3) EM OITO GENÓTIPOS DE SOJA DESENVOLVIDOS PELA  
EMBRAPA SOJA**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

LONDRINA  
2014

BRUNO DELAFRONTE

**DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS LIPOXIGENASES  
(L1 E L3) EM OITO GENÓTIPOS DE SOJA DESENVOLVIDOS PELA  
EMBRAPA SOJA**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, apresentado à disciplina Trabalho de Conclusão de Curso 2 do Curso Superior de Tecnologia em Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, câmpus Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Isabel Craveiro Moreira.

Coorientador: Msc. José Marcos Gontijo Mandarino.

LONDRINA  
2014

## **TERMO DE APROVAÇÃO**

### **DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS LIPOXIGENASES (L1 E L3) EM OITO GENÓTIPOS DE SOJA DESENVOLVIDOS PELA EMBRAPA SOJA**

**BRUNO DELAFRONTTE**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi apresentado em 18/02/2014 como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Isabel Craveiro Moreira**  
**Universidade Tecnológica Federal do Paraná**  
**Orientadora**

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lúcia Felicidade Dias**  
**Universidade Tecnológica Federal do Paraná**  
**Membro titular**

---

**Prof. Dr. Alexandre Rodrigo Coelho**  
**Universidade Tecnológica Federal do Paraná**  
**Membro titular**

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus por ter concedido saúde e sabedoria. Agradeço a Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Isabel Craveiro Moreira pelos ensinamentos, pela paciência, pelo carinho e amizade nessa jornada. Agradeço a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Soja e ao pesquisador Msc. José Marcos Gontijo Mandarino pela oportunidade de estágio, por fornecer as amostras, instalações para realizar as análises, além de proporcionar um ensino de ótima qualidade contribuindo para a minha formação e conhecimento sócio intelectual. Agradeço grandemente ao apoio e paciência do analista Rodrigo Santos Leite, responsável pelo Laboratório de Melhoramento Genético e aos estagiários e amigos Rafael Luiz Pirolli Vilas Boas e Isabela Pereira Dias, que me ajudaram a realizar as análises, e a todos os professores que contribuíram com a minha formação e conhecimento. Por fim aos meus pais que durante esses três anos me apoiaram em todas as minhas decisões, sempre mostrando os melhores caminhos a serem seguidos.

## RESUMO

DELAFRONTE, Bruno. **Determinação da atividade das enzimas lipoxigenases (L1 e L3) em oito genótipos de soja desenvolvidos pela Embrapa Soja.** 2014. 32p. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia em Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 2014.

A soja é uma excelente fonte proteica, pois suas proteínas apresentam um balanceamento adequado dos aminoácidos essenciais, tendo boa composição de minerais como o ferro, magnésio e fósforo. Além disso, é uma oleaginosa que contém elevados teores de ácidos graxos poliinsaturados. Quando expostos ao estresse hídrico esses lipídios sofrem ataque direto, autocatalítico, por meio de oxigênio atmosférico. A ação das enzimas lipoxigenases sobre os ácidos graxos poliinsaturados origina compostos responsáveis pelo sabor característico indesejável denominado “beany flavor”. As lipoxigenases constituem-se em quatro isoenzimas, denominadas L1, L2, L3a e L3b, sendo que as duas últimas apresentam propriedades homogêneas, portanto denominadas de L3. Este trabalho teve como objetivo quantificar a atividade das enzimas lipoxigenases em grãos de soja de oito genótipos desenvolvidos pela Embrapa Soja. A metodologia utilizada foi da espectrofotometria na região do ultravioleta. As absorvâncias foram determinadas em espectrofotômetro. Os dados obtidos foram utilizados para calcular a variação da densidade ótica ( $\Delta DO$ ). Os resultados obtidos para atividade enzimática evidenciaram que não houve diferença significativa para a isoenzima L3 entre os genótipos analisados. Para a isoenzima L1, a linhagem BR 0955277 RR1 apresentou a menor atividade enzimática sendo, portanto, uma linhagem promissora a se tornar uma cultivar adequada para o consumo humano.

**Palavras-chave:** [Glycine max (L.) Merrill.], Atividade enzimática, Espectrofotometria.

## ABSTRACT

DELAFRONTE, Bruno. **Determination of the activity of lipoxygenase (L1 and L3) in eight soybean genotypes developed by Embrapa Soja.** 2014. 32p. Completion of course work (Food Technology) - Federal Technological University of Paraná. Londrina, 2014.

Soybeans are a good protein source, because their proteins have an appropriate balance of essential amino acids. Soy has also a good composition of minerals like iron, magnesium and phosphorus, and it is an oilseed that contains high levels of polyunsaturated fatty acids. When exposed to water stress these lipids undergo directly to an autocatalytic attack by atmospheric oxygen. The action of lipoxygenases on polyunsaturated fatty acids will produce compounds formed during this oxidation process are responsible for the characteristic flavor called undesirable "beany flavor". Lipoxygenases are four isoenzymes designated L1, L2, L3a and L3b, and the last two isozymes show homogeneous properties, so they are called as L3. The aim of this study was to determine the activity of lipoxygenases (L1 and L3) in soybean seeds of eight different genotypes developed by Embrapa Soja. The methodology used was spectrophotometry in the ultraviolet region. The absorbances were determined using a spectrophotometer. The data obtained were used to calculate the variation of optical density ( $\Delta DO$ ). The results obtained for enzyme activity showed no significant difference for the isoenzyme L3 among the genotypes analyzed. For isozyme L1, BR 0955277 RR1 breeding line showed the lowest enzyme activity, thus being a promising to become a suitable cultivar for human consumption.

**Keywords:** [Glycine max (L.) Merrill.], Enzymatic activity, Spectrophotometry.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>7</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>9</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	9
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	9
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>10</b>
3.1 SOJA.....	10
3.1.1 História da soja.....	10
3.1.2 Valor nutritivo da soja.....	11
3.2 ENZIMAS LIPOXIGENASES.....	12
3.3 ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO MOLECULAR NO ULTRAVIOLETA .....	14
3.3.1 Espectrofotômetros de ultravioleta .....	16
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>18</b>
4.1 TIPO DE PESQUISA.....	18
4.2 MATERIAL EM ESTUDO .....	18
4.3 MÉTODOS.....	18
4.3.1 Determinação das absorvâncias no espectrofotômetro.....	18
4.3.2 Determinação da atividade das lipoxigenases L1 e L3 .....	19
4.3.2.1 Preparo das amostras .....	19
4.3.3 Preparo das soluções para determinação das atividades das isoenzimas.....	20
4.3.3.1 Solução de linoleato de sódio.....	20
4.3.3.2 Tampão Tris-HCl pH 6,8.....	20
4.3.3.3 Tampão Tris-HCl 0,06 M .....	20
4.3.3.4 Solução extratora de lipoxigenase .....	21
4.3.3.5 Solução fosfato de sódio 0,2 M pH 6,8.....	21
4.3.3.6 Solução borato de sódio 0,2 M pH 9,0 .....	21
4.3.4 Determinação das atividades da lipoxigenase L1 e L3 .....	22
4.3.4.1 Determinação da atividade da isoenzima L1 .....	22
4.3.4.2 Determinação da atividade da isoenzima L3.....	22
4.3.4.3 Cálculos.....	23
4.3.5 Tratamento dos Dados .....	23
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>24</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>29</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>30</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a soja é o principal produto do agronegócio brasileiro. Sua produção iniciou-se no começo do século passado e vem apresentando ciclos de expansão acelerada a partir dos anos sessenta (BICKEL, 2004). O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja, perdendo apenas para os Estados Unidos da América (EUA). A soja é o produto mais comercializado em nível mundial, e a demanda internacional pelo grão cresce continuamente (CONAB, 2012).

A soja possui elevado teor de proteínas, que corresponde a 40%, fazendo dela a principal matéria-prima na produção de ração para alimentação animal. Apesar do teor de óleo ser baixo, quando comparada com outras oleaginosas como o girassol e a canola, por volta de 19%, o grão de soja é uma das principais fontes de matéria-prima para a produção de óleo vegetal no Brasil, correspondendo a quase 90% de toda produção nacional (DALL'AGNOL et al, 2007).

A soja possui isoflavonas e ácidos graxos poliinsaturados que têm ação na redução dos riscos de diversas doenças crônico-degenerativas não transmissíveis. É também excelente fonte de minerais como fósforo, cálcio, ferro, potássio, magnésio e vitaminas do complexo B (SCHLESINGER, 2013).

Os ácidos graxos poliinsaturados presentes na soja quando expostos ao estresse hídrico, sofrem ataque direto, autocatalítico, por meio de oxigênio atmosférico. Elevados níveis de umidade proporcionam ativação das enzimas lipoxigenases, que catalisam a formação de diversos compostos de sabor desagradável a partir da degradação destes ácidos graxos poliinsaturados. A ação das enzimas acarretam em um sabor específico denominado "beany flavor", que é considerado indesejável para a soja e seus produtos derivados. (ESKIN et al, 1977 apud BORDINGNON; MANDARINO, 1994<sup>1</sup>; MARTINS, 2003).

Essas enzimas lipoxigenases podem ser inativadas por tratamento térmico, porém nem todos os métodos proporcionam a total inativação, uma vez que cada isoenzima possui uma particularidade de ação. Por esse motivo vários estudos são realizados sobre a ação das enzimas, tendo como finalidade remover

---

<sup>1</sup> ESKIN et al 1977. In: BORDINGNON, José R.; MANDARINO, José M. G. Soja: composição química, valor nutricional e sabor. **Embrapa-CNPSO**, Londrina, issn 0101-5494, p.32, 1994.

geneticamente as lipoxigenases das sementes, com propósito de melhorar o sabor, qualidade industrial da soja e seus produtos derivados, sendo este fator crucial para aceitação dos consumidores (BORDINGNON; MANDARINO, 1994; MARTINS, 2003).

Uma forma de quantificar as isoenzimas lipoxigenases é a utilização do método espectrofotométrico, os quais se apresentam disponíveis para leituras na região do visível, ultravioleta e infravermelho (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade das enzimas lipoxigenases (L1 e L3) em sementes de oito genótipos de soja, utilizando-se o método de espectrometria de absorção molecular na região do ultravioleta.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade das enzimas lipoxigenases (L1 e L3) em sementes de oito genótipos de soja desenvolvidos pelo programa de melhoramento genético da Embrapa Soja, sendo quatro genótipos convencionais e quatro obtidos por modificação genética (transgenia), utilizando-se o método de espectrometria de absorção molecular na região ultravioleta.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a atividade das enzimas lipoxigenases (L1 e L3);
- Comparar se há diferença entre os genótipos avaliados, para atividade das enzimas;
- Determinar a influência do processo de transgenia sobre a atividade das enzimas lipoxigenases da soja.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 SOJA

##### 3.1.1 História da soja

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill.] é originária da China e relatos apontam que seu cultivo iniciou-se por volta de 2838 anos A.C, onde se manteve restrita por vários séculos. Foi trazida para o ocidente por volta do século XV pelos navegadores, mas se manteve apenas como uma curiosidade botânica nos jardins botânicos das cortes europeias até o século XIX (EMBRAPA, 2013).

A soja foi introduzida no Brasil em 1882 no Estado da Bahia (BA), a cultivar foi trazida dos Estados Unidos da América (EUA), porém não se adaptou as condições do clima devido à baixa latitude do estado. Entretanto, obteve-se sucesso com o cultivo da soja no início do século XX, no Estado do Rio Grande do Sul, devido às condições climáticas serem idênticas à dos EUA (DALL'AGNOL et al, 2007).

O crescimento da produção de soja no período de 1970 a 2007 em escala global foi na ordem de 763% e saltou de 44 para 236 milhões de toneladas sendo a principal oleaginosa cultivada no mundo (DALL'AGNOL et al, 2007).

Na década de 80, o plantio da soja se concentrava na região Sul, nos estados do Rio Grande do Sul, Paraná e Santa Catarina. Com o desenvolvimento de novas tecnologias e cultivares adaptadas ao solo e clima das demais regiões a soja espalhou-se rapidamente por todo território brasileiro. O Mato Grosso é o maior produtor de soja com um volume estimado entre 23,15 e 24,24 milhões de toneladas, seguido pelo Paraná com produção estimada entre 14,79 e 15,37 milhões de toneladas e do Rio Grande do Sul, com produção entre 11,79 e 12,13 milhões de toneladas para a última safra 2012/2013 (CONAB, 2012).

Na safra 2013/2014 segue a tendência de aumento observado em todas as regiões produtoras de soja no país, apontando para um montante de 29,56 mil hectares. A estimativa é que o Brasil atinja uma produção de 90,02 mil toneladas de

soja na temporada 2013/2014, representando um incremento produtivo que varia de 7,5 a 10,1%, constituindo-se assim um novo recorde de produção. Para o volume a ser produzido foi considerada a média da produtividade dos últimos três anos, descartando-se as safras atípicas e adicionando o avanço tecnológico (CONAB, 2013).

O Brasil transforma 30,7 milhões de toneladas de soja em 5,8 milhões de toneladas de óleo comestível e 23,5 milhões de toneladas de farelo proteico, que possuem alto teor de proteína e padrão “Premium”, possibilitando assim a entrada desses produtos no mercado internacional excessivamente exigente (MAPA, 2013).

De toda produção de soja no Brasil, o total das exportações é de: US\$ 17,1 bilhões, sendo: exportação de grão: US\$ 11,0 bilhões (29,1 milhões toneladas), exportação de farelo: US\$ 4,7 bilhões (13,7 milhões toneladas) e exportação de óleo: US\$ 1,4 bilhões (1,6 milhões toneladas) (EMBRAPA, 2013).

### 3.1.2 Valor nutritivo da soja

O excelente valor biológico das proteínas da soja é determinado em função da sua composição quantitativa de aminoácidos essenciais. Suas proteínas apresentam bom balanceamento desses aminoácidos, quando comparadas às de outros vegetais. Entretanto, as proteínas da soja apresentam um teor reduzido de aminoácidos sulfurados, metionina e cistina, como todas as leguminosas, mas possuem teor elevado do aminoácido lisina (CARRÃO-PANIZZI; MANDARINO, 1998).

O teor de lipídios da soja em torno de 20%, fornecendo calorias necessárias ao organismo para realização da síntese de novos tecidos, ao invés de serem destinadas à produção de energia, o que é comum em dietas de baixo conteúdo calórico (CARRÃO-PANIZZI; MANDARINO, 1998).

O óleo de soja apresenta em sua constituição 86% de ácidos graxos insaturados, onde 60% destes são constituídos pelos ácidos graxos essenciais, linoléico e linolênico, possui alta digestibilidade e não contém colesterol como o encontrado em gorduras de origem animal (CARRÃO-PANIZZI; MANDARINO, 1998).

A soja contém cerca de 35% de carboidratos totais. A celulose, hemicelulose e lignina, todos insolúveis, são encontrados na casca do grão, constituindo as fibras insolúveis que auxiliam no trânsito do bolo fecal e reduzem a incidência de câncer do colón. A sacarose é o principal açúcar solúvel presente na soja e representa cerca de 5% do total de carboidratos. A soja possui ainda dois oligossacarídeos a estaquiase e rafinose, causadores de problemas flatulência (CARRÃO-PANIZZI; MANDARINO, 1998).

### 3.2 ENZIMAS LIPOXIGENASES

Segundo Batista et al, (2002) as enzimas lipoxigenases no sistema vegetal ocorrem em várias partes da planta, onde desempenham várias funções e processos como: crescimento e desenvolvimento, resistência a insetos e patógenos, germinação de sementes dentre outras. A relação estrutura/função desempenhada pelas enzimas lipoxigenases não está completamente elucidada e por isso são muito importante os estudos bioquímicos visando à participação da “Via das Lipoxigenases” na fisiologia da planta.

As fontes mais ricas de lipoxigenases encontrada no grão de soja são quatro isoenzimas, classificadas em L1, L2, L3a e L3b sendo que as duas últimas apresentam propriedades homogêneas, portanto denominadas de L3. Entretanto essas isoenzimas diferem em vários aspectos da ação catalítica, tais como pH ótimo de ação, regioespecificidade, especificidade para substrato e produtos primários e secundários formados (EVANGELISTA; REGITANO-D'ARCE, 1997; AXELROD et al., 1981 apud BORDINGNON; MANDARINO, 1994<sup>2</sup>).

As lipoxigenases (oxidoreductase linoleato: oxigênio, E.C. 1.13.11.12) são isoenzimas que tem o potencial de catalisar e incorporar moléculas de oxigênio em ácidos graxos polinsaturados que possuem estrutura *cis,cis-1,4-pentadieno* (EVANGELISTA; REGITANO-D'ARCE, 1997). Isso ocorre comumente nos ésteres e ácidos graxos di e tri-insaturados, como ácido linolênico, ácido linoléico, sendo estes

---

<sup>2</sup> AXELROD et al, 1981. In: BORDINGNON, José R.; MANDARINO, José M. G. Soja: composição química, valor nutricional e sabor. **Embrapa-CNPSO**, Londrina, issn 0101-5494, p.32, 1994.

os principais substratos para as lipoxigenases em grão de soja (AXELROD et al., 1981 apud BORDINGNON; MANDARINO, 1994<sup>3</sup>).

De acordo com o seu ponto isoelétrico a lipoxigenase L1 é conhecida como isoenzima ácida e a lipoxigenase L3 como isoenzima alcalina. A lipoxigenase L1 é mais reativa com ácido linoléico, já as lipoxigenases L2 e L3 são mais reativas com metil linoleato ou trilinoleína (HILDEBRAND & KITO, 1984 apud BORDINGNON; MANDARINO, 1994<sup>4</sup>).

A temperatura ideal para a atividade das lipoxigenases está em torno de 30°C, temperaturas acima acarretam decréscimo acentuado da sua atividade, entretanto não significando na inativação das enzimas lipoxigenases (HOLMAN, 1947 apud BORDINGNON; MANDARINO, 1994<sup>5</sup>). A lipoxigenase L1 é mais estável ao tratamento térmico e apresenta pH ótimo de atuação em torno de 9,5. Utiliza como substrato o ácido linoléico, a lipoxigenase L2 utiliza o mesmo substrato e apresenta pH ótimo em torno de 6,5 e a lipoxigenase L3 apresenta pH ótimo em uma faixa ampla entre 4,5 e 9,0 (HILDEBRAND & HYMOWITZ, 1981 apud BORDINGNON; MANDARINO, 1994<sup>6</sup>).

A catálise pela ação das lipoxigenases forma os hidroperóxidos dos ácidos linolênico e linoleico e a clivagem desses hidroperóxidos pela enzima liase constituem-se no caminho para a produção de diferentes compostos voláteis que influenciam no “beany flavor” (AXELROD et al., 1981 apud BORDINGNON; MANDARINO, 1994<sup>7</sup>).

---

<sup>3</sup> AXELROD et al, 1981. In: BORDINGNON, José R.; MANDARINO, José M. G. Soja: composição química, valor nutricional e sabor. **Embrapa-CNPSO**, Londrina, issn 0101-5494, p.32, 1994.

<sup>4</sup> HILDEBRAND & KITO, 1984. In: BORDINGNON, José R.; MANDARINO, José M. G. Soja: composição química, valor nutricional e sabor. **Embrapa-CNPSO**, Londrina, issn 0101-5494, p.32, 1994.

<sup>5</sup> HOLMAN, 1947. In: José R.; MANDARINO, José M. G. Soja: composição química, valor nutricional e sabor. **Embrapa-CNPSO**, Londrina, issn 0101-5494, p.32, 1994.

<sup>6</sup> HILDEBRAND & HYMOWITZ, 1981. In: José R.; MANDARINO, José M. G. Soja: composição química, valor nutricional e sabor. **Embrapa-CNPSO**, Londrina, issn 0101-5494, p.32, 1994.

<sup>7</sup> AXELROD et al, 1981. In: BORDINGNON, José R.; MANDARINO, José M. G. Soja: composição química, valor nutricional e sabor. **Embrapa-CNPSO**, Londrina, issn 0101-5494, p.32, 1994.

### 3.3 ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO MOLECULAR NO ULTRAVIOLETA

A espectrometria de absorção molecular na região do ultravioleta é largamente utilizada para a determinação quantitativa de um grande número de substâncias inorgânicas, orgânicas e biológicas. A espectrometria de absorção molecular é baseada na medida de transmitância e/ou absorbância de soluções contidas em células transparentes, que constituem o chamado “caminho óptico” da amostra (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

A porcentagem de transmitância,  $T=100P/P_0$ , é uma quantidade de radiação transmitida e depende da natureza química do material absorvente. A absorbância “A” ou a absorvidade “a” é a medida do grau de absorção da radiação por substâncias coloridas (EWING, 1972).

Algumas variáveis usuais podem afetar o espectro de absorção de uma substância. Onde incluem a natureza do solvente, o pH da solução, a temperatura, altas concentrações de eletrólito e a presença de substâncias interferentes. Os efeitos dessas variáveis devem ser conhecidos de forma que a absorbância não seja influenciada significativamente (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

Antes de qualquer análise espectrofotométrica é necessário o desenvolvimento de condições que levem a uma relação reprodutível (preferencialmente linear) entre a absorbância e a concentração de análio (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

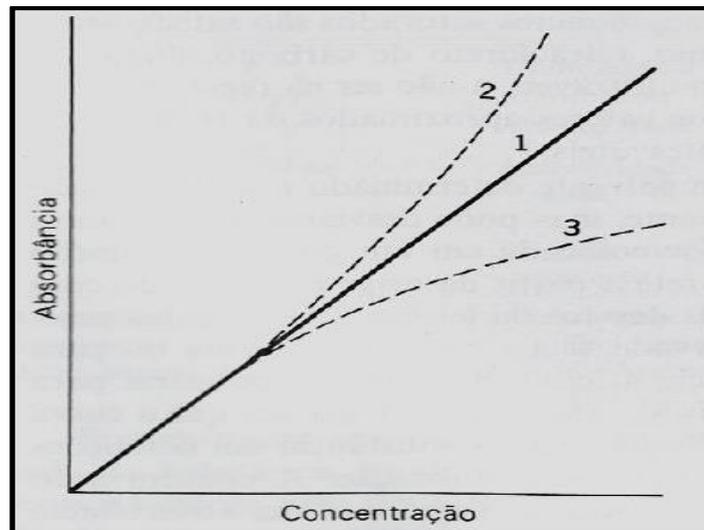
Para se obter maior sensibilidade, as medidas de absorbâncias geralmente são feitas em um comprimento de onda correspondente ao máximo de absorção da substância em análise. Além disso, a absorbância é quase constante nos comprimentos de onda próximos ao máximo de absorção, o que leva a maior obediência da lei de Beer (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

Segundo a lei de Beer, a absorbância está relacionada linearmente com o caminho óptico, entretanto, ocorrem desvios da proporcionalidade direta entre a absorbância medida e a concentração, quando o caminho óptico da amostra é constante. Alguns desses desvios, conhecido como desvios reais, são fundamentais e representam limitações reais da lei de Beer (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

Na prática, a temperatura provoca somente efeitos secundários, exceto quando a variação de temperatura ocorre num intervalo muito grande. Entretanto,

algumas substâncias mostram absorção muito diferente se resfriadas à temperatura do nitrogênio líquido, em casos específicos é necessário realizar um controle mais preciso da temperatura. (EWING, 1972). Ainda que à temperatura constante e num solvente determinado, a absorvidade, algumas vezes, não é efetivamente constante, podendo se desviar para valores maiores ou menores (EWING, 1972).

De modo geral, não se pode prever o efeito da variação do solvente na absorção de um determinado soluto, com isto o analista se limita a um determinado solvente, ou classe de solventes em que a substância é solúvel, de modo que o efeito da variação do solvente não influencie na análise (EWING, 1972). Se a absorbância for colocada em um gráfico em função da concentração, deverá resultar em uma linha reta a partir da origem. Os desvios da lei de Beer são denominados positivos ou negativos, conforme a concavidade da curva observada (para cima ou para baixo) (EWING, 1972).



**Figura 1 – 1) Lei de Beer obedecida, 2) desvio positivo e 3) desvio negativo**  
Fonte: Ewing (1972).

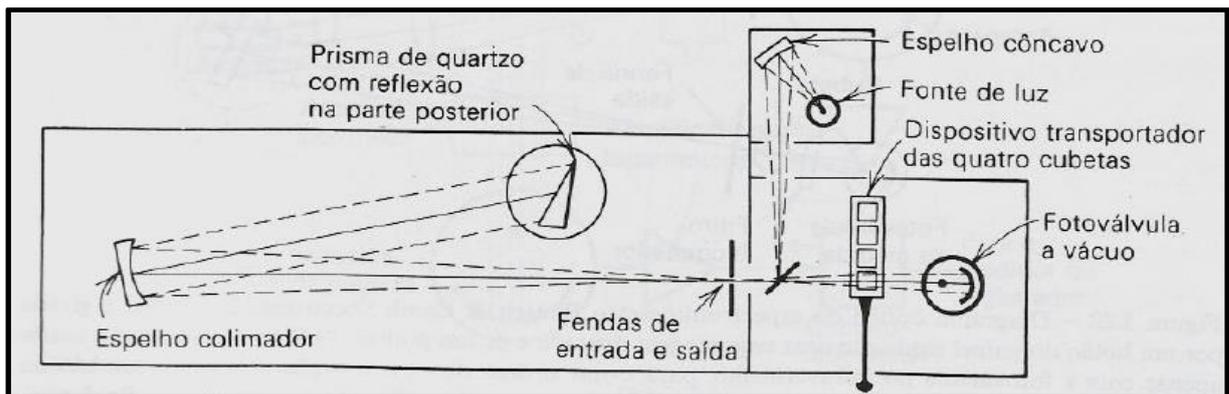
A lei de Beer parece ser seguida, razoavelmente próxima, para radiação de qualquer comprimento de onda. Entretanto, a absorbância varia com a variação do comprimento de onda. Uma curva de absorção pode variar muitas vezes com mudanças na concentração da solução resultando em desvios aparentes da lei de Beer. O fenômeno pode ser devido à interação das moléculas do soluto entre si ou com o solvente (EWING, 1972).

### 3.3.1 Espectrofotômetros de ultravioleta

Os espectrofotômetros para a região do ultravioleta e visível geralmente abrangem comprimentos de onda entre 165 a 205 nm, sendo que o limite superior nunca é menor que cerca de 650 nm e pode se estender a 1.000 nm ou mais (EWING, 1972).

O primeiro espectrofotômetro ultravioleta com detecção fotoelétrica desenvolvido nos Estados Unidos foi o Beckman Modelo DU\*. Esse instrumento contribuiu grandemente para conhecimentos teóricos e analíticos na região ultravioleta. Esse espectrofotômetro foi pouco modificado nos anos seguintes, aumentando sua sensibilidade e a conveniência de seu manuseio, e é essencialmente o mesmo instrumento utilizado até hoje (EWING, 1972).

O sistema óptico do Beckman DU é mostrado na figura 2. Há lâmpadas de tungstênio e hidrogênio ou deutério intercambiáveis e, também, fotoválvulas intercambiáveis a fim de cobrir todo o intervalo. Dispõe-se, opcionalmente, de um fotomultiplicador, que aumenta em cerca de dez vezes a sensibilidade do limite do ultravioleta para mais ou menos 625 nm (EWING, 1972).



**Figura 2 – Sistema óptico do espectrofotômetro Beckman Modelo DU (Beckman Instruments, Inc., Fullerton, Califórnia)**  
 Fonte: Ewing (1972).

As medidas do zero, como se utiliza no modelo DU conferem maior precisão do que aquela obtida por medida direta. Uma das razões é a escala de transmitância que pode ser maior e, portanto, pode ser lida com maior precisão.

Outra razão é que o amplificador precisa apenas ser sensível, não concomitantemente linear, pois é sempre conduzido ao mesmo nível de sinal, quando se faz uma medida (EWING, 1972).

Uma variação importante do espectrofotômetro manual convencional, tal como o DU, é a utilização de um sistema fotométrico diferente, onde o detector é um fotomultiplicador operado a corrente constante, em vez de a voltagem constante. Operando dessa maneira, a curva característica do fotomultiplicador é registrada em um gráfico como potencial do ânodo em função da iluminação, sendo muito próxima de logarítmica e podendo se tornar precisamente logarítmica por um simples sistema eletrônico de compensação (EWING, 1972).

Como vantagem tem-se a leitura direta da absorbância, até um valor de absorbância igual ou maior do que, correspondendo, assim, a 0,1% de transmitância (T). A estabilidade do sistema tanto a curto, como em longo prazo é excepcionalmente boa, de modo que estudos cinéticos podem ser seguidos por horas ou dias sem desvio objeccionável do zero (EWING, 1972).

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 TIPO DE PESQUISA**

Trata-se de uma pesquisa experimental, com a finalidade de analisar e quantificar o valor médio da atividade das enzimas lipoxigenases L1 e L3 em genótipos de soja convencionais e transgênicos utilizando-se método espectrofotométrico. A metodologia aplicada foi à quantitativa, devido à obtenção de resultados numéricos.

### **4.2 MATERIAL EM ESTUDO**

Os grãos de soja dos genótipos estudados foram fornecidos pela Embrapa Soja da cidade de Londrina/PR. Os oito genótipos de soja estudados foram: convencionais BRS 232, BRS 284, BRS 361, BRS 317; transgênicos BRS 359 RR, BRS 360 RR, BRS 378 RR e uma linhagem BR 0955277 RR1. Para a realização das análises foram utilizadas as instalações e equipamentos do Laboratório de Análises Físico-químicas da Área de Melhoramento Genético da Embrapa Soja, além disso, os reagentes necessários para realização desse estudo foram fornecidos pela mesma empresa.

### **4.3 MÉTODOS**

#### **4.3.1 Determinação das absorvâncias no espectrofotômetro**

As absorvâncias foram determinadas em espectrofotômetro da marca CECIL, modelo 3000 SERIES. Foram realizadas leituras da absorvância na região

do ultravioleta entre 234 e 280 nm, em intervalos de tempo de 30 em 30 segundos durante 4 minutos e 4 minutos e 30 segundos, no sobrenadante (extrato bruto) obtido a partir de grãos de soja triturados. Esses dados obtidos foram utilizados para calcular a  $\Delta DO$  (Variação de densidade ótica por minuto por mL de extrato) (TANTEERATARM; WEINGARTNER, 1999).

Os comprimentos de onda utilizados para determinação das enzimas lipoxigenases foram selecionados após varreduras prévias para detecção de picos de absorvância específicos para cada isoenzima.

#### 4.3.2 Determinação da atividade das lipoxigenases L1 e L3

##### 4.3.2.1 Preparo das amostras

Os grãos de soja foram moídos em moinho refrigerado multiuso Tecnal TE - 631/2, 0,1 g da amostra moída foram transferidas para um almofariz previamente gelado (deixar em geladeira por uma noite) e homogeneizado em presença de 3 mL de solução extratora de lipoxigenases.

O homogenato foi deixado em geladeira por 30 minutos e em seguida transferido para tubos tipo eppendorf e centrifugado a 5.500 rpm por 15 minutos a 4° C em centrifuga Eppendorf 5417R. Após a centrifugação os tubos foram retirados da centrifuga e armazenados em isopor contendo gelo durante as leituras, ou em *freezer* se as leituras não forem realizadas logo após a centrifugação. O sobrenadante foi utilizado na determinação das atividades de L1 e L3 (TANTEERATARM; WEINGARTNER, 1999).

### 4.3.3 Preparo das soluções para determinação das atividades das isoenzimas

#### 4.3.3.1 Solução de linoleato de sódio

Para o preparo das soluções dos substratos foram pesados 70 mg de ácido linoleico e 70 mg de Tween 20 que foram homogeneizados com 4 mL de água destilada (essa água destilada deve ser ultrasonificada sob vácuo durante 20 minutos antes do seu uso) com auxílio de uma espátula de plástico. Adicionou-se aos poucos uma solução de NaOH 0,1 M até que a solução ficasse incolor. Essa solução foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL e o volume foi completado com água destilada (ultrasonificada). O balão volumétrico foi revestido com papel alumínio e armazenado sob refrigeração a 4° C (TANTEERATARM; WEINGARTNER, 1999).

#### 4.3.3.2 Tampão Tris-HCl pH 6,8

Para o preparo do Tampão Tris-HCl foram pesados 7,475 g de Trizma, que foram dissolvidos com 80 mL de água destilada deionizada. Titulou-se a solução com HCl 6 M até atingir pH 6,8 e o volume foi então completado com água destilada deionizada até 100 mL. Essa solução foi filtrada e armazenada em temperatura ambiente (TANTEERATARM; WEINGARTNER, 1999).

#### 4.3.3.3 Tampão Tris-HCl 0,06 M

Para o preparo do Tampão Tris-HCl 0,06 M foi medido um volume de 50 mL da solução do tampão Tris-HCl o qual foi adicionado de 21,9 mL de solução de HCl 0,06 M e diluído em 200 mL, pH 8,2 (TANTEERATARM; WEINGARTNER, 1999).

#### 4.3.3.4 Solução extratora de lipoxigenase

Para o preparo da solução extratora foram misturadas partes iguais de solução de  $\text{CaCl}_2$  0,015 M, solução de Sacarose 13% e tampão Tris – HCl 0,06 M (TANTEERATARM; WEINGARTNER, 1999).

#### 4.3.3.5 Solução fosfato de sódio 0,2 M pH 6,8

Para o preparo da solução de fosfato de sódio 0,2 M, foram dissolvidos em água quente 27,60 g de fosfato de sódio e o volume foi completado para 1 litro. Caso a solução não atingir o pH desejado de 6,8 este deve ser ajustado com soluções de NaOH 0,1 M ou com solução de HCl 0,1 M (TANTEERATARM; WEINGARTNER, 1999).

#### 4.3.3.6 Solução borato de sódio 0,2 M pH 9,0

Para o preparo da solução borato de sódio 0,2 M, foram dissolvidos em água quente 76,28 g de borato de sódio e o volume foi completado para 1 litro. Caso a solução não atingir o pH desejado de 9,0 este deve ser ajustado com soluções de NaOH 0,1 M ou com solução de HCl 0,1 M (TANTEERATARM; WEINGARTNER, 1999).

#### 4.3.4 Determinação das atividades da lipoxigenase L1 e L3

##### 4.3.4.1 Determinação da atividade da isoenzima L1

O espectrofotômetro foi ajustado num comprimento de onda de 234 nm. Na cubeta de quartzo foram adicionados 3 mL de solução borato de sódio 0,2 M pH 9,0 e 75 µL do substrato linoleato de sódio 10 mM. A cubeta foi vedada com filme plástico e a solução no interior da mesma foi homogeneizada por inversão. O espectrofotômetro foi zerado com essa mistura. Após zerar o aparelho foi retirada a cubeta e acrescentado 7,5 µL do extrato bruto da amostra, o cronômetro foi disparado e a leitura foi realizada durante 4 minutos, anotando as absorvâncias de 30 em 30 segundos. Esse procedimento foi feito para cada uma das amostras dos oito genótipos estudados (TANTEERATARM; WEINGARTNER, 1999).

##### 4.3.4.2 Determinação da atividade da isoenzima L3

O espectrofotômetro foi ajustado num comprimento de onda de 280 nm. Na cubeta de quartzo foram adicionados 3 mL de solução fosfato de sódio 0,2 M pH 6,8 e 75 µL do substrato linoleato de sódio 10 mM. A cubeta foi vedada com filme plástico e a solução no interior da mesma foi homogeneizada por inversão. O espectrofotômetro foi zerado com essa mistura. Após zerar o aparelho foi retirada a cubeta e acrescentado 150 µL do extrato bruto da amostra, o cronômetro foi disparado e a leitura foi realizada durante 4 minutos e 30 segundos, anotando as absorvâncias de 30 em 30 segundos. Esse procedimento foi feito para cada uma das amostras dos oito genótipos estudados (TANTEERATARM; WEINGARTNER, 1999).

#### 4.3.4.3 Cálculos

A leitura das absorvâncias foi realizada ao longo de 4 minutos para isoenzima L1 e 4 minutos e 30 segundos para isoenzima L3. O valor das absorvâncias foi registrado a cada intervalo de 30 segundos.

A determinação das atividades das enzimas L1 e L3 das amostras dos oito genótipos estudados foram realizadas em quadruplicata para cada genótipo.

Uma unidade de atividade (UA) de lipoxigenase foi definida como sendo a quantidade de enzima (mg) capaz de produzir uma variação de densidade ótica ( $\Delta DO$ ) igual a 0,001 unidade por minuto.

#### 4.3.5 Tratamento dos dados

Os dados das atividades de lipoxigenases (L1 e L3) foram analisados pelo software Assistat 7.7 beta e foram submetidos ao teste estatístico de comparação de médias de Tukey ao nível de 5% e 1% de significância.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo aponta que para atividade de lipoxigenase L1, pode-se afirmar que houve diferença estatisticamente significativas nas atividades determinadas (Tabela 1).

Na Tabela 1, são apresentados os resultados obtidos para atividade da isoenzima L1 nos genótipos de soja analisados. Pode-se observar que a linhagem BR 0955277 RR1 apresentou o menor valor para atividade de L1, onde a média das leituras de atividade foi de 0,1830 UA/por minuto. As cultivares BRS 317, BRS 360 RR, BRS 232, BRS 361, BRS 359 RR, BRS 378 RR apresentaram médias de atividade semelhantes que não diferiram estatisticamente entre si. As cultivares BRS 284, BRS 317, BRS 360 RR também apresentaram médias de atividade semelhantes e que não diferiram estatisticamente entre si. Entretanto, a cultivar BRS 284 apresentou o maior valor para atividade da enzima L1 sendo a sua média igual a 0,6010 UA/por minuto. Essas comparações foram realizadas utilizando-se o teste de Tukey com erro de 5% de significância.

**Tabela 1 – Atividade de lipoxigenase L1 (UA/minuto) dos diferentes genótipos de soja.**

Num. Ordem	Num. Trat.	Nome	Num. Repetição	Médias	
1	2	BRS 284	4	0,6010 a	0,6010 A
2	4	BRS 317	4	0,4905 ab	0,4905 AB
3	6	BRS 360 RR	4	0,4425 ab	0,4425 AB
4	1	BRS 232	4	0,3852 b	0,3852 B
5	3	BRS 361	4	0,3705 b	0,3705 BC
6	5	BRS 359 RR	4	0,3520 b	0,3520 BC
7	7	BRS 378 RR	4	0,3507 b	0,3507 BC
8	8	BR 0955277 RR1	4	0,1830 c	0,1830 C

**Médias de atividade de lipoxigenase seguidas de letras minúsculas iguais, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p \geq 0,05$ ) na mesma coluna. Médias de atividade de lipoxigenase seguidas de letras maiúsculas iguais, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p \geq 0,01$ ) na mesma coluna.**

Na mesma Tabela 1, analisando-se os resultados com erro de 1% de significância, observou-se que a linhagem BR 0955277 RR1 obteve o menor valor médio de atividade enzimática, entretanto essa linhagem apresentou média muito próxima das cultivares BRS 361, BRS 359 RR, BRS 378 RR, podendo assim afirmar que não diferiram significativamente. As cultivares BRS 284, BRS 317, BRS 360 RR possuem médias de atividade próximas e não diferiram significativamente e as cultivares BRS 317, BRS 360 RR, BRS 232, BRS 361, BRS 359 RR, BRS 378 RR também possuem médias de atividade não diferindo significativamente. A cultivar BRS 284 apresentou média de atividade de lipoxigenase L1 igual 0,6010 UA/por minuto, sendo, portanto o genótipo com maior atividade.

As cultivares que apresentam maiores valores de atividade da enzima L1, quando processadas termicamente de maneira inadequada irão apresentar um sabor característico mais acentuado, denominado “beany flavor”, ou sabor de feijão cru, do que cultivares com menores valores de atividade enzimática. Esse sabor característico da soja e derivado, processados de maneira inadequada, é originado a partir da associação de compostos carbonílicos de cadeia curta com a fração proteica. Esses compostos carbonílicos são produtos finais de uma série de reações que se iniciam com a hidroxidação dos ácidos graxos poliinsaturados, reações essas que são catalisadas pelas enzimas lipoxigenases (FELIX; CANNIATTI-BRAZACA; MACHADO, 2011).

Oxidações mínimas dos ácidos graxos poliinsaturados são capazes de formar compostos como o n-hexanal, n-pentilfurano, 2 (1-pentil) furano e o etil vinil cetona, que são os principais compostos responsáveis pelo sabor característico ou “sabor indesejável” de produtos de soja processados termicamente de maneira inadequada. Uma série de outros compostos também são formados, como por exemplo, álcoois, aldeídos, cetonas, nitrilos e compostos contendo enxofre (RACKIS, 1970 apud BORDINGNON; MANDARINO, 1994<sup>8</sup>).

Vários processos foram estudados visando à inativação ou remoção das enzimas lipoxigenases em grãos de soja. Entretanto, estes processos geralmente são caros e aumentam o custo do produto final. Com objetivo de minimizar esse problema, pesquisas de melhoramento genético têm sido realizadas com a finalidade de se obter cultivares com ausência destas isoenzimas. O Programa de

---

<sup>8</sup> RACKIS, 1970. In: BORDINGNON, José R.; MANDARINO, José M. G. Soja: composição química, valor nutricional e sabor. **Embrapa-CNPSo**, Londrina, issn 0101-5494, p.32, 1994.

Melhoramento Genético da Embrapa Soja desenvolveu duas cultivares de soja com ausências das três enzimas lipoxigenases. A primeira cultivar desenvolvida foi a BRS 213 (ALMEIDA; KIIHL; GOMIDE, 2002) e a segunda cultivar foi a BRS 257 (PÍPOLO et al., 2005).

No Gráfico 1, está demonstrada a variação das médias de atividade da enzima lipoxigenase L1 para cada um dos genótipos de soja estudados.

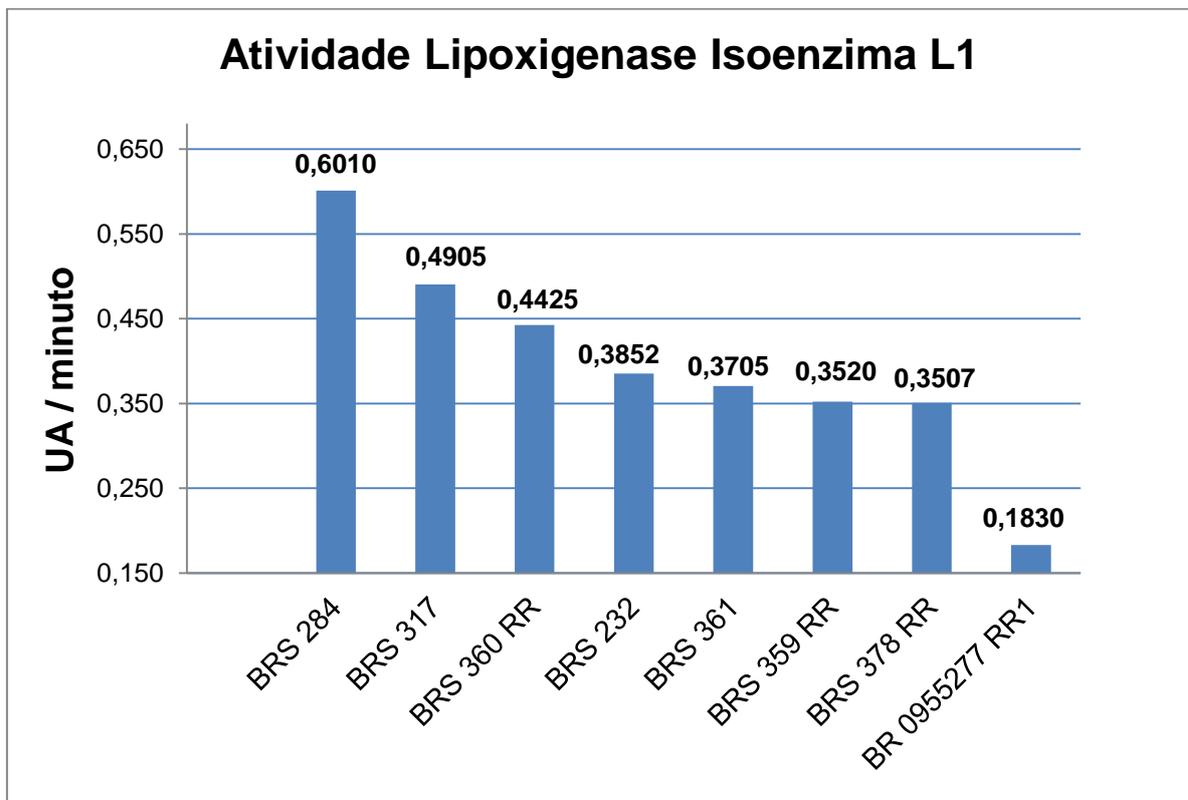


Gráfico 1 – Médias de atividade enzimática para isoenzima L1 dos diferentes genótipos de soja.

Comparando-se os genótipos transgênicos com as convencionais, observa-se que 3 dos 4 genótipos transgênicos avaliados apresentaram menor média de atividade enzimática para isoenzima L1, e a linhagem BR 0955277 RR1 apresentou menor atividade do que ambas. Na tabela 2 são apresentados os resultados obtidos para isoenzima L3.

A partir dos resultados, pode-se observar que os valores de atividade para isoenzima L3 foram próximos entre os genótipos. A isoenzima L3 é mais

estável do que a L1 e tem menor influência na qualidade dos grãos de soja com relação ao sabor, desta maneira não afetando o sabor dos produtos derivados de soja (BARROS et al., 2008).

A partir dos resultados apresentados na Tabela 2, pode-se afirmar que os genótipos não diferiram significativamente pelo teste de Tukey ( $p \geq 0,05$ ) e, também, mantiveram os mesmos resultados não diferindo significativamente pelo teste de Tukey quando o nível de significância foi alterado ( $p \geq 0,01$ ).

**Tabela 2 – Atividade de lipoxigenase L3 (UA/minuto) dos diferentes genótipos de soja.**

Num. Ordem	Num. Trat.	Nome	Num. Repetição	Médias	
1	5	BRS 359 RR	4	0,0138 a	0,0138 A
2	6	BRS 360 RR	4	0,0128 a	0,0128 A
3	4	BRS 317	4	0,0123 a	0,0123 A
4	8	BR 0955277 RR1	4	0,0120 a	0,0120 A
5	1	BRS 232	4	0,0115 a	0,0115 A
6	7	BRS 378 RR	4	0,0103 a	0,0103 A
7	3	BRS 361	4	0,0090 a	0,0090 A
8	2	BRS 284	4	0,0085 a	0,0085 A

**Médias de atividade de lipoxigenase seguidas de letras minúsculas iguais, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p \geq 0,05$ ) na mesma coluna. Médias de atividade de lipoxigenase seguidas de letras maiúsculas iguais, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p \geq 0,01$ ) na mesma coluna.**

Analisando os resultados de atividade enzimática da isoenzima L3, pode-se concluir que não houve nenhuma diferença significativa entre as cultivares transgênicas e convencionais e nem com a linhagem BR 0955277 RR1. Entretanto, a cultivar convencional BRS 284 foi aquela que apresentou a menor média de atividade enzimática (0,0085 UA/minuto).

No Gráfico 2, está demonstrada a variação das médias de atividade da enzima lipoxigenase L3 para cada um dos genótipos de soja estudados.

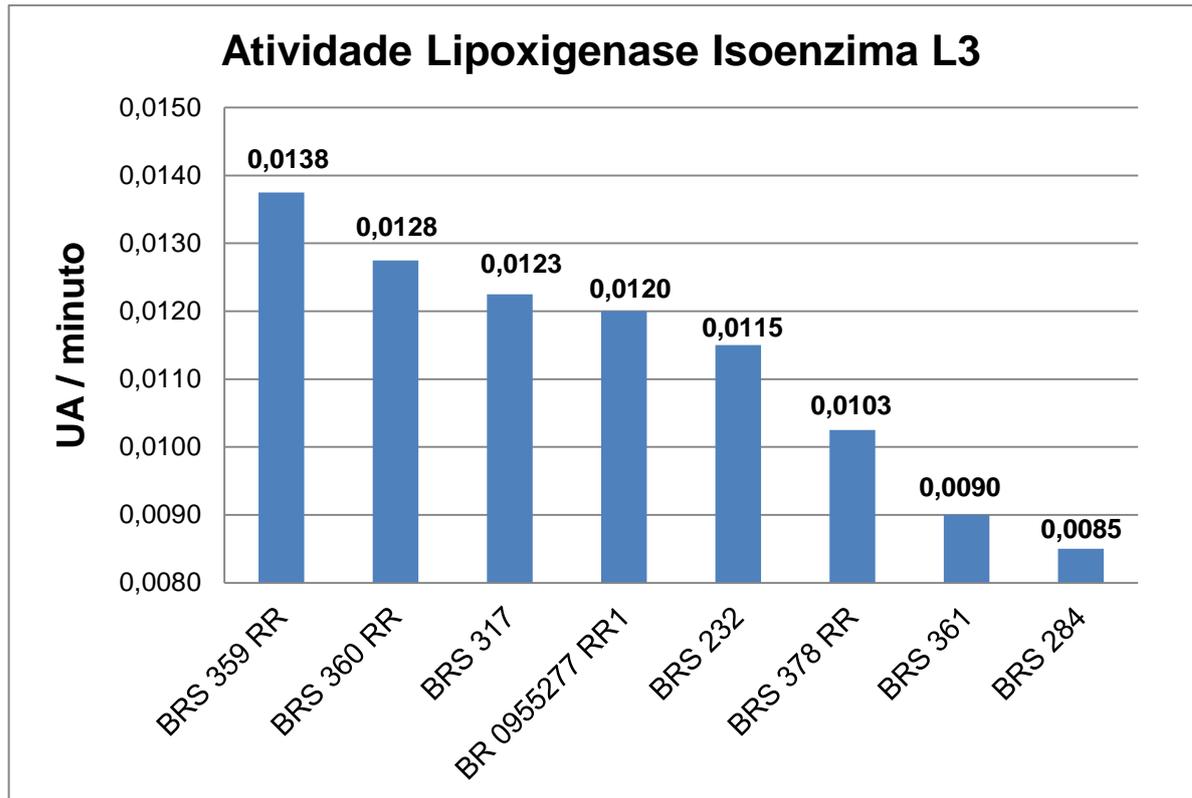


Gráfico 2 – Médias de atividade enzimática para isoenzima L3 dos diferentes genótipos de soja.

## 6 CONCLUSÃO

O método utilizado para determinar a atividade das isoenzimas L1 e L3 foi o da espectrofotometria, o qual apresenta vantagem de ser extremamente rápido e de alta sensibilidade.

Os resultados obtidos no presente estudo apontam a cultivar BRS 284 como a que obteve menor média de atividade para isoenzimas L3. Entretanto, a lipoxigenase L3 não afeta drasticamente o sabor dos grãos de soja. Assim sendo, essa cultivar não deve ser a de escolha para utilização na alimentação humana, quando houverem outras opções de cultivares que apresentaram menores valores de atividade enzimática para a isoenzima L1.

A cultivar BRS 284 obteve a maior média de atividade para isoenzima L1, sendo essa cultivar descartada para alimentação humana. Os resultados apontam a linhagem BR 0955277 RR1 como a mais adequada para o consumo humano, pois apresentou a menor média de atividade enzimática para isoenzima L1. Portanto, essa linhagem após ser aprovada nos testes agronômicos poderá vir a se transformar numa cultivar promissora para a utilização na alimentação humana.

Quanto menor a atividade enzimática para lipoxigenase maior será sua aceitabilidade, pois a cultivar irá apresentar menor “beany flavor”, o que é um dos principais fatores apontado como sendo a principal causa para a rejeição aos produtos de soja processados inadequadamente.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, L.A.; KIIHL, R.A.S.; GOMIDE, F.B. **Indicação da cultivar de soja BRS 213 para o estado de São Paulo.** In: Reunião de pesquisa de soja da região central do Brasil, 2002, São Pedro, SP. Resumos, Londrina: Embrapa Soja, doc. 185, p. 85-86, 2002.
- BARROS, Josie G. A. et al. Efeito do inibidor de protease Kunitz sobre níveis de lipoxigenases em sementes de soja. **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v. 32, n. 4, p. 1126-1132, jul.-ago., 2008.
- BATISTA, Rosa B. et al. Efeito da aplicação foliar de ácidos graxos na “via das lipoxigenases” de plantas de soja. **Quim. Nova.**, Viçosa, v. 25, n. 6, p. 914-920, jan., 2002.
- BICKEL, Ulrike. **Brasil: Expansão da soja, conflitos sócio-ecológicos e segurança alimentar.** 2004. 169 f. Tese (Mestrado em Agronomia Tropical) – Faculdade de Agronomia, Universidade de Bonn, Alemanha, 2004.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Cultura: Soja.** Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/soja/saiba-mais> Acesso em: 04 jan 2013.
- BORDINGNON, José R.; MANDARINO, José M. G. Soja: composição química, valor nutricional e sabor. **Embrapa-CNPSO**, Londrina, issn 0101-5494, p. 32, 1994.
- CARRÃO-PANIZZI, Mercedes C.; MANDARINO, José Marcos G. **Soja: Potencial de Uso na Dieta Brasileira.** Londrina, Embrapa-CNPSO, doc. 113, p.16, 1998.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos, primeiro levantamento, outubro 2012.** Companhia Nacional de Abastecimento-Brasília: Conab, 2012.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos, terceiro levantamento, dezembro 2013.** Companhia Nacional de Abastecimento-Brasília: Conab, 2013.
- DALL’AGNOL, Amélio et al. Circular Técnica 43: O complexo agroindustrial da soja brasileira. **Embrapa**, Londrina, issn 1516-7860, p. 1-12, set., 2007.

DAVRIEUX, F.; THURIÈS, L; BASTIANELLI, D. 2005. In: **Journées organiques de Phalippou-Frayssinet**, 2005, Rouairoux, France. s.l.: s.n., 1 diaporama (26 vues). Journées Organiques de Phalippou-Frayssinet, 2005, Rouairoux, France.

EMBRAPA. **Soja: História**. Disponível em:  
[http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op\\_page=112&cod\\_pai=33](http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=112&cod_pai=33) Acesso em:  
07 jan 2013.

EVANGELISTA, Carlos M.; REGITANO-D'ARCE; Marisa, A. B. Análise espectrofotométrica da ação das lipoxigenases em grãos de soja macerados em diferentes temperaturas. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 17, n. 3, p. 270-274, set.-dez., 1997.

EWING, Galen W. Métodos instrumentais de análise química. In:\_\_\_\_\_. **A absorção de radiação: ultravioleta visível**. São Paulo: Blucher, v. 1, p. 41-87, 1972.

FELIX, Mônica A.; CANNIATTI-BRAZACA, Solange G. C.; MACHADO, Flávia M. V. F. Análise sensorial dos grãos de soja [Glycine Max (L.) Merrill] tostados por diferentes tratamentos. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 31, n. 1, p. 56-64 jan.-mar., 2011.

HOLLER, James F.; SKOOG, Douglas A.; CROUCH, Stanley R. Princípios da análise instrumental. In:\_\_\_\_\_. **Introdução à espectrometria de absorção molecular no ultravioleta-visível**. 6º ed. Porto Alegre: Bookman, 2009, p. 350-380.

HOLLER, James F.; SKOOG, Douglas A.; CROUCH, Stanley R. Princípios da análise instrumental. In:\_\_\_\_\_. **Aplicação da espectrometria de absorção molecular no ultravioleta-visível**. 6º ed. Porto Alegre: Bookman, 2009, p. 381-412.

MARTINS, Carlos A. O. et al. Qualidade sanitária das sementes de soja sem as três lipoxigenases. **Revista Ceres**, Viçosa, v. I, n. 288, p. 241-249, fev., 2003.

PASQUINI, C. Near Infrared Spectroscopy: Fundamentals, Practical Aspects and Analytical Applications. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 14, n. 2, p. 198-219, 2003.

PÍPOLO, Antonio E. et al. **BRS 257 - nova cultivar para alimentação humana**. In: Reunião de pesquisa de soja da região central do Brasil, 2005, Cornélio Procópio, Resumos, Londrina: Embrapa Soja, doc. 257, p.371, 2005.

SCHLESINGER, Sergio. **A soja no brasil: brasil sustentável e democrático.**

Disponível em: <[uma.terra.free.fr/2Agrobusiness/Soja-Brasil.rtf](http://uma.terra.free.fr/2Agrobusiness/Soja-Brasil.rtf)> Acesso em: 06 fev 2013.

TANTEERATARM Kukiati; WEINGARTNER Karl E. Lipoxygenase assay. In:

WILLIAMS, S. W. **Soybean processing for food uses.** Urbana

Champaign: INTSOY, 1999, p. 387-391.