

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS SOCIAIS, SAÚDE E TECNOLOGIA  
CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

LUCAS ABREU RODRIGUES

AVALIAÇÃO CROMATOGRÁFICA DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS E  
ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE ESPÉCIES DE SOJAS  
TRANSGÊNICAS E NÃO TRANSGÊNICAS

IMPERATRIZ – MA

2019

LUCAS ABREU RODRIGUES

AVALIAÇÃO CROMATOGRÁFICA DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS E  
ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE ESPÉCIES DE SOJAS  
TRANSGÊNICAS E NÃO TRANSGÊNICAS

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao  
Curso de Engenharia de Alimentos do Centro  
de Ciências Sociais, Saúde e Tecnologia da  
Universidade Federal do Maranhão – UFMA,  
como requisito para a obtenção do título de  
Bacharel em Engenharia de Alimentos.

**Orientador:** Dr. Alan Bezerra Ribeiro

IMPERATRIZ – MA

2019

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Rodrigues, Lucas Abreu.

Avaliação cromatográfica dos metabólitos secundários e análise da atividade antioxidante de espécies de sojas transgênicas e não transgênicas / Lucas Abreu Rodrigues. - 2019.

29 f.

Orientador(a): Alan Bezerra Ribeiro.

Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Maranhão, Imperatriz, 2019.

1. ABTS. 2. CG-EM. 3. CLAE. 4. DPPH. I. Ribeiro, Alan Bezerra. II. Título.

LUCAS ABREU RODRIGUES

AVALIAÇÃO CROMATOGRÁFICA DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS E  
ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE ESPÉCIES DE SOJAS  
TRANSGÊNICAS E NÃO TRANSGÊNICAS

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao  
Curso de Engenharia de Alimentos do Centro  
de Ciências Sociais, Saúde e Tecnologia da  
Universidade Federal do Maranhão – UFMA,  
como requisito para a obtenção do título de  
Bacharel em Engenharia de Alimentos.

Aprovada em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof.<sup>a</sup> Dr. Alan Bezerra Ribeiro (orientador)  
Universidade Federal do Maranhão

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Lucia Fernandes Pereira  
Universidade Federal do Maranhão

---

Prof.<sup>a</sup> Dr. José de Ribamar Macedo Costa  
Universidade Federal do Maranhão

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ser meu alicerce nos momentos de dificuldades e por me cercar de pessoas incríveis que me ajudaram na caminhada até aqui.

A minha família que sempre me deu apoio, mesmo quando havia dúvidas e receios. Agradeço em especial a minha mãe e minha avó, que mostraram que sempre vale a pena perseverar nos seus objetivos e manter a autoconfiança.

Agradeço ao EsEA, pela amizade, suporte, momentos de alegria e por mudarem a minha vida. As minhas irmãs de laboratório, Mauriane Maciel e Jessica França, que tornaram todo o trabalho mais fácil e divertido.

Ao meu orientador, prof. Dr. Alan Bezerra Ribeiro, que despertou em mim a paixão pela química. A professora Dr.<sup>a</sup> Luzeli Moreira por acreditar em mim e na minha capacidade. As professoras Dr.<sup>a</sup> Ana Lucia Fernandes, Dr.<sup>a</sup> Virginia Abreu, Dr.<sup>a</sup> Tatiana Lemos e Dr.<sup>a</sup> Germania Bezerra por serem o exemplo de profissionais da engenharia de alimentos que eu quero seguir.

Por fim, agradeço a Universidade Federal do Maranhão – UFMA, por me ensinar a ser forte, a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Maranhão – FAPEMA, o Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica – PIBIC, e o Programa Foco Acadêmico, pelo suporte.

## RESUMO

A soja é uma das culturas mais cultivadas e consumidas atualmente, sendo o Brasil um dos seus maiores produtores mundiais. Tal aumento no consumo tem levantado importantes questionamentos sobre a sua parcela transgênica e sua larga utilização nos dias de hoje. Dessa forma decidiu-se avaliar a atividade antioxidante, pelos métodos DPPH e ABTS, das espécies de soja não transgênica BRS Sambaíba e BRS Pérola em comparação com a espécie transgênica BRS 279 RR, e seus metabólitos secundários por meio de análises cromatográficas (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE e Cromatografia Gasosa acoplado a Espectrometria de Massa - CG-EM). Pela CLAE, notou-se que as espécies possuíam vários aspectos em comum, porém em alguns tempos de eluição houve divergências entre os cromatogramas analisados, sugerindo a presença de diferentes metabólitos. No CG-EM, obteve-se diferenças significativas nos picos presentes em maior concentração na espécie BRS Pérola e em pouca concentração na espécie BRS Sambaíba. Os cromatogramas obtidos no CG-EM também trouxeram evidências de alterações entre as espécies não transgênicas e a transgênica que, quando avaliados na biblioteca de massas do equipamento, evidenciaram serem compostos derivados dos ácidos hexadecanóico e 9,12-octadecadienoico, sendo possível, assim, supor que a transgenia influenciou na quantidade desses ácidos, podendo afetar a qualidade dos produtos obtidos a partir da sua soja. Por meio dos métodos de DPPH e ABTS observou-se uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) com discrepância na faixa de 12 a 15% na atividade antioxidante ao se comparar as espécies de sojas transgênicas e as não transgênicas, podendo significar uma alteração entre as culturas analisadas.

**Palavras-chave:** CLAE; CG-EM; DPPH; ABTS.

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	9
MATERIAIS E MÉTODOS.....	10
Cultivo e preparo dos extratos .....	10
Avaliação dos metabólitos secundários .....	11
• Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	12
• Cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massa (CG-EM) .....	12
Avaliação da atividade antioxidante.....	14
• Método DPPH.....	14
• Método ABTS.....	15
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	15
Avaliação dos metabólitos secundários .....	15
• Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	15
• Cromatografia a gás acoplado a espectrômetro de massa (CG-EM) .....	18
Avaliação da atividade antioxidante.....	21
• Método DPPH.....	21
• Método ABTS.....	23
CONCLUSÕES .....	24
REFERÊNCIAS .....	24

**Título em execução:** Avaliação de Metabólitos Secundários de Soja.

**Categoria do manuscrito:** Ciência e Tecnologia de Alimentos.

**AVALIAÇÃO CROMATOGRÁFICA DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS E  
ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE ESPÉCIES DE SOJAS  
TRANSGÊNICAS E NÃO TRANSGÊNICAS**

Lucas Abreu Rodrigues<sup>1</sup>, Alan Bezerra Ribeiro<sup>1\*</sup>, Mauriane Maciel da Silva<sup>1</sup>, Paulo Henrique Aragão Catunda<sup>2</sup>, Elizabeth Nunes Fernandes<sup>3</sup> e Wilson Araújo da Silva<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Federal do Maranhão, Centro de Ciências Sociais, Saúde e Tecnologia, Curso de Engenharia de Alimentos, Imperatriz – MA, Brasil.

<sup>2</sup>Universidade Estadual do Maranhão, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Agronomia, São Luís – MA, Brasil.

<sup>3</sup>Universidade Estadual da Região Tocantina do Maranhão, Coordenação de Infraestrutura, Imperatriz – MA, Brasil.

\*alan.br@ufma.br



## INTRODUÇÃO

A soja (*Glycinemax (L.) Merr.*) é uma das culturas leguminosas mais cultivadas no mundo, cresce em climas tropicais, subtropicais e temperados e fornece proteína e óleo abundantes para alimentação humana e animal. Suas sementes contêm mais de 36% de proteína, 30% de carboidratos, 20% de lipídios e quantidades apreciáveis de fibras, vitaminas e minerais (Lim, 2012).

Segundo dados da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa, 2018), a produção média da soja brasileira na safra 2017/2018 foi de aproximadamente 119 milhões de toneladas, alcançando cerca de 35 milhões de hectares, tornando o Brasil um dos maiores produtores de soja do mundo. O Maranhão é o segundo maior produtor de soja da região nordeste brasileira, com grande destaque para as cidades das regiões centro-sul do estado (Imesc, 2018).

Os benefícios à saúde humana provindos da soja são notáveis, podendo seu uso e de seus derivados reduzir o risco de várias doenças como o câncer de mama e próstata, osteoporose, doenças cardiovasculares e os sintomas da menopausa (Deng et al., 2019; Zhao et al., 2017; Mourouti e Panagiotakos, 2013; Taku et al., 2011; Wei et al., 2012; Karsli-Ceppioglu et al., 2015; Mahmoud et al., 2014; Chhabra et al., 2018; Hillman, 2019; Jayachandran e Xu, 2019). Porém, um dos pontos de maior controvérsia existente sobre essa cultura é em relação à sua variante transgênica, ou seja, as espécies de soja que sofreram alterações genéticas a fim de obter característica específicas, como as culturas de soja transgênica *Roundup Ready*<sup>TM</sup> (RR), caracterizadas por apresentarem alta resistência ao herbicida N-(fosfometil)glicina também conhecido como glifosato (Plácido et al., 2019; Grazina et al., 2017).

É inegável que o avanço das técnicas para o melhoramento genético permitiu alcançar objetivos biotecnológicos diversos como o aumento da produtividade, redução de perdas pós-colheita, obtenção de culturas mais tolerantes ao estresse ambiental e maior resistência a herbicidas, pragas e/ou doenças. Ainda assim, estudos que evidenciem ou comprovem possíveis alterações nos componentes orgânicos dessas culturas, são escassos, principalmente quando se refere aos seus metabólitos secundários e a capacidade antioxidante dos mesmos (Arruda et al., 2016). Dessa forma, o presente estudo tem como objetivo avaliar a os metabólitos secundários das espécies de soja não transgênica BRS Sambaíba e BRS Pérola em comparação com a espécie transgênica BRS 279 RR por meio de análises cromatográficas, bem como a atividade antioxidante pelos métodos DPPH e ABTS.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Cultivo e preparo dos extratos**

As espécies de sojas que foram selecionadas para análises foram a BRS Pérola, a BRS Sambaíba (ambas não transgênicas) e a BRS 279 RR (transgênica) por serem, segundo a Embrapa (2019), entre as mais recomendáveis e as mais utilizadas na região edafoclimática do centro-sul maranhense. As sementes foram cultivadas na cidade de Imperatriz, Maranhão, Brasil (Latitude: -5.5255, Longitude: -47.477 5° 31' 32" Sul, 47° 28' 37" Oeste) em escala piloto em terrenos distintos com condições de trato e irrigação semelhantes.

Os grãos colhidos foram pesados e triturados em liquidificador industrial (Metvisa, Brusque, Santa Catarina, Brasil). Em seguida, foram submetidos à extração

sólido-líquido utilizando etanol (EtOH, 300 mL) como eluente em recipientes de vidro sendo agitados, manualmente com auxílio de bastão de vidro, três vezes em um período de 24 horas, logo após passando por filtração. Este procedimento foi realizado por três dias consecutivos sendo sempre adicionada a mesma quantidade de solvente (300 mL) a cada 24 horas para uma melhor extração dos componentes a serem analisados. Os extratos filtrados foram misturados e concentrados por meio de evaporador rotativo (Tecnal, Piracicaba, São Paulo, Brasil), obtendo-se extratos brutos das espécies de soja, segundo metodologia adaptada de Conde et al. (2013).

Os extratos foram submetidos a fracionamento por meio de colunas cromatográficas, visando realizar uma melhor separação dos compostos a serem analisados nos extratos, conforme uma metodologia adaptada a partir de Jesus et al. (2019). Inicialmente, cada extrato foi dissolvido com EtOH e depois se adicionou sílica em gel 60 (0,063-0,200 mm) para cromatografia em coluna (Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, EUA) sendo realizado uma mistura até a obtenção de um pó, que foi adicionado na parte superior da coluna cromatográfica que já havia sido preenchida com esta mesma sílica. Foram usados dois eluentes diferentes como fase móvel: hexano e EtOH nas proporções: 9:1, 7:3 e 1:1, que foram adicionados às colunas, obtendo-se frações de 250 mL para cada espécie avaliada e nas proporções de eluente utilizadas. As frações foram concentrados por meio de evaporador rotativo (Tecnal, Piracicaba, São Paulo, Brasil) e armazenadas sob refrigeração (4 °C) até o momento das análises.

### **Avaliação dos metabólitos secundários**

A avaliação dos metabólitos secundários foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e por cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massa (CG-EM).

- Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Para este teste foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência (ProStart Varian, Palo Alto, Califórnia, EUA). As frações foram diluídas em MeOH ( $0,1 \text{ g mL}^{-1}$ ) em seguida foram transferidas para um *vial* usando uma seringa com filtros de pré-tratamento miliporo (polifluoreto de vinilideno com  $0,22 \text{ }\mu\text{m}$  de espessura). Mediante uma microseringa (tipo N ponta estilo três com capacidade de  $25 \text{ }\mu\text{L}$ ), foram injetados  $20 \text{ }\mu\text{L}$  de cada amostra no CLAE, onde as substâncias foram separadas em coluna analítica C18 (25 cm de comprimento, diâmetro de 4,6 mm e espessura de fase  $5 \text{ }\mu\text{m}$ ). Foram utilizados como fase móvel metanol (MeOH) e água nas proporções: 9:1, 7:3 e 1:1 com fluxo de  $1 \text{ mL min}^{-1}$  em comprimento de onda de 254 nm com um tempo de corrida de 60 minutos realizando-se as análises em triplicata, e os picos analisados por meio de análise de variância (ANOVA) ao nível de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ) utilizando o software Assistat 7.7 segundo procedimento adaptado do estudo de Silva e Azevedo (2016) e Alezandro et al. (2008).

- Cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massa (CG-EM)

Para esta avaliação foi usado um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massa (Varian, Palo Alto, Califórnia, EUA). Na realização das análises utilizou-se uma coluna capilar (Factor Four VF 5MS CP8944 com 30 m de

comprimento, diâmetro de 0,25 mm com fase não polar de Fenil Arileno (5%-fenil) - dimetilpolisiloxano e espessura de fase de 0,25  $\mu\text{m}$ ) usando hélio como gás de arraste inerte. Preparou-se soluções na concentração de 10 mg mL<sup>-1</sup>, em MeOH, das frações de cada espécie de soja avaliada.

As frações foram submetidas à derivatização seguindo metodologia proposta por Viñas e Campillo (2019) e Benedetti et al. (2018) por meio do seguinte procedimento: 100 mg da amostra foram colocadas em tubo de ensaio onde adicionou-se 2 mL de hexano mais 0,2 mL de solução de hidróxido de potássio (2 mol L<sup>-1</sup>) em MeOH que em seguida foram agitados em vórtice por 30 segundos. Logo após, foram adicionados 3mL de solução saturada de cloreto de sódio, agitado novamente e deixado em repouso para separação das fases.

Dos recipientes mediu-se 1  $\mu\text{L}$  que foi dissolvido em 1 mL de MeOH, deste adicionou-se 1  $\mu\text{L}$  no CG-EM, com uma microseringa (tipo N ponta estilo 2 com capacidade de 10  $\mu\text{L}$ ), em triplicata com injetor manual no modo *Split*, onde uma pequena quantidade é introduzida na coluna e uma grande quantidade é ventilada (na razão de divisão de 1: 100) com temperatura inicial da rampa de aquecimento de 50 °C, mantida por um minuto. Em seguida, a temperatura foi aumentada com taxa de variação de 20 °C min<sup>-1</sup> até atingir 200 °C, a qual foi mantida por cinco minutos. Em seguida, a temperatura foi aumentada com a mesma taxa de variação para 290 °C, permanecendo por mais cinco minutos, somando-se um tempo total da corrida de 23 minutos. A rampa de aquecimento foi ajustada durante a otimização do método, de modo a permitir um melhor desempenho da técnica cromatográfica para os analitos em estudo, procedimento semelhante ao adotado por Gao et al. (2018).

## Avaliação da atividade antioxidante

A capacidade antioxidante das amostras de sojas fora avaliada por meio de dois métodos: o do 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) e o do ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS). Os dados obtidos foram avaliados por meio de análise de variância (ANOVA) ao nível de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ) utilizando o software Assistat 7.7 (Silva e Azevedo, 2016).

- Método DPPH

A atividade sequestradora de radicais livres do DPPH foi determinada pelo método descrito por Locatelli (2009) com modificações estipuladas por Sridhar e Charles (2019). Preparou-se uma solução de 0,004% de DPPH, em seguida foi preparada uma solução de Rutina (padrão). As diluições do padrão foram feitas para as seguintes concentrações: 2 / 1 / 0,5 / 0,25 mg mL<sup>-1</sup>, mesmo procedimento utilizado para os extratos de sojas a serem avaliados. As amostras foram colocadas para reagir em tubos de ensaio com 2 mL de DPPH mais 0,4 mL da amostra e as reações foram feitas em triplicata, em ambiente escuro e em intervalos de três minutos. Após 30 minutos de reação, foram feitas leituras da amostra em um espectrofotômetro (Nova Instruments, modelo 1103, Piracicaba, São Paulo, Brasil) com comprimento de onda de 517 nm. A porcentagem de inibição da descoloração do DPPH foi calculada usando a equação (1):

$$\% \text{ Inibição} = \left( \frac{a_{\text{controle}} - a_{\text{amostra}}}{a_{\text{controle}}} \right) * 100 \quad (1)$$

onde,  $a_{\text{controle}}$  é a absorbância do controle e  $a_{\text{amostra}}$  é a absorbância da espécie analisada.

- Método ABTS

O método ABTS adotado é uma adaptação dos métodos adotados por Sridhar e Charles (2019) e Mareček et al. (2017). Em um recipiente de vidro coberto com papel alumínio adicionou-se 5,0 mL de solução ABTS (7 mM) e 88 µL de solução de persulfato de potássio (140 mM). A solução obtida (radical ABTS) foi deixada em repouso, ao abrigo da luz e em temperatura ambiente por cerca de 16 h. Para a análise, usou-se um espectrofotômetro (Biospectro, modelo SP-220, Curitiba, Paraná, Brasil), que foi calibrado diluindo-se a solução radical ABTS em EtOH até se obter absorvância de  $0,700 \pm 0,050$  nm em 734 nm.

Pesou-se a Rutina (padrão) que foi dissolvida em EtOH com diluição nas concentrações: 2 / 1 / 0,5 / 0,25 mg mL<sup>-1</sup>, mesmo procedimento utilizado para os extratos de sojas que foram avaliadas. Os extratos das amostras reagiram em tubos de ensaio com 2 mL da solução radical ABTS mais 0,4 mL da amostra por cerca de seis minutos. O procedimento foi realizado em triplicata e em ambiente escuro e os valores obtidos foram analisados mediante utilização da equação (1).

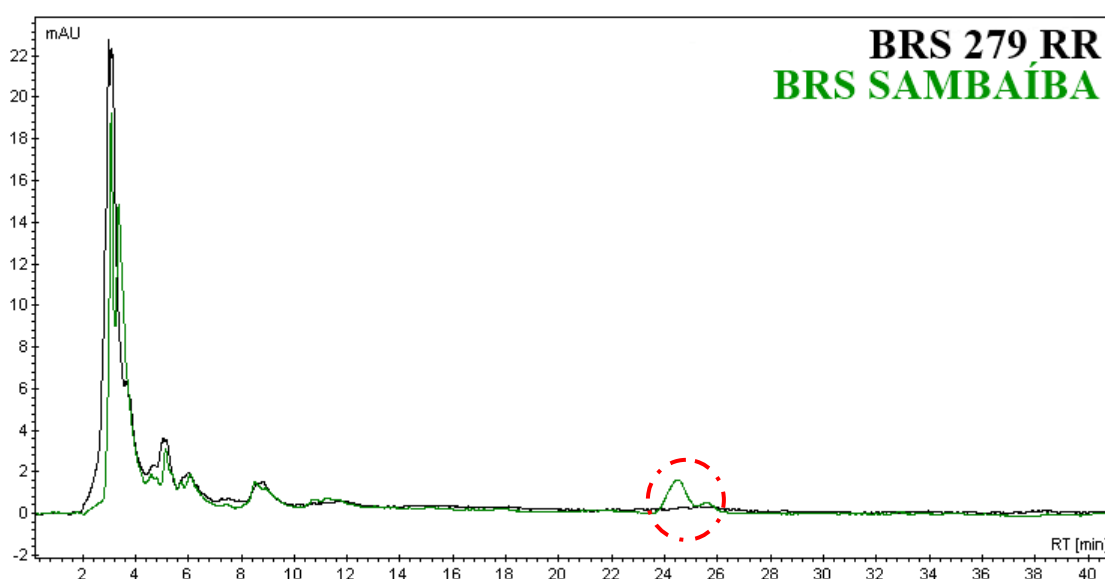
## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Avaliação dos metabolitos secundários**

- Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Nas análises realizadas no cromatógrafo líquido de alta eficiência pôde-se observar que os cromatogramas que apresentaram um grau de absorvância com menor

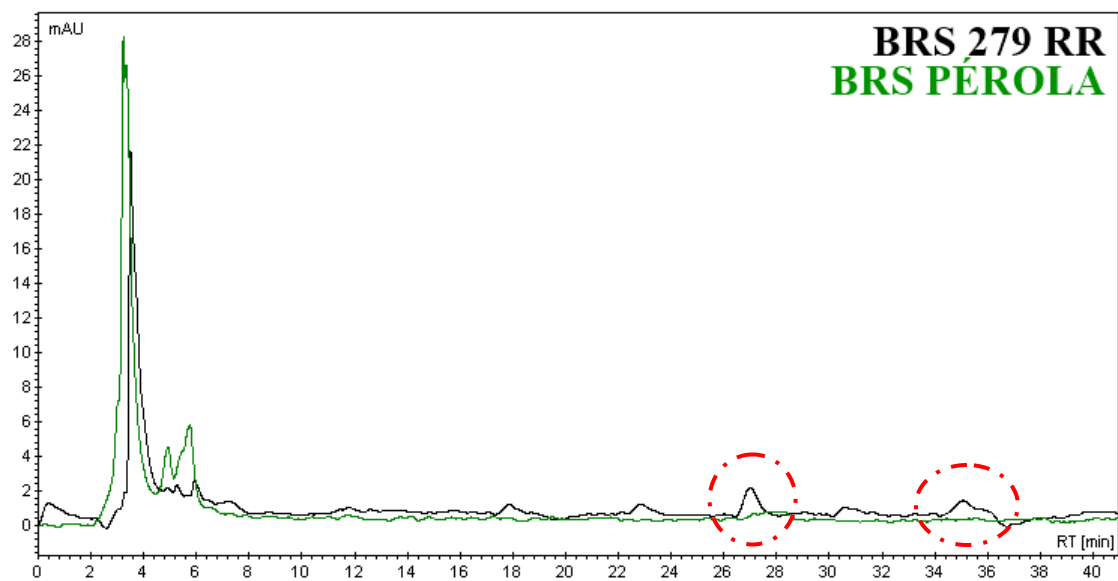
diferença entre as repetições ( $p > 0,05$ ) foram os analisados sob o comprimento de onda 254 nm, na razão 9:1 (MeOH/Água), situação semelhante à obtida por Tu et al. (2019). Ao analisar o cromatograma da fração etanólica da espécie não transgênica BRS Sambaíba em comparação com a transgênica BRS 279 RR, notou-se que as frações analisadas possuíam vários aspectos em comum, porém, em um intervalo distinto, evidenciou-se a presença de picos na soja não transgênica que estavam ausentes na soja transgênica, conforme mostrado na Figura 1.



**Figura 1** - Cromatograma comparativo entre as sojas BRS Sambaíba (não transgênica) e BRS 279 RR (transgênica) com comprimento de onda de 254 nm.

Avaliando o cromatograma obtido a partir da análise comparativa da absorbância em 254 nm da espécie não transgênica BRS Pérola em comparação com a transgênica BRS 279 RR, observou-se uma menor absorção por parte da soja transgênica em comparação com a não transgênica. Ainda assim, é possível destacar dois picos, nos intervalos de 26 a 28 minutos e 34 a 37 minutos, evidenciado na soja transgênica, mas não na não transgênica conforme apresentado na Figura 2, revelando alterações ao se comparar as espécies de soja.



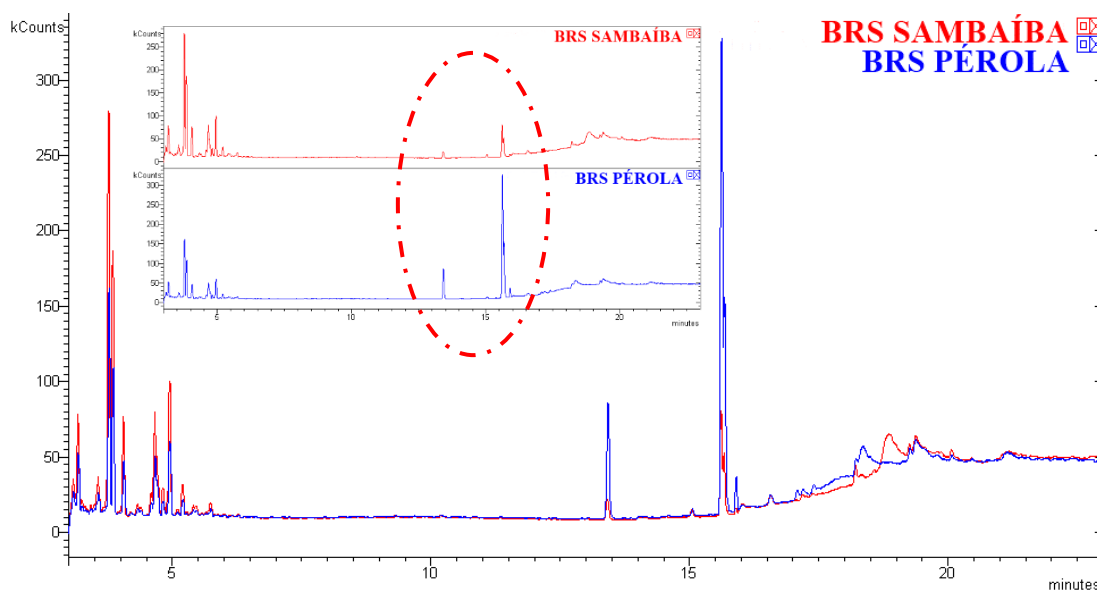


**Figura 2** - Cromatograma comparativo entre as sojas BRS Pérola (não transgênica) e BRS 279 RR (transgênica) com comprimento de onda de 254 nm.

Pode-se supor, mediante o que foi observado, que a transgenia acarretou em uma diminuição ou que até impediu a produção de um determinado metabólito, situação corroborada ao se comparar com resultados obtido por García et al. (2009) que constatarem diferenças na absorvâncias entre as espécies não transgênicas SOYB 2 e SOYB 7 com as espécies transgênicas SOYB 8 RR e SOYB 9 RR. Da mesma forma Mataveli et al. (2012), também tiveram resultados similares ao comparar a espécie não transgênica MSOY 7501 com a soja transgênica MSOY 7575 RR. Esses autores observaram a presença de picos na suas amostras não transgênicas e ausentes nas amostras da espécie transgênica, assim como também há possibilidade de ocorrer um aumento ou a produção de metabólitos ainda desconhecidos, situação semelhante obtida por Mataveli et al. (2010), quando se comparou cromatogramas da espécie não transgênica MSOY 8411 com a soja transgênica MSOY 7575 RR.

- Cromatografia a gás acoplado a espectrômetro de massa (CG-EM)

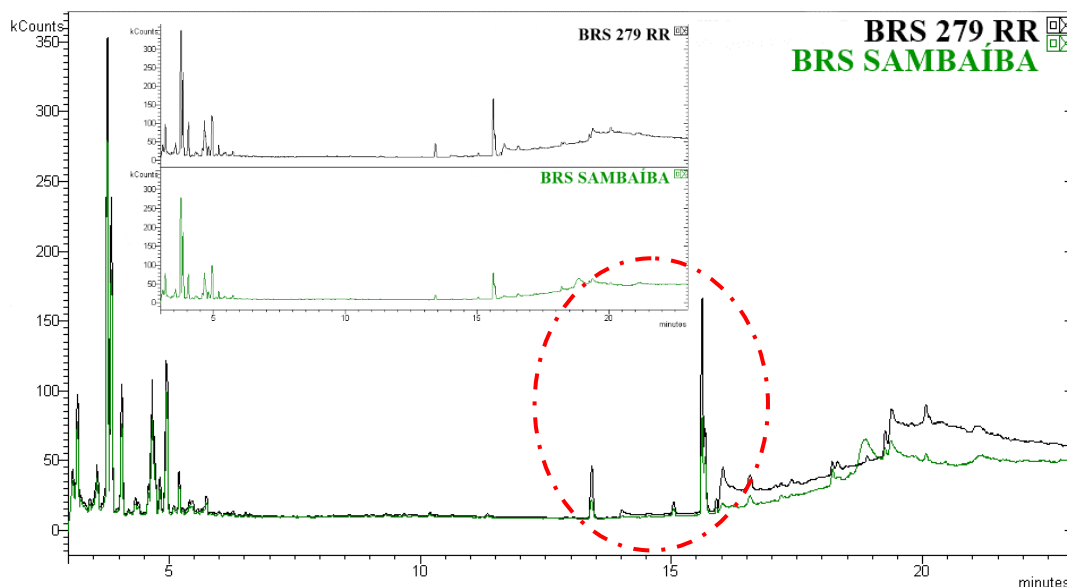
As amostras foram submetidas à derivatização e em seguida analisadas em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas com intuito de verificar uma possível alteração dos metabólitos mais apolares em espécies diferentes de soja. A Figura 3 mostra uma comparação realizada entre os cromatogramas das espécies não transgênicas.



**Figura 3** - Cromatograma comparativo entre as sojas não transgênicas BRS Pérola e BRS Sambaíba obtido em cromatógrafo a gás.

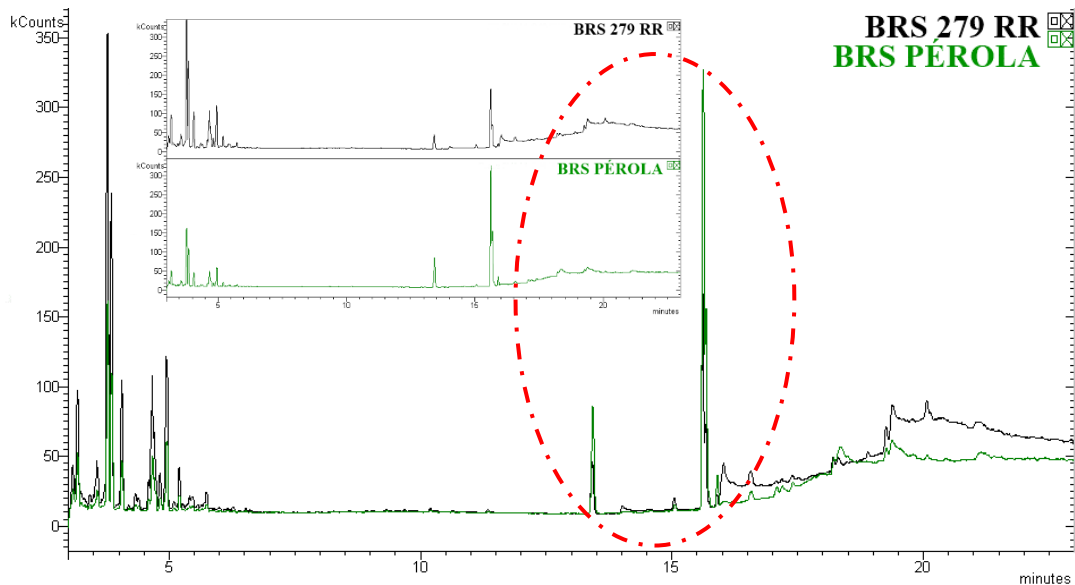
Por meio da sobreposição analisada é possível determinar que as amostras avaliadas apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) nos picos na faixa entre 13 e 16 minutos presentes em maior concentração na espécie BRS Pérola e em menor concentração na espécie de BRS Sambaíba. Tal relação é importante ser observada para ter uma melhor condição de ajuste quando se comparar as amostras com a espécie transgênica.

A Figura 4 mostra uma comparação dos cromatogramas da espécie de soja não transgênica BRS Sambaíba e da espécie transgênica BRS 279 RR. Os cromatogramas trazem evidências de que a espécie BRS 279 RR (transgênica) apresenta dois picos bem definidos na faixa entre 13 e 16 minutos em maior concentração quando comparado com a BRS Sambaíba (não transgênica). Este resultado sugere que a transgenia influenciou a espécie alterada ao apresentar constituintes químicos em maior quantidade que na espécie não transgênica.



**Figura 4** -Cromatograma comparativo entre a soja não transgênica BRS Sambaíba e a transgênica BRS 279 RR obtido em cromatógrafo a gás.

Ao se comparar os cromatogramas da espécie de soja não transgênica BRS Pérola com a espécie transgênica BRS 279 RR, apresentado na Figura 5, observa-se que a espécie BRS Pérola (não transgênica) apresenta dois picos bem definidos na faixa entre 13 e 16 minutos em maior concentração quando comparado com a BRS 279 RR (transgênica). Este resultado indica que a transgenia poderia ter influenciado a espécie alterada geneticamente ao apresentar constituintes químicos em menor quantidade que na espécie não alterada.



**Figura 5** - Cromatograma comparativo entre a soja não transgênica BRS Pérola e a transgênica BRS 279 RR obtidos em cromatógrafo a gás.

Pode-se assumir ao observar os cromatogramas obtidos, que a espécie de soja transgênica acarretou a diminuição da concentração de dois compostos, quando comparada com as culturas não transgênicas de soja semelhantes a BRS Pérola. Porém essa produção ainda é maior quando se compara com certas espécies de soja como a BRS Sambaíba (não transgênica). Bernal et al. (2008) obtiveram resultados semelhantes ao se comparar a espécie transgênica 837 ADIS com a espécie não transgênica 287 ADIS, esses autores observaram alteração nas concentrações de aminoácidos como a Leucina, Isoleucina, Ornitina e o Triptofano. Análises em condições experimentais semelhantes usando diferentes amostras, como o arroz e o mamão, também evidenciaram uma diferença entre as suas espécies não transgênicas e transgênicas como mudanças na capacidade de produção ou na criação de novos nutrientes (Kim et al., 2013; Jiao et al., 2010).

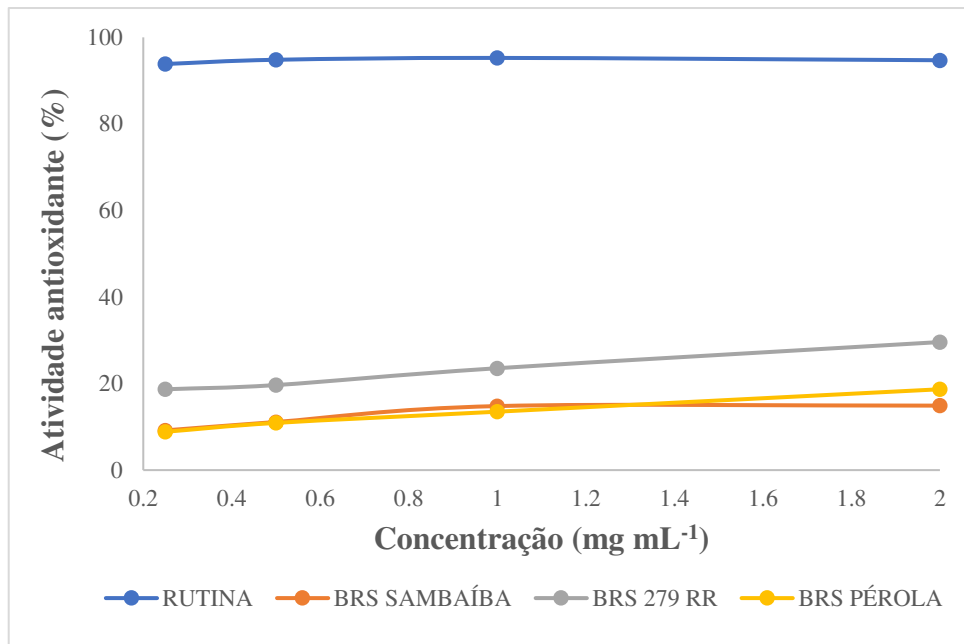
Os picos que diferiram na comparação dos cromatogramas, quando avaliados na biblioteca das massas, se mostraram serem compostos derivados do ácido

hexadecanóico, no pico apresentado por volta de 13 minutos, e 9,12-octadecadienoico, no pico apresentado por volta de 16 minutos. Na soja, os ácidos graxos insaturados correspondem a 86% do total e o ácido linoleico (9,12-octadecadienoico) encontra-se em maior concentração. Do total de ácidos graxos presentes nas espécies de soja, o palmítico (ácido hexadecanóico), pode variar em média de 8 – 17%; o esteárico de 3 – 30%; o oléico de 25 – 60%; o linoléico de 25 – 60%; e o linolênico de 2 – 15% (Hammond e Glaz, 1989).

### **Avaliação da atividade antioxidante**

- Método DPPH

Através do teste com DPPH foi possível avaliar a atividade antioxidante das amostras de soja transgênica e não transgênica. Os valores foram agrupados e apresentados na Figura 6.

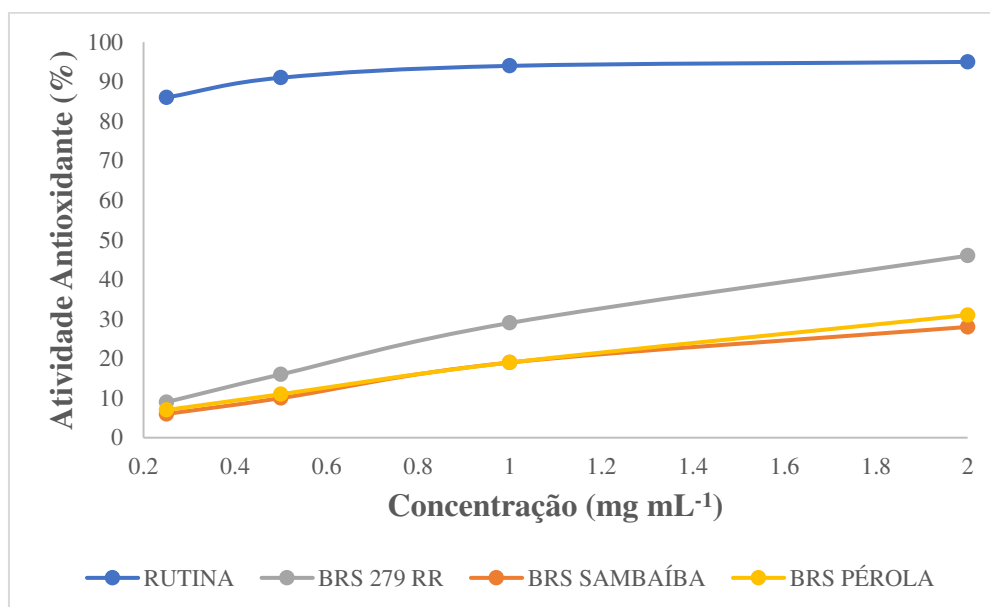


**Figura 6** - Porcentagem de redução de DPPH em presença das amostras de sojas não transgênicas BRS Sambaíba e BRS Pérola, da amostra transgênica BRS RR 279 e do padrão Rutina.

Foram detectadas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) na atividade antioxidante entre as amostras não transgênicas e a amostra transgênica, chegando a uma discrepância de até 12% entre as espécies não transgênicas com a espécie transgênica, o que pode significar uma alteração nos compostos analisados entre as espécies de soja estudadas. Essa diferença pode ser justificada ao assumir que houve um aumento da presença de compostos com maior atividade antioxidante na soja transgênica ou que houve uma alteração na composição e/ou quantidade das substâncias presentes nas sojas não transgênicas e que possam apresentar baixa atividade antioxidante. Resultado semelhante foi obtido por Tyug et al. (2010) e Thaipong et al. (2006) ao analisarem diversos produtos à base de soja, tanto de espécies transgênicas como as espécies não transgênicas.

- Método ABTS

Mediante a realização do experimento adaptado do radical ABTS obteve-se valores que foram avaliados e plotados no gráfico de dispersão apresentado na Figura 7.



**Figura 7** - Porcentagem de redução do radical ABTS em presença das amostras de sojas não transgênicas BRS Sambaíba e BRS Pérola, da amostra transgênica BRS RR 279 e do padrão Rutina.

É possível observar um comportamento da atividade antioxidante entre a soja transgênica e as não transgênicas semelhante ao obtido com o método DPPH, mesmo com as particularidades dos métodos em si, como os diferentes reagentes, tempo de reação e absorvância na leitura das amostras. Foi possível determinar que as respostas das análises das amostras em ambos os métodos apresentaram um comportamento semelhante e, assim como no método DPPH, houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as amostras não transgênicas e a amostra transgênicas, chegando a uma divergência de até 15% na Figura 7 na concentração de 2 mg mL<sup>-1</sup>. Resultado semelhante ao presente estudo foi obtido por Tyug et al. (2010) em alimentos à base de

soja e Mareček et al. (2017) ao se comparar a atividade antioxidante da cevada e do malte de origens não transgênicas e transgênicas.

## **CONCLUSÕES**

No presente estudo foi possível avaliar a atividade antioxidante, pelos métodos DPPH e ABTS, das espécies de soja não transgênica BRS Sambaíba e BRS Pérola em comparação com a espécie transgênica BRS 279 RR, e seus metabólitos secundários por meio de análises cromatográficas. Na avaliação dos metabólitos secundários notou-se que as espécies possuíam vários aspectos em comum, porém em alguns tempos de eluição houve divergências entre os cromatogramas analisados, sugerindo a presença de diferentes metabólitos. Obteve-se diferenças significativas nos picos presentes em maior concentração na espécie BRS Pérola e em pouca concentração na espécie BRS Sambaíba, trazendo evidências de alterações entre as espécies não transgênicas e a transgênica que, quando avaliados, evidenciaram serem compostos derivados dos ácidos hexadecanóico e 9,12-octadecadienoico. Por meio dos métodos de DPPH e ABTS observou-se uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) com discrepância na faixa de 12 a 15% na atividade antioxidante ao se comparar as espécies de sojas transgênicas e as não transgênicas, podendo significar uma alteração entre as culturas analisadas.

## **REFERÊNCIAS**

Alezandro, M. R.; Almeida, S. A. D.; Maia, P. P.; Carvalho, H. A. D.; Azevedo, L.; Vieira, E. P. 2008. Transgenic soybean BRS 243 RR: determination of macronutrients and isoflavones daidzein and genistein by High Performance



Liquid Chromatography (HPLC). *Food Science and Technology*, 28: 520-526 (in Portuguese, with abstract in English).

Arruda, M. A. Z.; Galazzi, R. M.; Campos, B. K.; Herrera-Agudelo, M. A.; Arruda, S. C. C.; Azevedo, R. A. 2016. Soybean as a food source: comparative studies focusing on transgenic and nontransgenic soybean. p. 3-10. In: *Genetically Modified Organisms in Food*. Academic Press, Cambridge, USA.

Benedetti, B.; Di Carro, M.; Mirasole, C.; Magi, E. 2018. Fast derivatization procedure for the analysis of phytoestrogens in soymilk by gas chromatography tandem mass spectrometry. *Microchemical Journal*, 137: 62-70.

Bernal, J. L.; Nozal, M. J.; Toribio, L.; Diego, C.; Mayo, R.; Maestre, R. 2008. Use of supercritical fluid extraction and gas chromatography–mass spectrometry to obtain amino acid profiles from several genetically modified varieties of maize and soybean. *Journal of Chromatography A*, 1192: 266-272.

Chhabra, G.; Singh, C. K.; Ndiaye, M. A.; Fedorowicz, S.; Molot, A.; Ahmad, N. 2018. Prostate cancer chemoprevention by natural agents: Clinical evidence and potential implications. *Cancer Letters*, 422: 9-18.

Conde, E.; Moure, A.; Domínguez, H.; Parajó, J. C. 2013. Extraction of natural antioxidants from plant foods. p. 506-594. In: *Separation, extraction and concentration processes in the food, beverage and nutraceutical industries*. Woodhead Publishing, Sawston, England.

Deng, K.; Mo, S.; Liu, X.; Chen, J.; Zhang, Q.; Chen, X.; Dai, S. 2019. Soy foods might weaken the sensitivity of tamoxifen in premenopausal patients with lumina a subtype of breast cancer. *Clinical Breast Cancer*, 19: 337-342.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa). 2018. Soy in numbers (2017/2018 harvest). Available at:

<https://www.embrapa.br/web/portal/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>

[Accessed April 14, 2019].

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa). 2019. Soybean cultivars portfolio. Available at: <https://www.embrapa.br/soja/cultivares> [Accessed April 14, 2019].

Gao, X.; Zhang, J.; Regenstein, J. M.; Yin, Y.; Zhou, C. 2018. Characterization of taste and aroma compounds in Tianyou, a traditional fermented wheat flour condiment. *Food Research International*, 106: 156-163.

García, M. C.; García, B.; García-Ruiz, C.; Gómez, A.; Cifuentes, A.; Marina, M. L. 2009. Rapid characterization of (glyphosate tolerant) transgenic and non-transgenic soybeans using chromatographic protein profiles. *Food Chemistry*, 113: 1212-1217.

Grazina, L.; Plácido, A.; Costa, J.; Fernandes, T. J.; Oliveira, M. B. P.; Mafra, I. 2017. Tracing two Roundup Ready™ soybean lines (GTS 40-3-2 and MON 89788) in foods commercialized in Portugal. *Food Control*, 73: 1053-1060.

Hammond, E. G.; Glatz, B. A. 1989. Biotechnology applied to fats and oils. p. 173-217. In: *Developments in Food Biotechnology*, Vol. 2. John Wiley & Sons, New York, USA.

Hillman, G. G. 2019. Soy isoflavones protect normal tissues while enhancing radiation responses. p. 62-71. In: *Seminars in radiation oncology*. Vol. 29. WB Saunders, Philadelphia, USA.

Instituto Maranhense de Estudos Socioeconômicos e Cartográficos (Imesc). Agricultural Production in the 2nd Bimester 2018. Available at: <http://imesc.ma.gov.br/portal/Post/view/30/226> [Accessed April 17, 2019].

- Jayachandran, M.; Xu, B. 2019. An insight into the health benefits of fermented soy products. *Food Chemistry*, 271: 362-371.
- Jesus, S. S.; Ferreira, G. F.; Maciel, M. R. W.; Maciel Filho, R. 2019. Biodiesel purification by column chromatography and liquid-liquid extraction using green solvents. *Fuel*, 235: 1123-1130.
- Jiao, Z.; Deng, J.; Li, G.; Zhang, Z.; Cai, Z. 2010. Study on the compositional differences between transgenic and non-transgenic papaya (*Carica papaya L.*). *Journal of Food Composition and Analysis*, 23: 640-647.
- Karsli-Ceppioglu, S.; Ngollo, M.; Judes, G.; Penault-Llorca, F.; Bignon, Y. J.; Guy, L.; Bernard-Gallon, D. 2015. The role of soy phytoestrogens on genetic and epigenetic mechanisms of prostate cancer. p. 193-221. In: *The Enzymes*. Vol. 37. Academic Press, Cambridge, USA.
- Kim, J. K.; Park, S. Y.; Lee, S. M.; Lim, S. H.; Kim, H. J.; Oh, S. D.; Ha, S. H. 2013. Unintended polar metabolite profiling of carotenoid-biofortified transgenic rice reveals substantial equivalence to its non-transgenic counterpart. *Plant Biotechnology Reports*, 7: 121-128.
- Lim, T. K. 2012. *Edible medicinal and non-medicinal plants*. Springer Publishing, Dordrecht, The Netherlands.
- Locatelli, M.; Gindro, R.; Travaglia, F.; Coisson, J. D.; Rinaldi, M.; Arlorio, M. 2009. Study of the DPPH-scavenging activity: Development of a free software for the correct interpretation of data. *Food Chemistry*, 114: 889-897.
- Mahmoud, A. M.; Yang, W.; Bosland, M. C. 2014. Soy isoflavones and prostate cancer: a review of molecular mechanisms. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 140: 116-132.

- Mareček, V.; Mikyška, A.; Hampel, D.; Čejka, P.; Neuwirthová, J.; Malachová, A.; Cerkal, R. 2017. ABTS and DPPH methods as a tool for studying antioxidant capacity of spring barley and malt. *Journal of Cereal Science*, 73: 40-45.
- Mataveli, L. R. V.; Fioramonte, M.; Gozzo, F. C.; Arruda, M. A. Z. 2012. Improving metallomics information related to transgenic and non-transgenic soybean seeds using 2D-HPLC-ICP-MS and ESI-MS/MS. *Metallomics*, 4: 373-378.
- Mataveli, L. R. V.; Pohl, P.; Mounicou, S.; Arruda, M. A. Z.; Szpunar, J. 2010. A comparative study of element concentrations and binding in transgenic and non-transgenic soybean seeds. *Metallomics*, 2: 800-805.
- Mourouti, N.; Panagiotakos, D. B. 2013. Soy food consumption and breast cancer. *Maturitas*, 76: 118-122.
- Plácido, A.; Pereira, C.; Barroso, M. F.; Santos-Álvarez, N.; Delerue-Matos, C. 2019. Chronoamperometric magnetosensing for simultaneous detection of two Roundup Ready™ soybean lines: GTS 40-3-2 and MON 89788. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 283: 262-268.
- Silva, F. D. A. E.; Azevedo, C. D. 2016. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. *African Journal of Agricultural Research*, 11: 3733-3740.
- Sridhar, K.; Charles, A. L. 2019. In vitro antioxidant activity of Kyoho grape extracts in DPPH and ABTS assays: Estimation methods for EC50 using advanced statistical programs. *Food Chemistry*, 275: 41-49.
- Taku, K.; Melby, M. K.; Nishi, N.; Omori, T.; Kurzer, M. S. 2011. Soy isoflavones for osteoporosis: an evidence-based approach. *Maturitas*, 70: 333-338.
- Thaipong, K.; Boonprakob, U.; Crosby, K.; Cisneros-Zevallos, L.; Byrne, D. H. 2006. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating

- antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19: 669-675.
- Tu, C.; Tang, S.; Azi, F.; Hu, W.; Dong, M. 2019. Use of kombucha consortium to transform soy whey into a novel functional beverage. *Journal of Functional Foods*, 52: 81-89.
- Tyug, T. S.; Prasad, K. N.; Ismail, A. 2010. Antioxidant capacity, phenolics and isoflavones in soybean by-products. *Food Chemistry*, 123: 583-589.
- Viñas, P.; Campillo, N. 2019. Gas Chromatography: Mass Spectrometry Analysis of Polyphenols in Foods. p. 285-316. In: *Polyphenols in Plants*. Academic Press, Cambridge, USA.
- Wei, P.; Liu, M.; Chen, Y.; Chen, D. C. 2012. Systematic review of soy isoflavone supplements on osteoporosis in women. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 5: 243-248.
- Zhao, T. T.; Jin, F.; Li, J. G.; Xu, Y. Y.; Dong, H. T.; Liu, Q.; Xing P.; Zhu, G. L.; Xu, H.; Miao, Z. F. 2017. Dietary isoflavones or isoflavone-rich food intake and breast cancer risk: A meta-analysis of prospective cohort studies. *Clinical Nutrition*, 38: 136-145.