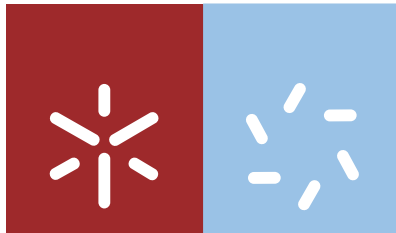


**Universidade do Minho**  
Escola de Ciências

Maria João Loureiro do Valle Pereira

**Potencial químico e biológico de rebentos de leguminosas.**  
**Alteração do metaboloma e da bioactividade de *Glycine max* (L.) Merr. pela inoculação com *Bradyrhizobium japonicum***



**Universidade do Minho**

Escola de Ciências

Maria João Loureiro do Valle Pereira

**Potencial químico e biológico de rebentos  
de leguminosas.  
Alteração do metaboloma e da bioactividade  
de *Glycine max* (L.) Merr. pela inoculação  
com *Bradyrhizobium japonicum***

Dissertação de Mestrado  
Mestrado em Biotecnologia e Bioempreendedorismo  
de Plantas Aromáticas e Medicinais

Trabalho efetuado sob a orientação da  
**Professora Doutora Paula Cristina Branquinho de Andrade**  
e co-orientação do  
**Professor Doutor Alberto Dias**

e realizado no Laboratório de Farmacognosia da  
Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

Janeiro de 2012

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA TESE APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE;

Universidade do Minho, \_\_\_\_, \_\_\_\_, \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

## **Agradecimentos**

Gostaria de começar por agradecer de uma forma sincera a todos aqueles que, directa ou indirectamente, contribuíram com o seu apoio e incentivo para que conseguisse chegar ao final desta etapa. Apesar de saber que ficam por nomear alguns colegas, amigos e professores, não poderia deixar de destacar e me revelar grata:

À Professora Doutora Paula Andrade, pela simpatia e disponibilidade com que me recebeu desde o início, por ter aceitado a minha integração no laboratório de Farmacognosia e a orientação deste projecto, acreditando nas minhas capacidades para cumprir os objectivos propostos.

À Professora Doutora Patrícia Valentão, pela simpatia e disponibilidade com que me recebeu desde o início e pelo apoio dado ao longo deste trabalho.

Ao Professor Doutor Alberto Dias, pelo seu apoio e disponibilidade sempre que necessário.

Ao Doutor Luís Silva, por todo o seu apoio e disponibilidade ao longo da realização de todo o projecto, tanto ao nível da realização do trabalho experimental como na escrita deste trabalho.

À Doutora Paula Guedes Pinho, pelo auxílio na análise dos compostos voláteis e ácidos gordos.

Ao Professor Doutor Fernando González do Departamento de produção vegetal da Escuela Superior e Técnica de Ingeniería Agrária da Universidade de Leon, pela cooperação no fornecimento das amostras analisadas.

A todos os elementos do Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto – Rui, Juliana, Fátima, Andreia, Marcos, Graciliana, Cristina e Brígida – obrigada pelo apoio dado à mínima dificuldade, por tornarem o período passado no laboratório divertido e por me fazerem sentir membro integrante da equipa e não como apenas mais um “aluno de passagem”.

Aos meus pais que sempre me apoiaram nas minhas escolhas, pelas palavras de conforto e encorajamento que me deram ânimo para continuar e por acreditarem em mim incondicionalmente. À minha irmã que esteve sempre lá para me ouvir e para dar uma palavra amiga e de confiança.

A todos os meus amigos, que me acompanharam nesta jornada. O meu agradecimento muito particular à minha companheira já de há alguns anos e grande amiga, Jessica Azevedo, por toda a ajuda no desenrolar do projecto, paciência e oportunas palavras de incentivo, porque ditas quando comigo partilhou dos mesmos problemas.

**Resumo:**

As leguminosas são uma classe de plantas muito utilizada na alimentação, sendo já 150 as espécies usadas como alimento. Além de possuírem um baixo conteúdo de lípidos, representam uma boa fonte de proteína e fibra e possuem numerosos compostos bioactivos na sua constituição, que podem produzir efeitos metabólicos e fisiológicos de interesse. Alguns deles exercem um papel relevante na prevenção de algumas doenças, tais como diabetes, doenças cardiovasculares e cancro. Habitualmente estas plantas são consumidas na forma de sementes fisiologicamente maduras ou germinadas sob a forma de rebentos. Neste trabalho foi avaliado o potencial químico e biológico de rebentos de *Glycine max* (L.) Merr., *Vigna radiata* (L.) R. Wilczek e *Medicago sativa* L., tendo-se identificado onze compostos fenólicos, incluindo quatro isoflavonas, quatro fitosteróis, dezasseis ácidos gordos, sete ácidos orgânicos e trinta e um compostos voláteis, demonstrando que os rebentos são uma boa fonte de compostos bioactivos da dieta. O potencial antioxidante foi avaliado contra três espécies reactivas, tendo-se verificado que os rebentos de *G. max* foram os mais activos contra o radical DPPH• ( $IC_{50} = 1,337$  mg/mL), enquanto os de *M. sativa* foram os mais activos contra os radicais superóxido e óxido nítrico ( $IC_{50} = 0,067$  mg/mL e  $IC_{50} = 0,426$  mg/mL, respectivamente). Posteriormente, efectuou-se o estudo da influência da inoculação de sementes de *G. max* com *Bradyrhizobium japonicum* na síntese de compostos bioactivos e na sua actividade biológica. Verificou-se que a amostra controlo continha maior quantidade de fitosteróis, de compostos voláteis, de compostos fenólicos e, paralelamente, a amostra inoculada mostrou ser mais vantajosa relativamente ao teor de ácidos orgânicos e de ácidos gordos. Relativamente ao efeito no potencial biológico de sementes *G. max*, a inoculação não teve efeito ao nível das propriedades antioxidantes, sendo a amostra controlo a mais activa. De todas as amostras analisadas, os rebentos apresentaram um potencial antioxidante superior.

**Palavras-chave:** Leguminosas, *Vigna radiata*, *Medicago sativa*, *Glycine max*, *Bradyrhizobium japonicum*, compostos bioactivos, actividade antioxidante.

**Abstract:**

Pulses are a class of plants widely used in the diet, 150 species being already consumed as food. Besides their low lipids content, they represent a good source of protein and fiber and have numerous bioactive compounds, which can produce interest metabolic and physiological effects. Some of them have a relevant role in the prevention of diseases, like diabetes, cardiovascular disease and cancer. These plants are usually consumed in the form of physiologically mature seeds or germinated as sprouts. In this work the biological and chemical profiles of *Glycine max* (L.) Merr., *Vigna radiata* (L.) R. Wilczek and *Medicago sativa* L. were studied, and eleven phenolic compounds, including four isoflavones, four phytosterols, sixteen fatty acids, seven organic acids and thirty one volatile compounds were identified, demonstrating the potential of each of these sprouts as dietary sources of bioactive compounds. The biological activities against three different reactive species were also studied. From the results obtained it was concluded that *G. max* is more active against DPPH• radical ( $IC_{50} = 1.337$  mg/mL), and *M. sativa* is more active against superoxide and nitric oxide radicals ( $IC_{50} = 0.067$  mg/mL and  $IC_{50} = 0.426$  mg/mL, respectively).

In addition, the study of the influence of *G. max* seeds inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* on the synthesis of bioactive compounds and on their biological activity was performed. It was found that the control sample contained higher amount of phytosterols, volatile compounds, phenolic compounds, while the inoculated sample was more advantageous in terms of organic acids and fatty acids. Regarding the biological potential of *G. max* seeds, the inoculation didn't produce effect on its antioxidant capacity, being the control sample the most active. The sprouts showed a higher antioxidant potential among all the analyzed samples.

**Key-words:** Pulses, *Vigna radiata*, *Medicago sativa*, *Glycine max*, *Bradyrhizobium japonicum*, bioactive compounds, antioxidant activity.

## Índice

Agradecimentos .....	iii
Resumo.....	v
Abstract .....	vi
Índice de Figuras.....	x
Índice de Tabelas .....	xii
Abreviaturas .....	xiii
I. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. Leguminosae .....	2
1.1.1. <i>Vigna radiata</i> (L.) R. Wilczek.....	4
1.1.2. <i>Medicago sativa</i> L. ....	5
1.1.3. <i>Glycine max</i> (L.) Merr. ....	5
1.1.3.1. Semente .....	7
1.1.4. Germinação e consumo de rebentos .....	9
1.2. Metaboloma .....	9
1.2.1. Compostos fenólicos.....	10
1.2.1.1. Isoflavonas.....	12
1.2.2. Fitosteróis.....	15
1.2.3. Ácidos orgânicos .....	16
1.2.4. Ácidos gordos.....	17
1.2.5. Compostos voláteis.....	20
1.3. Actividade biológica.....	21
1.3.1 Stress oxidativo .....	21
1.3.1.1 Radicais livres.....	22
1.3.1.2 Actividade antioxidante.....	23
1.3.1.2.1 Ensaio da actividade sequestrante do radical DPPH•.....	24
1.3.1.2.2. Ensaio da actividade sequestrante do radical superóxido .....	24
1.3.1.2.3. Ensaio da actividade sequestrante do radical óxido nítrico.....	25
1.3.2. Inibição da actividade da acetilcolinesterase.....	25
1.4. Bactérias nodulantes .....	26
1.4.1. <i>Bradyrhizobium japonicum</i> .....	27
1.4.2. Nodulação e fixação biológica de azoto.....	29
1.4.3. Impacto da inoculação de <i>B. japonicum</i> no metabolismo de <i>G. max</i> .....	31
II. OBJECTIVOS.....	33
III. MATERIAIS E MÉTODOS .....	34



3.1.	Substâncias de referência e reagentes .....	34
3.2.	Amostras de rebentos.....	35
3.3.	Amostras de sementes.....	35
3.3.1.	Isolamento e inoculação de <i>B. japonicum</i> .....	35
3.3.2.	Condições de crescimento.....	35
3.4.	Determinação dos compostos fenólicos .....	36
3.4.1.	Determinação das isoflavonas .....	37
3.5.	Determinação dos fitosteróis .....	38
3.6.	Determinação dos ácidos orgânicos.....	39
3.7.	Determinação dos ácidos gordos .....	39
3.8.	Determinação dos compostos voláteis .....	41
3.9.	Análise estatística .....	42
3.10.	Actividade antioxidante .....	43
3.10.1.	Avaliação da intercepção do radical DPPH• .....	43
3.10.2.	Avaliação da intercepção do óxido nítrico .....	43
3.10.3.	Actividade sequestrante do radical superóxido .....	44
3.11.	Avaliação da inibição da actividade da acetilcolinesterase.....	44
IV.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
4.1.	Rebentos de <i>G. max</i> , <i>V. radiata</i> e <i>M. sativa</i> .....	46
4.1.1.	Caracterização química .....	46
4.1.1.1.	Perfil de compostos fenólicos .....	46
4.1.1.1.1.	Perfil de isoflavonas.....	50
4.1.1.2.	Perfil de fitosteróis .....	52
4.1.1.3.	Perfil de ácidos orgânicos .....	55
4.1.1.4.	Perfil de ácidos gordos .....	58
4.1.1.5.	Perfil de compostos voláteis .....	62
4.1.2.	Actividades biológicas.....	68
4.1.2.1.	Actividade Antioxidante.....	68
4.1.2.2.	Inibição da acetilcolinesterase .....	70
4.2.	Influência da inoculação de <i>B. japonicum</i> nas sementes de <i>G. max</i> .....	71
4.2.1.	Composição química.....	71
4.2.1.1.	Perfil de compostos fenólicos .....	71
4.2.1.1.1.	Perfil de isoflavonas.....	74
4.2.1.2.	Perfil de fitosteróis .....	77
4.2.1.3.	Perfil de ácidos orgânicos .....	79
4.2.1.4.	Perfil de ácidos gordos .....	82

4.2.1.5.	Perfil de compostos voláteis .....	86
4.2.2.	Actividades biológicas .....	89
4.2.2.1.	Actividade antioxidante .....	89
4.2.2.2.	Inibição da acetilcolinesterase .....	91
4.3.	Semente vs rebentos de <i>G. max</i> .....	92
V.	CONCLUSÕES.....	96
VI.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	98

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Rebentos de <i>Medicago sativa</i> (A), <i>Glycine max</i> (B) e <i>Vigna radiata</i> (C).....	3
<b>Figura 2.</b> Dados referentes à produção mundial de soja em 2009 .....	6
<b>Figura 3.</b> Esquema representativo dos diversos constituintes das sementes de <i>G. max</i> .....	8
<b>Figura 4.</b> Estruturas químicas das principais isoflavonas existentes nas sementes de soja. ....	8
<b>Figura 5.</b> Alguns compostos fenólicos existentes nas matrizes estudadas. ....	11
<b>Figura 6.</b> Biossíntese de isoflavonas nas sementes de soja .....	13
<b>Figura 7.</b> Estruturas químicas de alguns dos fitosteróis mais representativos nas plantas. ....	15
<b>Figura 8.</b> Nódulos em raízes de <i>G. max</i> inoculada com <i>Bradyrhizobium japonicum</i> . ....	28
<b>Figura 9.</b> Etapas do processo de infecção de bactérias nodulantes .....	30
<b>Figura 10.</b> Plantas de <i>G. max</i> inoculadas com <i>B. japonicum</i> .....	36
<b>Figura 11.</b> Perfil cromatográfico dos compostos fenólicos de rebentos de <i>G. max</i> obtido por HPLC/DAD.....	46
<b>Figura 12.</b> Perfil cromatográfico dos compostos fenólicos de rebentos de <i>V. radiata</i> obtido por HPLC/DAD.....	47
<b>Figura 13.</b> Perfil cromatográfico dos compostos fenólicos de rebentos de <i>M. sativa</i> obtido por HPLC/DAD.....	48
<b>Figura 14.</b> Perfil cromatográfico das isoflavonas de rebentos de <i>G. max</i> obtido por HPLC/DAD.....	50
<b>Figura 15.</b> Perfil cromatográfico das isoflavonas de rebentos de <i>V. radiata</i> obtido por HPLC/DAD.....	51
<b>Figura 16.</b> Perfil cromatográfico das isoflavonas de rebentos de <i>M. sativa</i> obtido por HPLC/DAD.....	51
<b>Figura 17.</b> Perfil cromatográfico dos fitosteróis no extracto hidrolisado de rebentos de <i>G. max</i> obtido por HPLC/DAD .....	53
<b>Figura 18.</b> Perfil cromatográfico dos fitosteróis no extracto hidrolisado de rebentos de <i>V. radiata</i> obtido por HPLC/DAD .....	53
<b>Figura 19.</b> Perfil cromatográfico dos fitosteróis no extracto hidrolisado de rebentos de <i>M. sativa</i> obtido por HPLC/DAD .....	54
<b>Figura 20.</b> Perfil cromatográfico dos ácidos orgânicos de rebentos de <i>G. max</i> obtido por HPLC/UV.....	56
<b>Figura 21.</b> Perfil cromatográfico dos ácidos orgânicos de rebentos de <i>V. radiata</i> obtido por HPLC/UV.....	56
<b>Figura 22.</b> Perfil cromatográfico dos ácidos orgânicos de rebentos de <i>M. sativa</i> obtido por HPLC/UV.....	57

<b>Figura 23.</b> Perfil cromatográfico dos ácidos gordos de rebentos de <i>G. max</i> (A), <i>V. radiata</i> (B) e <i>M. sativa</i> (C) obtido por GC-MS.....	59
<b>Figura 24.</b> Perfil cromatográfico de compostos voláteis de rebentos de (A) <i>M. sativa</i> , (B) <i>V. radiata</i> e (C) <i>G. max</i> obtido por HS-SPME/GC-MS .....	63
<b>Figura 25.</b> Análise de componentes principais que mostra a dispersão das diferentes classes de compostos voláteis pelos diferentes rebentos. ....	67
<b>Figura 26.</b> Efeito dos extractos aquosos de rebentos de <i>G. max</i> , <i>V. radiata</i> e <i>M. sativa</i> na intercepção dos radicais (A) DPPH•, (B) superóxido e (C) óxido nítrico.....	69
<b>Figura 27.</b> Perfil cromatográfico dos compostos fenólicos de sementes <i>G. max</i> obtido por HPLC/DAD. ....	71
<b>Figura 28.</b> Perfil cromatográfico dos compostos fenólicos de sementes <i>G. max</i> inoculadas com <i>B. japonicum</i> obtido por HPLC/DAD. ....	72
<b>Figura 29.</b> Perfil cromatográfico de isoflavonas de sementes <i>G. max</i> obtido por HPLC/DAD .	74
<b>Figura 30.</b> Perfil cromatográfico de isoflavonas de sementes <i>G. max</i> inoculadas com <i>B. japonicum</i> obtido por HPLC/DAD. ....	75
<b>Figura 31.</b> Perfil cromatográfico dos fitosteróis do extracto hidrolisado de sementes de <i>G. max</i> obtido por HPLC/DAD .....	78
<b>Figura 32.</b> Perfil cromatográfico dos fitosteróis do extracto hidrolisado de sementes de <i>G. max</i> inoculadas com <i>B. japonicum</i> obtido por HPLC/DAD .....	78
<b>Figura 33.</b> Perfil cromatográfico dos ácidos orgânicos de sementes de <i>G. max</i> obtido por HPLC/UV.....	80
<b>Figura 34.</b> Perfil cromatográfico dos ácidos orgânicos de sementes de <i>G. max</i> inoculadas com <i>B. japonicum</i> obtido por HPLC/UV.....	80
<b>Figura 35.</b> Perfil cromatográfico dos ácidos gordos de sementes de <i>G. max</i> obtido por GC-MS. (A) controlo e (B) inoculadas com <i>B. japonicum</i> .....	83
<b>Figura 36.</b> Perfil cromatográfico dos compostos voláteis de sementes de <i>G. max</i> (A) Controlo, (B) Inoculadas com <i>B. japonicum</i> .....	87
<b>Figura 37.</b> Efeito dos extractos metanólicos de semente de <i>G. max</i> na intercepção do radical DPPH•.....	90

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Estrutura química das diferentes classes de ácidos gordos.....	17
<b>Tabela 2.</b> Ácidos fenólicos, flavonas e flavonóis em rebentos de <i>G. max</i> , <i>V. radiata</i> e <i>M. sativa</i> .....	49
<b>Tabela 3.</b> Isoflavonas em rebentos de <i>G. max</i> , <i>V. radiata</i> e <i>M. sativa</i> .....	52
<b>Tabela 4.</b> Fitosteróis em rebentos de <i>G. max</i> , <i>V. radiata</i> e <i>M. sativa</i> .....	54
<b>Tabela 5.</b> Ácidos orgânicos em rebentos de <i>G. max</i> , <i>V. radiata</i> e <i>M. sativa</i> .....	57
<b>Tabela 6.</b> Parâmetros de validação do método usado na determinação de ácidos gordos livres em rebentos de <i>G. max</i> , <i>V. radiata</i> e <i>M. sativa</i> e seu conteúdo nas amostras.....	61
<b>Tabela 7.</b> Compostos voláteis em rebentos de <i>G. max</i> , <i>V. radiata</i> e <i>M. sativa</i> .....	65
<b>Tabela 8.</b> Ácidos fenólicos em sementes de <i>G. max</i> .....	73
<b>Tabela 9.</b> Isoflavonas em sementes de <i>G. max</i> .....	76
<b>Tabela 10.</b> Fitosteróis em sementes de <i>G. max</i> .....	79
<b>Tabela 11.</b> Ácidos orgânicos em sementes de <i>G. max</i> .....	81
<b>Tabela 12.</b> Linearidade e composição em ácidos gordos da semente de <i>G. max</i> .....	85
<b>Tabela 13.</b> Compostos voláteis nas sementes de <i>G. max</i> .....	88

## **Abreviaturas**

**Abs** - Absorvância

**AChE** – Acetilcolinesterase

**ATP** – Adenosina trifosfato

**DNA** - Ácido desoxirribonucleico

**DPPH•** - Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

**DTNB** - Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico

*et al.* - e colaboradores

**g** - Grama

**GC/MS** – Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa

**HPLC/DAD** - Cromatografia líquida de alta pressão acoplada a detector de díodos

**HPLC/UV** - Cromatografia líquida de alta pressão acoplada a detector de ultravioleta

**HS-SPME** – *Headspace* - Microextração em fase sólida

**IC<sub>50</sub>** - Concentração necessária para atingir 50% de inibição

**NADH** - Nicotinamida adenina dinucleótido na forma reduzida

**NADPH** - Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato na forma reduzida

**NBT** - Azul de nitrotetrazólio

**nd** - Não detectado

**nm** - Nanómetro

**•NO** - Radical óxido nítrico

**O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>** - Radical superóxido

**PMS** – Metossulfato de fenazina

**RNS** - Espécies reactivas de azoto

**ROS** - Espécies reactivas de oxigénio

**rpm** – Rotações por minuto

**SNP** – Nitroprussiato de sódio

**UA** – Unidades Arbitrárias

**UV** - Ultravioleta

**Vis** - Visível



## I. INTRODUÇÃO

Actualmente, são inúmeros os factores que afectam a qualidade de vida das pessoas, fenómeno que induz uma consciencialização da importância dos alimentos incluídos na dieta alimentar e, conseqüentemente, a opção por alimentos que contenham, para além dos nutrientes necessários, substâncias que promovam a saúde (Morais & Cola, 2006).

Uma dieta alimentar predominantemente à base de plantas tem sido considerada, a nível mundial, como uma das mais saudáveis. Um caso paradigmático deste tipo de alimentação é a dieta mediterrânica, pobre em carne, rica em frutas frescas e legumes, pobre em açúcar, sal e em ácidos gordos saturados, uma vez que a principal fonte de gordura é o azeite, rico em gordura monoinsaturada. Estudos realizados observaram uma relação sistemática entre o bem-estar e longevidade e as características comuns da dieta dos países localizados ao redor do Mar Mediterrâneo. Outro caso é o da dieta asiática, com abundância de hidratos de carbono, pobre em gorduras saturadas e sobretudo muito rica em legumes (Duchin, 2005).

As leguminosas são uma classe de plantas muito usada na alimentação, tanto humana como animal, sendo já utilizadas como alimento 150 espécies. Estas, além de possuírem um baixo conteúdo de lípidos, representam uma boa fonte de proteína e fibra. Estas plantas possuem, ainda, numerosos compostos bioactivos na sua constituição, que podem acarretar efeitos metabólicos e fisiológicos de interesse. Alguns desses compostos possuem um papel relevante na prevenção de algumas das doenças da sociedade moderna, entre outras, diabetes, doenças cardiovasculares e cancro (Alonso *et al.*, 2010).

Para além do seu potencial em termos dietéticos e nutricionais, este tipo de plantas, tem vindo a assumir particular relevância, devido essencialmente a dois motivos: i) à fácil adaptação ao solo e a climas pouco favoráveis e ii) ao papel que representam na rotação das colheitas, por estabelecer uma relação simbiótica com diversas bactérias nodulantes, devido à sua capacidade para fixar azoto (Alonso *et al.*, 2010).

Assim sendo, revelou-se de particular interesse o estudo do metaboloma de algumas das espécies mais importantes de leguminosas, bem como o estudo do efeito da inoculação no metabolismo das mesmas. Desta forma, o presente trabalho tem início com a revisão bibliográfica organizada em quatro componentes: i) apresentação das espécies



analisadas; ii) metabolismo das plantas, onde se apresentam as classes de compostos estudadas; iii) actividade biológica; iv) inoculação de leguminosas, no caso particular a soja, e a influência que esta pode ter no metabolismo da planta. A segunda parte consiste na descrição sumária de todas as actividades realizadas e metodologias adoptadas e, por fim, na terceira parte procede-se à apresentação dos resultados e análise dos mesmos.

### 1.1. Leguminosae

A família Leguminosae, também denominada de Fabaceae, constitui uma das maiores famílias botânicas, sendo formada por uma grande variedade de plantas (trepedeiras, ervas, arbustos e árvores de pequeno porte), incluindo espécies destinadas tanto ao uso culinário, como agronómico e ornamental. Divide-se em três sub-famílias distintas, Papilionoideae, Caesalpinoideae e Mimosoideae, as quais, apesar das diferenças existentes entre as espécies que as constituem, exibem uma característica comum: os frutos são do tipo vagem (Judicibus, 2011).

A globalização das culturas e das actividades comerciais tem induzido a fusão dos sistemas alimentares e dietas por todo o mundo e, nessa medida, o aumento do consumo de leguminosas, um elemento fundamental de grande parte dos sistemas alimentares tradicionais de muitas regiões (Martins & Bento, 2007). As leguminosas contribuem para o fornecimento de proteínas e desempenham um papel fulcral na dieta de grande parte da população mundial, sobretudo quando esta é complementada com cereais. Estas plantas são, habitualmente, consumidas na forma de grãos ou sementes fisiologicamente maduras, ou germinadas sob a forma de rebentos (Machado *et al.*, 2009).

Devido ao seu conteúdo rico em nutrientes as leguminosas são uma excelente fonte de proteína, fibra, hidratos de carbono, vitaminas e minerais (tais como Ca, Fe, K, Mg e Zn), ácidos gordos essenciais, saponinas, fitosteróis, e em alguns casos isoflavonas, razão pela qual representam um alimento excepcional (Madar & Strark, 2002). A composição nutricional dos legumes torna-os alimentos ideais que permitem colmatar muitas das recomendações dietéticas. Paralelamente, alguns dos constituintes das leguminosas são agentes terapêuticos e preventivos de diversas doenças: os hidratos de carbono e fibras alimentares contribuem para um baixo índice glicémico; os

oligosacáridos prebióticos exercem um papel importante na modelação da flora microbiana do cólon humano; os minerais são importantes na redução do risco de hipertensão e as isoflavonas oferecem inúmeros benefícios para a saúde, tais como redução do risco de cancro e osteoporose. No entanto, nos países ocidentais o seu consumo continua a ser relativamente baixo (Venter & Eyssen, 2001; Madar & Stark, 2002).

O consumo promissor de leguminosas como alimentos funcionais, nomeadamente como fonte de compostos bioactivos com potencial preventivo e terapêutico, tornou o cultivo destas espécies uma mais-valia para a agricultura (Martins & Bento, 2007). Por outro lado, o facto de as leguminosas estabelecerem uma relação simbiótica com bactérias do solo, que resulta na formação de nódulos capazes de captar o azoto atmosférico no sistema radicular das plantas, amplia as vantagens das leguminosas ao nível da agricultura (Judicibus, 2011). Segundo o *Codex alimentarius* (2007) algumas das espécies de leguminosas mais importantes são a *Vigna radiata* (L.) R. Wilczek, a *Medicago sativa* L. e a *Glycine max* (L.) Merr. (Figura 1), todas pertencentes à sub-família Papilionoideae.



**Figura 1.** Rebentos de *Medicago sativa* (A), *Glycine max* (B) e *Vigna radiata* (C).

Hoje considera-se que os rebentos possuem mais compostos benéficos para a saúde do que os restantes estados de crescimento da planta. Quando incluídos na dieta, para além de representarem uma boa fonte de nutrientes básicos, possuem metabolitos secundários importantes na prevenção de doenças, contribuindo para a promoção da saúde (Randhir, *et al.*, 2004; Oh & Rajashekar, 2009).

### 1.1.1. *Vigna radiata* (L.) R. Wilczek

A *V. radiata* (Figura 1), conhecida por feijão mungo, é uma planta de cultivo anual. Apresenta uma altura variável (entre 0,3 a 1,5 m), possui um porte erecto ou semi-erecto e muitas ramificações recobertas de pêlos. Reproduz-se geralmente por autofecundação, sendo apenas 4 a 5% da fecundação cruzada. Representa o mais importante legume de crescimento curto de verão, sendo amplamente cultivado nas regiões tropicais e subtropicais (Miranda *et al.*, 1999; Anwar *et al.*, 2007). Esta leguminosa é originária da Ásia, apresenta sementes de diferentes tamanhos, formas e cores, e representa um importante ingrediente da dieta à base de cereais em diversos países, nomeadamente na Índia, Paquistão, Indonésia, Filipinas e China (Madar & Starks, 2002; Anwar *et al.*, 2007).

O feijão mungo apresenta uma constituição semelhante à de outras plantas da família das leguminosas, com uma composição média de proteína de 24%, 1% de gordura, 63% de hidratos de carbono e 16% de fibra (Madar & Starks, 2002). Diversos materiais vegetais desta leguminosa são consumidos: semente (como acompanhamento ou ingrediente de pão ou bolos) ou rebentos, utilizados na confecção de inúmeros pratos (Anwar *et al.*, 2007).

Os rebentos de feijão mungo, muito usados comercialmente como substitutos dos rebentos de soja, são um ingrediente frequente nos seus países de origem, mas o seu consumo tem vindo a aumentar no ocidente, não só pelas qualidades organolépticas, mas sobretudo pelos benefícios que traz para a saúde (Fernandez-orocho *et al.*, 2008).

Vários estudos realizados sobre a germinação de sementes de feijão mungo comprovaram mudanças significativas nos parâmetros metabólicos, tais como a diminuição do conteúdo de triglicéridos e o aumento do nível de aminoácidos livres, melhorando assim a qualidade nutricional deste, um exemplo de como a germinação das sementes traz grandes benefícios a nível da composição em metabolitos bioactivos (Jom *et al.*, 2010).

Adicionalmente, num estudo efectuado por Duh *et al.* (1999) com o extracto metanólico de feijão mungo verificou-se que este possui propriedades antioxidantes *in vitro*, inibindo a peroxidação lipídica. A oxidação de lípidos e proteínas diminuiu e o extracto

evidenciou capacidade como quelante de metais e sequestrante de radicais livres, protegendo a planta contra o stress oxidativo (Duh *et al.*, 1999).

#### 1.1.2. *Medicago sativa* L.

A *M. sativa* (Figura 1), comumente designada por alfalfa ou luzerna, é uma leguminosa forrageira perene, capaz de produzir durante vários anos, desde que sob condições edafo-climáticas e manejo adequados, cujo hábito de crescimento é geralmente erecto, podendo atingir até um metro de altura (Burkart, 1952). Esta cultura é originária da Ásia menor e do sul do Cáucaso, sendo esta a primeira espécie de forragem a ser domesticada em resultado da sua fácil adaptação a diferentes climas e tipos de solo. Actualmente esta planta é amplamente cultivada na maioria das regiões agrícolas do mundo (Rassini *et al.*, 2007).

Os rebentos da *M. sativa* são uma boa fonte de proteínas (25% do seu peso), vitaminas, aminoácidos, flavonóides e saponinas (Khaleel *et al.*, 2005). Estes rebentos estão indicados como uma das poucas espécies vegetais que contém isoflavonas na sua constituição (Murphy *et al.*, 1999).

Estudos comprovam que este legume é muito rico em compostos com acção antioxidante, como é o caso dos compostos fenólicos (Kaur & Kapoor, 2002). Num estudo efectuado por Cao *et al.* (1996) os rebentos de *M. sativa* apresentaram uma boa capacidade antioxidante contra o radical hidroxilo, sendo um dos vegetais testados com melhor actividade.

#### 1.1.3. *Glycine max* (L.) Merr.

A *G. max* (Figura 1), vulgarmente denominada de soja, é uma espécie de cultivo anual. A sua altura pode variar entre 0,75 a 1,25 m, possui a forma de arbusto e uma quantidade variável de ramificações, características que dependem da variedade cultivada e das condições de crescimento (Liu, 1997).

Evidências históricas e geográficas indicam que a soja terá surgido como um legume de consumo regular na parte oriental do norte da China, em meados do século 11 a.C. (Liu,

1997; Kim *et al.*, 2006). Segundo o SoyStats (2011), a produção mundial de soja em 2009 foi de cerca de 210,9 milhões de toneladas (Figura 2). Actualmente, o interesse comercial da soja como legume tem aumentado devido ao seu sabor doce e agradável e ao alto teor em gordura, proteína, cálcio, fósforo, ferro e vitaminas B1 e B2 (Yinbo *et al.*, 1997). Adicionalmente, é uma das leguminosas cultivadas mais importantes devido à sua riqueza em proteína e à sua gama completa de aminoácidos (Kim *et al.*, 2006).



**Figura 2.** Dados referentes à produção mundial de soja em 2009 (SoyStats, 2011).

Para além da sua constituição, é um legume muito versátil, que pode ser consumido das mais variadas formas, entre as quais se destacam as sementes e os rebentos frescos, os produtos transformados, como o tofu, miso, e tempeh, e os produtos mais industrializados, como bebidas de soja, barras energéticas ou hambúrgueres de soja (Omoni & Aluko, 2005).

Até aos dias de hoje foram já inúmeros os estudos que descreveram a soja como um legume muito benéfico para a saúde e as evidências existentes de que as populações que consomem grandes quantidades de soja apresentam menor risco de contrair doenças crónicas, tais como cancro da próstata, mama e cólon, osteoporose e doenças cardíacas, trazendo também benefícios para os níveis de colesterolemia e para a doença renal crónica (Ho *et al.*, 2002; Omoni & Aluko, 2005; Prakash *et al.*, 2007).

Tais benefícios são justificados pelo facto da soja ser uma matriz rica em compostos biologicamente activos, nomeadamente em metabolitos secundários, dos quais se destacam os compostos fenólicos, com ênfase para as isoflavonas, fitosteróis e

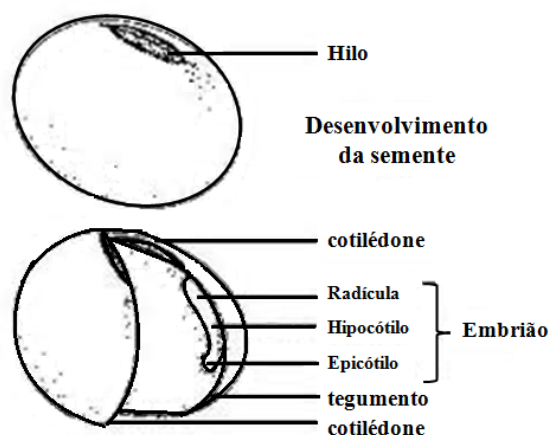
saponinas (Omoni & Aluko, 2005). Os fitosteróis actuam ao nível da redução do colesterol e os ácidos gordos apresentam efeitos cardioprotectores. Os compostos fenólicos possuem potencial anti-cancerígeno e antioxidante, com especial destaque para as isoflavonas, importantes pela actividade antiviral, antifúngica, anti-osteoporose e efeito estrogénico (Omoni & Aluko, 2005; Kim *et al.*, 2006; Prakash *et al.*, 2007).

Os antioxidantes mais importantes descritos na soja foram os ácidos 5-*O*-cafeoilquínico, cafeico, ferúlico e *p*-cumárico (Kim *et al.*, 2006). Os níveis de compostos fenólicos presentes na soja podem variar consoante o tipo de tecido, as variedades de soja e as condições de crescimento (Kim *et al.*, 2006).

A soja, enquanto leguminosa, depende da interacção com bactérias da família Rhizobiaceae para desenvolver uma simbiose que lhe permite fixar azoto atmosférico. Esta interacção constitui uma vantagem a nível agronómico e a razão pela qual, na Ásia, a soja é habitualmente cultivada em sistema de rotação com o arroz. A introdução desta espécie contribui para a fertilização dos solos ao nível nas necessidades em azoto, uma vez que a quantidade de azoto fixado não é toda consumida no cultivo da própria soja e a restante é suficiente para suprir as necessidades da cultura seguinte (Yinbo *et al.*, 1997; Brechenmacher *et al.*, 2010).

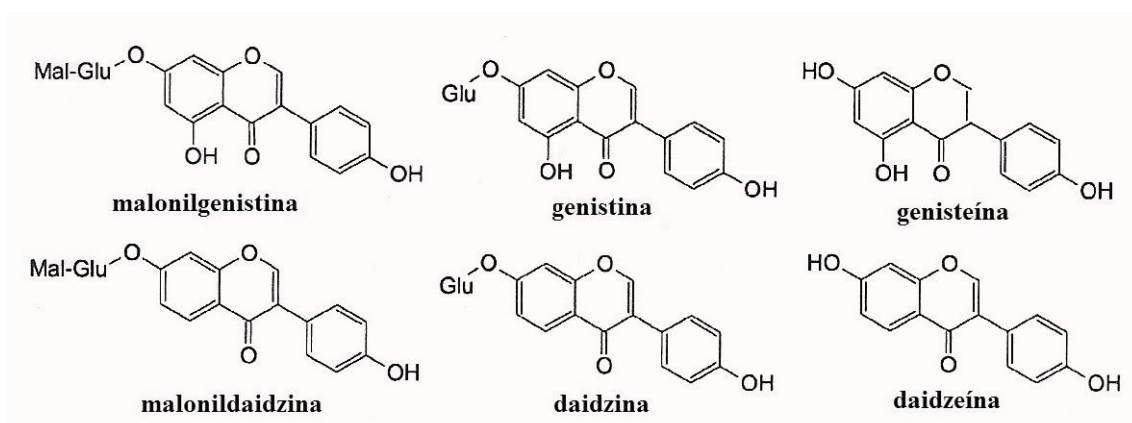
#### 1.1.3.1. Semente

As sementes de *G. max*, como a maioria das sementes de leguminosas não possuem endosperma: são essencialmente constituídas por um embrião bem desenvolvido, protegido por dois cotilédones (que funcionam como reserva de alimento) e pelo tegumento (cujo hilo varia na forma, linear ou oval), que protege o embrião de infecções fúngicas e bacterianas, antes e após o plantio (Figura 3) (Liu, 1997).



**Figura 3.** Esquema representativo dos diversos constituintes das sementes de *G. max* (Adaptado de Liu, 1997).

Estas sementes são utilizadas na alimentação devido à sua composição em isoflavonas, péptidos hidrofóbicos e ácidos gordos, constituintes cuja influência no estado fisiológico, tanto dos animais como dos humanos, é bem conhecida (Sakthivelu *et al.*, 2008). As isoflavonas surgem principalmente na sua forma malonil glicosilada, ocorrendo também baixos níveis de derivados acetil glicosilados e de compostos livres (agliconas) (Sakthivelu *et al.*, 2008). A isoflavona mais abundante nas sementes de soja é a malonilgenistina, seguida de, por ordem decrescente, malonildaidzina, genistina, daidzina, genisteína e daidzeína (Figura 4) (Ho *et al.*, 2002).



**Figura 4.** Estruturas químicas das principais isoflavonas existentes nas sementes de soja. Mal, malonato; Glu, glucose.

#### 1.1.4. Germinação e consumo de rebentos

A germinação tem início quando a semente seca começa a absorver água e termina quando o alongamento dos eixos do embrião está completo. Este processo é económico e conduz à síntese e quebra de macromoléculas e ao aumento da digestibilidade e do valor nutricional dos rebentos (Randhir, *et al.*, 2004; Fernandez-orozco *et al.*, 2008; Cevallos-casals, *et al.*, 2010). Por possuírem alto teor de proteínas e nutrientes essenciais na forma mobilizada, os rebentos são facilmente utilizados pelo organismo (Randhir, *et al.*, 2004).

As reconhecidas vantagens da germinação, bem como os comprovados benefícios associados ao consumo de rebentos de soja na prevenção de doenças, estiveram na génese do aumento da sua oferta e consumo na Europa. Nos países asiáticos, cuja população consome habitualmente grandes quantidades de rebentos desta semente, a prevalência de cancro é baixa. Actualmente os rebentos mais consumidos são os de feijão azuki (*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi & H. Ohashi), alfalfa, brócolos (*Brassica oleracea* var. *italica* Plenck), feijão mungo e de soja (Martón *et al.*, 2010).

A produção de rebentos de soja apresenta outras vantagens: independentemente do local ou da estação do ano em que se produzem, podem ser facilmente cultivados em pouco tempo e a baixo preço, dado que são consumidos com 5 a 7 dias de crescimento (Dhakal *et al.*, 2009).

#### 1.2. Metaboloma

Os organismos vivos apresentam características bastante distintas entre si; no entanto, as vias metabólicas que modificam e sintetizam metabolitos são, com pequenas variações, comuns a todos. Estes processos, correspondentes ao metabolismo primário, representam a unidade fundamental de toda a matéria viva. Os metabolitos primários, como os lípidos, nucleótidos, aminoácidos e ácidos orgânicos, encontrados nas plantas desempenham funções metabólicas essenciais (Croteau *et al.*, 2000; Dewick, 2002).

Para além das vias metabólicas primárias, que sintetizam e degradam compostos encontrados em todos os organismos, as plantas produzem uma vasta e diversificada gama de compostos orgânicos, que na sua grande maioria não participam directamente



no seu crescimento e desenvolvimento (Dewick, 2002): os denominados metabolitos secundários, apenas distribuídos por grupos taxonómicos limitados dentro do reino vegetal (Croteau *et al.*, 2000).

Contudo, importa, sublinhar que estes compostos não são produzidos em todas as condições, e que muitas das suas funções ainda são desconhecidas, razão pela qual esta área é de interesse exponencial para a investigação científica. No entanto, todos os metabolitos têm um papel vital no bem-estar do organismo e algumas das funções são já bem conhecidas, nomeadamente a protecção contra predadores (compostos tóxicos), a atracção de indivíduos da mesma espécie (compostos voláteis) e a atracção e/ou alerta de outras espécies (compostos corantes) (Dewick *et al.*, 2002).

O reconhecimento das propriedades biológicas destes compostos tem contribuído para o aumento do interesse da indústria pelos produtos naturais farmacologicamente activos, sobretudo na formulação de novos medicamentos, antibióticos, insecticidas e herbicidas. Este interesse tem-se vindo a estender também pelas mais variadas indústrias, mais especificamente para produção de corantes, polímeros, fibras, colas, óleos, ceras, aromatizantes e perfumes (Croteau *et al.*, 2000).

### 1.2.1. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são metabolitos secundários abundantes e amplamente distribuídos nas plantas. Definem-se como substâncias químicas que possuem um anel aromático, com um ou mais grupos hidroxilo, contendo derivados funcionais. Dentro destes encontram-se, entre outros, os i) ácidos fenólicos, subdivididos em derivados do ácido benzóico (que incluem os ácidos vanílico, gálico e outras formas derivadas) e derivados do ácido cinâmico (que contém, entre outros, os ácidos *p*-cumárico, *trans*-cinâmico, cafeico, ferúlico, sinápico e suas formas conjugadas, éster ou glicosídeo), ii) os flavonóides, que englobam, entre outros, flavanóis, antocianidinas, flavonóis, isoflavonas, flavonas e os seus glicosídeos, e iii) os taninos (Figura 5) (Ho *et al.*, 1992; Shi *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2006).



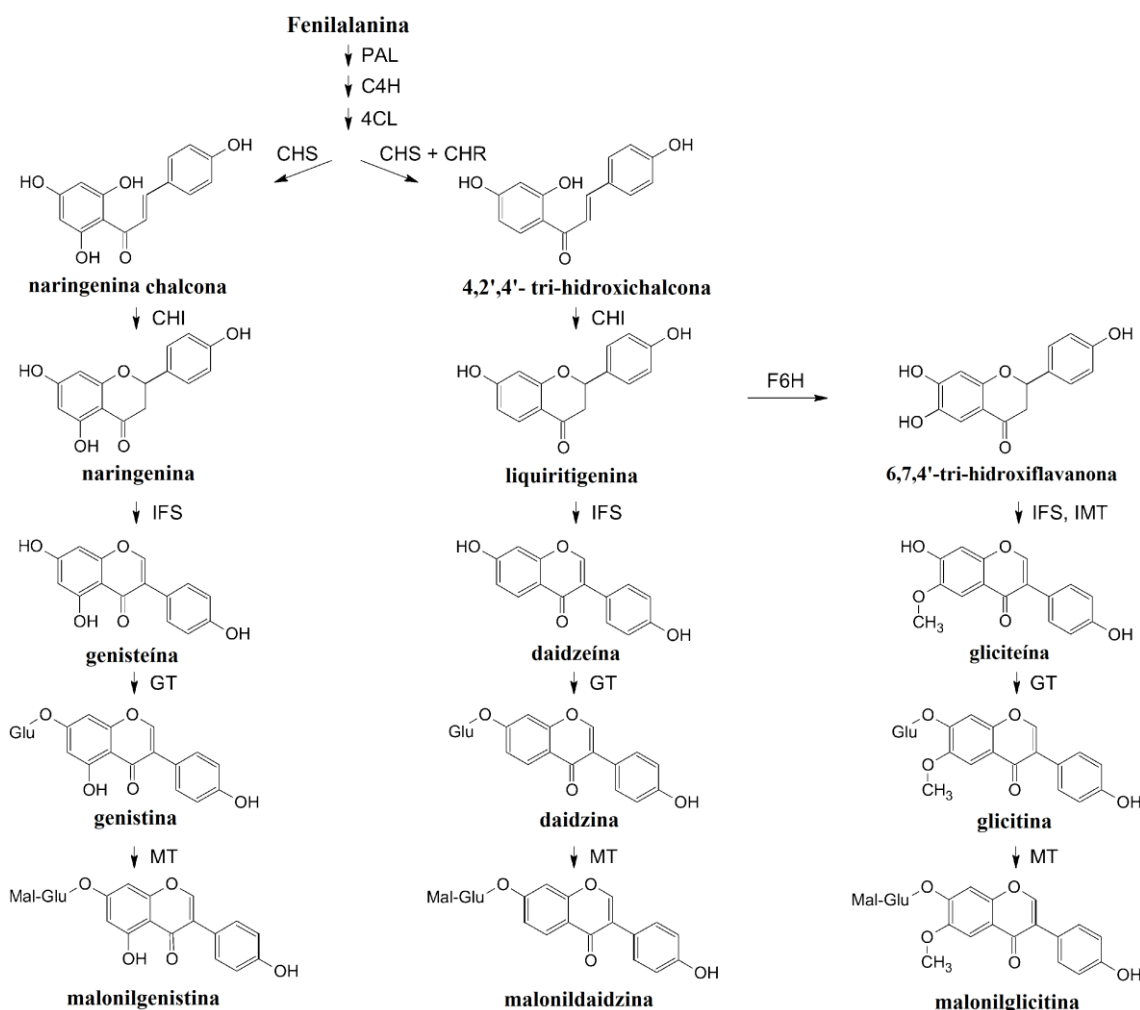
A actividade antioxidante destes compostos é devida à sua capacidade para interceptar radicais livres, doando átomos de hidrogénio ou electrões, ao seu potencial quelante de cationes metálicos, à inibição de enzimas envolvidas em reacções de produção de espécies reactivas e ao envolvimento na sinalização celular. A sua estrutura química é um factor chave para a sua capacidade de intercepção de radicais livres e de quelatação de metais, dado que dependem da quantidade e da posição dos grupos hidroxilo fenólicos. É conhecida a sua acção ao nível da inibição da auto-oxidação dos lípidos e a sua capacidade para retardar a oxidação lipídica através da inibição da actividade da lipoxigenase. Assim sendo, estes compostos têm um efeito redutor do risco de aterosclerose e de doenças cardiovasculares, ambas causadas pela oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL). Outros estudos revelam que, devido aos seus efeitos inibitórios da mutagénese e carcinogénese, estes compostos apresentam potencial preventivo contra algumas formas de cancro (Balasundram, *et al.*, 2006; Ho *et al.*, 1992; Malencic *et al.*, 2007).

#### 1.2.1.1. Isoflavonas

As isoflavonas (Figura 4) são uma classe de flavonóides; porém, por terem propriedades distintas e por serem uma classe de compostos quase específica de leguminosas, considerou-se relevante abordá-las separadamente. Estes compostos, abundantes nas espécies de Fabaceae, constituem um grupo distinto de produtos naturais que derivam da via mista chiquimato e acetato (Figura 6). São amplamente utilizadas na alimentação humana e animal, devido ao facto de apresentarem diversas actividades biológicas e desempenham um papel fundamental nas interacções entre as plantas e o ambiente. A quantidade de isoflavonas varia consoante a espécie e as diferentes partes que constituem a planta, sendo as sementes e as folhas os locais de acumulação destes compostos (Dhaubhadel *et al.*, 2003; Klejdus *et al.*, 2005).

As isoflavonas apresentam-se sob quatro formas (Figura 6): livres (daidzeína, genisteína e gliciteína), glicosiladas (daidzina, genistina, glicitina), malonil glicosiladas (malonildaizina, malonilgenistina e malonilglicitina) e acetil glicosiladas (acetildaizina, acetilgenistina e acetilglicitina). A forma livre, também denominada de aglicona, é a biologicamente mais activa no organismo humano (Shi *et al.*, 2010). As

isoflavonas glicosiladas são hidrolisadas no intestino, sendo as agliconas posteriormente metabolizadas e excretadas (Devi *et al.*, 2009).



**Figura 6.** Biossíntese de isoflavonas nas sementes de soja. 4CL, 4-cumarato-CoA-ligase; C4H, cinamato-4-hidroxilase; CHI, chalcona isomerase; CHR, chalcona redutase; CHS, chalcona sintetase; F6H, flavanona-6-hidroxilase; GT, glucosil-transferase; IFS, 2-hidroxi-isoflavona sintetase; IMT, isoflavona metiltransferase; PAL, fenilalanina amônia liase; Mal, malonato; Glu, glucose (Dhaubhadel *et al.*, 2003).

Em resposta a infecções as plantas da espécie *G. max* produzem isoflavonas que inibem o crescimento de microrganismos patogênicos. Estes compostos podem actuar como indutores da nodulação por *Rhizobium* spp. nas etapas iniciais da simbiose entre as raízes da planta e as bactérias do solo. Estudos mostraram que as raízes de soja segregam isoflavonas para a rizosfera e permitiram inferir que nas células da raiz operam sistemas de transporte para a distribuição intercelular destes compostos (Dhaubhadel *et al.*, 2003).

Nos últimos anos foram realizados diversos estudos sobre os efeitos medicinais destes compostos. Um dos benefícios identificados resulta da sua interacção com os receptores do 17- $\beta$ -estradiol, interferindo com a acção deste, por possuírem estrutura semelhante ao estrogénio, razão pela qual são denominadas de fitoestrogénios (Maskarinec, 2003). A competência das isoflavonas na prevenção da osteoporose em mulheres pós-menopausa resulta da mimetização do estrogénio, permitindo manter o equilíbrio hormonal. Este equilíbrio é de extrema importância, uma vez que nesta fase do ciclo reprodutivo da mulher a deficiência de hormonas, nomeadamente de estrogénio, provoca um aumento da taxa de remodelação óssea que causa desequilíbrio entre a reabsorção e formação de osso, acelerando a perda óssea que leva à osteoporose (Omoni & Aluko, 2005; Devi *et al.*, 2009).

As isoflavonas também exercem acção antioxidante, especialmente por intercepção de radicais livres, tendo, por essa razão, um efeito protector contra o stress oxidativo. Entre estas, as formas livres são as mais interessantes, seguidas das malonil glicosiladas que revelaram maior poder antioxidante do que as formas glicosiladas (Sakthivelu *et al.*, 2008).

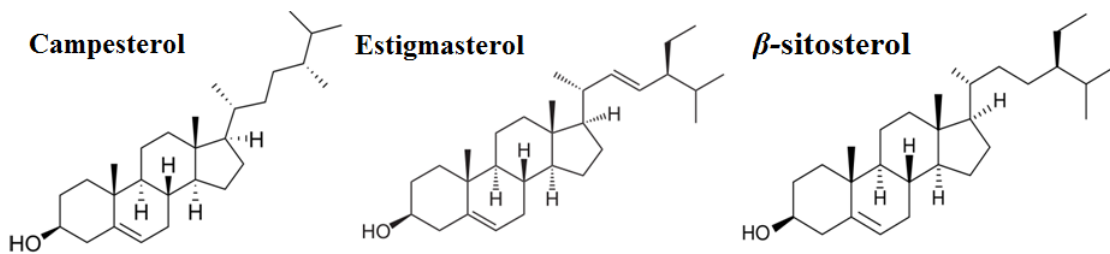
Outro dos benefícios deste tipo de compostos é o seu efeito protector contra doenças cardiovasculares, uma das principais causas de morte a nível mundial. Vários foram já os estudos que associaram as isoflavonas à diminuição dos teores de colesterol associado às LDL no organismo, resultante do consumo de soja (Omoni & Aluko, 2005). Ao nível do tracto intestinal as isoflavonas e as proteínas de soja alteram o metabolismo do colesterol hepático, reforçando a produção de ácidos biliares e colesterol e aumentando a actividade dos receptores de colesterol LDL. O acréscimo da actividade destes receptores, por sua vez, leva ao aumento da excreção do colesterol, diminuindo deste modo os seus níveis no sangue. Adicionalmente, a acção antioxidante destes compostos diminui a susceptibilidade do colesterol LDL à oxidação (Fukui *et al.*, 2002; Omoni & Aluko, 2005).

As isoflavonas também apresentam um efeito preventivo em vários tipos de cancro, principalmente da mama, próstata e cólon, devido ao seu potencial antioxidante que diminui os níveis de peroxidação lipídica e de danos oxidativos no DNA, ambos factores de risco para a carcinogénese (Kaufman *et al.*, 1997; Omoni & Aluko, 2005).

### 1.2.2. Fitosteróis

Os fitosteróis são constituintes essenciais das membranas de todos os organismos eucariotas, com funções ao nível do controlo da fluidez, da adaptação à temperatura e da permeabilidade da membrana, o mesmo é dizer que possuem um papel importante na diferenciação e proliferação celular. Alguns destes compostos exercem, ainda, funções específicas na transdução de sinal e como precursores de um grupo de factores de crescimento da planta (Pirronen *et al.*, 2000).

Nas plantas já foram referenciados mais de 100 tipos de fitosteróis, sendo os mais abundantes, e comumente encontrados, o  $\beta$ -sitosterol, o estigmasterol e o campesterol (Figura 7) (Jong *et al.*, 2003; Fernandes & Cabral, 2007).



**Figura 7.** Estruturas químicas de alguns dos fitosteróis mais representativos nas plantas.

Estes compostos são sintetizados nas plantas pela via dos isoprenóides. O ser humano obtém-nos da dieta, que habitualmente contém cerca de 200 a 300 mg de fitosteróis por dia (Pirronen *et al.*, 2000; Jong *et al.*, 2003).

Os fitosteróis são idênticos ao colesterol, tanto a nível estrutural como da função que exercem na membrana celular. Devido a esta semelhança a presença de fitosteróis na dieta potencia a redução dos níveis de colesterol, por via da redução da absorção intestinal e do colesterol biliar (Fernandes & Cabral, 2007; Shi *et al.*, 2010).

A soja está referenciada como sendo rica em fitosteróis, uma vez que as suas sementes configuram um reservatório destes compostos para o crescimento de novas células e de rebentos; contudo, a produção de fitosteróis vai reduzindo gradualmente desde que ocorre a germinação até ao final do processo germinativo (Pirronen *et al.*, 2000; Jong *et al.*, 2003). Outra boa fonte destes compostos são os resíduos da indústria alimentar, sobretudo as cascas e sementes, o que confere um valor acrescentado a estes materiais,

habitualmente descartados da parte comestível (Pirronen *et al.*, 2000; Fernandes & Cabral, 2007).

Os fitosteróis apresentam variadas aplicações industriais: na indústria farmacêutica, na produção de esteróides terapêuticos; na indústria cosmética, na produção de cremes e batons; na indústria alimentar, na qual se utilizam como aditivos de alimentos funcionais pelas suas propriedades de redução dos níveis de colesterol e anti-cancerígenas (Fernandes & Cabral, 2007; Shi *et al.*, 2010). A incorporação de fitosteróis em formulações tem-se revelado bastante vantajosa, pois constituem um bom veículo de transporte de alimentos, fármacos ou nutracêuticos, por serem facilmente absorvidos pelos sais biliares e pelas micelas do intestino (Fernandes & Cabral, 2007).

O interesse pelo desenvolvimento de novos alimentos funcionais tem aumentado, particularmente nos produtos em que os fitosteróis podem substituir o colesterol sérico. Com esta alteração é possível reduzir drasticamente a mortalidade por doenças cardiovasculares, revelando ser uma opção economicamente vantajosa no tratamento dietético da hipercolesterolemia (Pirronen *et al.*, 2000).

### 1.2.3. Ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos são abundantes nas plantas e, atendendo a que o seu conteúdo total é nestes organismos maior do que noutros, configuram uma característica marcante destas. A elevada acumulação de ácidos orgânicos nos tecidos vegetais é, provavelmente, devida ao seu importante papel como intermediários na fotossíntese (López-Bucio *et al.*, 2000). No entanto, a composição em ácidos orgânicos varia em função da espécie, idade da planta e do tipo de tecido. O metabolismo dos ácidos orgânicos é fundamental tanto ao nível da planta, como na sua adaptação ao meio ambiente. Estes compostos desempenham funções a nível da capacidade da planta para lidar com as deficiências em nutrientes, tolerância a metais e nas interações simbióticas planta-bactéria na interface raiz-solo. Ao nível celular estes compostos também intervêm em várias vias biossintéticas, na produção de energia e na formação de precursores para a biossíntese de aminoácidos (López-Bucio *et al.*, 2000).

Estes compostos são produzidos principalmente na mitocôndria através do ciclo de Krebs. Porém, devido à natureza catalítica deste, na mitocôndria os ácidos orgânicos

apenas estão presentes em pequenas quantidades, sendo preferencialmente armazenados nos vacúolos (Rees, 1990).

Vários estudos demonstraram a capacidade antioxidante destes compostos naturais, estando estes hoje directamente relacionados com o tratamento de doenças neurológicas, entre outras a doença de Alzheimer e a demência senil (Valentão *et al.*, 2005; Oliveira, *et al.* 2009a). A título de exemplo, o ácido cítrico demonstrou um potencial antioxidante devido à sua acção como quelante de metais (Assimopoulou *et al.*, 2005).

#### 1.2.4. Ácidos gordos

Os ácidos gordos são constituídos por uma cadeia hidrocarbonada, saturada ou não, com um grupo metilo numa das extremidades e um grupo carboxilo na outra. De acordo com a sua estrutura química subdividem-se em três categorias (Tabela 1): saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) e polinsaturados (PUFA). Os MUFA contêm uma ligação dupla e os PUFA apresentam duas ou mais ligações duplas, geralmente na configuração *cis* (Tabela 1) (Dubois *et al.*, 2007).

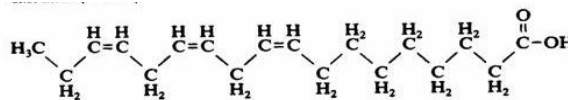
**Tabela 1.** Estrutura química das diferentes classes de ácidos gordos.

Ácidos Gordos	Estrutura
<b>Saturados</b>	
Ácido esteárico (C18:0)	
Ácido palmítico (C16:0)	
<b>Monoinsaturados</b>	
Ácido oleico (C18:1c)	
<b>Polinsaturados</b>	
Ácido linoleico (C18:2)	



---

### Ácido linolénico (C18:3)



---

Nas plantas, os ácidos gordos são sintetizados pela via acetato, através da carboxilação de acetil-CoA em malonil-CoA. Após a formação de malonil-CoA o processo é catalisado pela ácido gordo sintetase (FAS), formando-se os SFA, que podem conter 4 a 30 átomos de carbono, sendo os mais comuns os ácidos C<sub>16</sub> e C<sub>18</sub> (Dewick, 2002). Os ácidos gordos insaturados são formados a partir dos SFA por desidrogenação enzimática (Millar *et al.*, 2000).

Este tipo de compostos exerce um conjunto diversificado de funções na planta, sendo as mais relevantes o armazenamento de energia, a cooperação no processo de defesa contra stress biológico e ambiental e a acção como moléculas sinalizadoras, além de integrarem as membranas celulares (Ohlrogge, 1997).

Desde o início da década de 80 que na maioria dos países desenvolvidos existem orientações dietéticas para reduzir o consumo de gorduras totais e de SFA, com o intuito de minimizar a prevalência da doença arterial coronária. Tendo em conta que as gorduras totais e os SFA só são utilizados para fornecer energia ao organismo, a ingestão deste tipo de compostos não deve ser superior a 10% da dieta diária. Importa recordar que os SFA, principalmente os ácidos láurico (C<sub>12:0</sub>) e mirístico (C<sub>14:0</sub>), são responsáveis pelo aumento da concentração de colesterol total e das concentrações de colesterol LDL (Williams, 2000; Dubois *et al.*, 2007). Apesar da maioria dos estudos demonstrar um efeito relativamente neutro do ácido palmítico, existem evidências de que, quando a quantidade de colesterol ingerida diariamente é superior a 400 mg, este ácido induz um incremento do colesterol superior ao causado pelo ácido mirístico (Dubois *et al.*, 2007).

A posição dos átomos de hidrogénio em torno da ligação dupla é que determina a configuração geométrica dos MUFA, isto é, se é o isómero *cis* ou *trans* (Kris-Etherton, 1999). Em relação ao efeito nos níveis de colesterol, os MUFA de configuração *cis* são considerados neutros, razão pela qual, nos últimos anos, uma das formas encontradas para contornar os problemas resultantes do consumo de SFA consiste na sua substituição por MUFA. Vários estudos sugerem que esta substituição acarreta

vantagens na diminuição do risco de doenças cardiovasculares e da diabetes (Ros, 2003).

Embora o organismo humano tenha capacidade para metabolizar derivados de cadeia mais longa, é incapaz de sintetizar PUFA, razão pela qual a dieta alimentar deve cobrir as necessidades do organismo para estes ácidos gordos, considerados essenciais, por suportarem o sistema cardiovascular, reprodutivo, imunitário e nervoso (Dubois *et al.*, 2007; Dhakal *et al.*, 2009). O nosso organismo necessita destes compostos para a produção e reparação das membranas celulares, de forma a garantir uma óptima nutrição das células e a excreção dos resíduos tóxicos. Estes ácidos gordos têm também um papel fulcral na produção de prostaglandinas, que regulam as funções corporais da frequência cardíaca, pressão arterial, coagulação sanguínea, fertilidade e concepção, sendo ainda importantes na função imunológica, participando na luta contra a infecção por via da regulação da inflamação (Dhakal *et al.*, 2009).

Actualmente existe um interesse crescente pelos efeitos benéficos dos PUFA, sobretudo pelas duas principais famílias que integram este grupo de ácidos gordos essenciais (Ómega-3 e Ómega-6) (Williams, 2000; Dubois *et al.*, 2007). Para o Homem os ácidos linoleico (Ómega-6) e  $\alpha$ -linolénico (Ómega-3) são necessários para manter as membranas celulares, as funções cerebrais e a transmissão de impulsos nervosos em condições normais. Adicionalmente, estes ácidos gordos participam na transferência de oxigénio atmosférico para o plasma sanguíneo, na síntese de hemoglobina e na divisão celular (Martin *et al.*, 2006).

Os Ómega-3 são conhecidos como essenciais no desenvolvimento infantil, auxiliando na protecção contra doenças cardíacas, trombose, hipertensão, desordens inflamatórias e doença auto-imune (Dhakal *et al.*, 2009). Estes compostos geram derivados anti-inflamatórios, anti-trombóticos, anti-hipertensores e anti-arrítmicos. Em contrapartida, os Ómega-6 geram metabolitos inflamatórios, trombóticos, hipertensores e indutores de arritmia, sendo, por isso, importante manter o equilíbrio nutricional de forma a proporcionar uma boa razão Ómega-6/Ómega-3 (Dubois *et al.*, 2007). O desequilíbrio desta razão pode contribuir para um estado pró-trombótico e pró-inflamatório e, nessa medida, para um maior risco de doença arterial coronária. Além disso, das doenças crónicas justificadas pela ausência de ácidos Ómega-3 constam, ainda, desordens imunológicas, depressão e disfunção neurológica (Williams, 2000).

### 1.2.5. Compostos voláteis

Os compostos voláteis são produtos resultantes do metabolismo primário e secundário das plantas emitidos para a atmosfera, sendo as florestas, nomeadamente a amazónica, a sua maior fonte (Goff & Klee, 2006; Maffei, 2010). Até aos nossos dias já foram descritos mais de 1700 compostos voláteis, a partir de 90 famílias de plantas, os quais constituem cerca de 1% dos metabolitos secundários de plantas conhecidos (Maffei, 2010). Estes compostos são os responsáveis pelo aroma dos alimentos e bebidas, tendo sido já identificados mais de 7000 aromas diferentes (Dudareva *et al.*, 2006; Goff & Klee, 2006).

Estes compostos caracterizam-se por ter um baixo peso molecular (< 300 Da) e subdividem-se em três classes principais: i) os terpenóides – também designados por isoprenóides, onde se incluem os hemiterpenos, monoterpenos, diterpenos e sesquiterpenos; ii) os fenilpropanóides; iii) os derivados de ácidos gordos (Dudareva *et al.*, 2006). No entanto, também podem pertencer a outras classes como alcanos, alcenos, álcoois, ésteres, aldeídos e cetonas (Dudareva *et al.*, 2006; Maffei, 2010). A origem biosintética deste tipo de compostos varia consoante a classe a que pertencem, sendo que as diversas alterações enzimáticas aumentam a variedade destes compostos (Dudareva *et al.*, 2006).

Grande parte destes compostos é, na sua maioria e diversidade, emitida pelas flores; no entanto, outros tecidos vegetativos da planta, como folhas, frutos e raízes, também são fontes emissoras destes compostos para a atmosfera e para solo (Dudareva *et al.*, 2004). Todavia, factores ambientais, como a luz, a temperatura e a humidade, podem influenciar bastante a emissão de voláteis, o rendimento e a composição dos óleos essenciais (Staudt e Bertin, 1998; Gershenzon *et al.*, 2000).

Os compostos voláteis têm um papel essencial nas plantas: i) na reprodução, atraindo polinizadores de forma a garantir o sucesso da mesma; ii) na defesa contra factores abióticos, através da sua acção antioxidante, protegendo a planta contra o stress oxidativo induzido pelo ozono; iii) na defesa contra factores bióticos, afectando directa e fisiologicamente os herbívoros, repelindo-os devido à sua toxicidade; iv) na defesa subterrânea da planta, actuando como agente antimicrobiano, anti-herbívoro ou atraindo inimigos naturais do agente patogénico e, ainda, pela possibilidade de transporte de informação para plantas vizinhas ou partes distantes de uma mesma planta (Dudareva *et*

*al.*, 2006; Maffie, 2010). Porém, tanto a síntese como a libertação destes compostos implicam um grande investimento de energia e de outros recursos, sendo necessário efectuar um balanço dos benefícios que esse investimento possa acarretar para a planta (Maffie, 2010).

Apesar de serem fonte de prazer olfactivo para os seres humanos e, nessa medida, amplamente usados como aromatizantes, conservantes e em aromaterapia, estes compostos podem ser prejudiciais, tanto para a saúde humana, como para o ambiente, uma vez que o seu tempo de vida varia de minutos a horas, são extremamente reactivos na troposfera e contribuem para o aumento do aerossol que propaga a luz para produzir o azul do céu. Adicionalmente, podem ser precursores de compostos tóxicos (Maffei, 2010).

### 1.3. Actividade biológica

#### 1.3.1 Stress oxidativo

O oxigénio é essencial para a vida mas, contrariamente ao que se possa pensar, como subproduto do seu metabolismo produzem-se espécies reactivas de oxigénio (ROS) altamente tóxicas para as células (Andersen, 2004). Estas podem levar a um estado de stress oxidativo, com dano celular, sempre que a sua formação excede a capacidade antioxidante das células (Berra *et al.*, 2006). As principais ROS distribuem-se em dois grupos: radicalares (como os radicais hidroxilo, superóxido, peróxido) e não-radicalares (oxigénio singleto, ozono, peróxido de hidrogénio e ácido hipocloroso, entre outras). Existem também espécies reactivas de azoto (RNS) que, tal como as ROS, resultam do metabolismo normal do organismo e são substâncias pró-oxidantes (Barreiros *et al.*, 2006). Entre as RNS incluem-se o óxido nítrico, trióxido de diazoto, ácido nitroso, nitrito, nitrato e peroxinitrito (Barreiros *et al.*, 2006). O stress oxidativo é, ainda, induzido por um vasto grupo de factores ambientais, tais como radiações UV ou infecções provocadas por organismos patogénicos (Blokhina *et al.*, 2003).

A maioria dos componentes celulares são susceptíveis ao dano causado pelos radicais livres, principalmente nos lípidos (com peroxidação dos ácidos gordos insaturados das membranas celulares), nas proteínas (por desnaturação), nos hidratos de carbono e nos

ácidos nucleicos (através da inactivação das enzimas de reparação do DNA) (Aruoma, 1998; Blokhina *et al.*, 2003).

#### 1.3.1.1 Radicais livres

Designam-se radicais livres as moléculas ou átomos que possuem um ou mais electrões desemparelhados e isolados numa orbital. Esta configuração torna estas espécies altamente instáveis, com uma meia-vida curtíssima e quimicamente muito reactivas. O hidrogénio contém um protão e um único electrão desemparelhado, o que permite classificá-lo como radical livre, muitas vezes indicado pela inserção do ponto radical ( $\bullet$ ) para anunciar que possui um ou mais electrões desemparelhados (Aruoma, 1998).

Os radicais livres mais tóxicos para os seres vivos incluem o radical hidroxilo ( $\bullet\text{OH}$ ), o superóxido ( $\text{O}_2\bullet^-$ ), óxido nítrico ( $\bullet\text{NO}$ ), e peróxido ( $\text{RO}_2\bullet$ ). O peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), ácido hipocloroso ( $\text{HClO}$ ), o ozono ( $\text{O}_3$ ) e o próprio oxigénio ( $\text{O}_2$ ), embora não sejam radicais livres, são facilmente oxidados, reagindo na forma de radicais livres no organismo (Arouma, 1998).

Os radicais livres são produzidos pelo nosso organismo, podendo ser formados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana celular. No entanto, uns podem ser altamente reactivos danificando lípidos, proteínas e o DNA, e outros ser reactivos apenas com os lípidos. Para além destes, existem ainda compostos pouco reactivos, mas potenciadores de reacções que podem gerar espécies prejudiciais (Bianchi & Antunes, 1999; Barreiros *et al.*, 2006).

Os radicais livres também podem ser produzidos por processos exógenos, via agentes ambientais que podem gerar directa ou indirectamente espécies reactivas nas células. A indução de stress oxidativo e dano celular já foi observada após a exposição a diversos xenobióticos, tais como metais, compostos clorados, radiação ionizante, entre outros (Valko *et al.*, 2006). Estes radicais são capazes de oxidar biomoléculas, provocando alterações mutagénicas, nomeadamente danos nos tecidos e morte celular, pelo que desempenham um papel patológico significativo no cancro, enfisema, cirrose, aterosclerose e várias outras doenças degenerativas (Prakash *et al.*, 2007).

### 1.3.1.2 Actividade antioxidante

A produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos conduziu ao desenvolvimento de muitos mecanismos de defesa antioxidante para limitar os seus níveis intracelulares e impedir a indução de danos (Bianchi & Antunes, 1999). Numa definição mais ampla, entende-se que um composto antioxidante é “qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada à do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de forma eficaz” (Barreiros *et al.*, 2006).

Toda a célula possui um sistema de defesa para se proteger do stress oxidativo, que pode actuar de diferentes formas: i) promovendo a destoxificação do agente oxidante que causa a lesão, como é o caso da glutathione (GSH), superóxido dismutase (SOD) e catalase; ii) como reparador das lesões causadas, caso de proteases e lipases, entre outros (Ferreira & Matsubara, 1997). A capacidade antioxidante das células pode ser bastante diversificada e variar entre organismos, tipo de célula ou mesmo entre células do mesmo tecido (Berra *et al.*, 2006).

Além dos antioxidantes próprios, o organismo utiliza outros provenientes da dieta, como o  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), o  $\beta$ -caroteno (pró-vitamina A), o ácido ascórbico (vitamina C) e os compostos fenólicos. Entre os aspectos preventivos conhecidos, é interessante realçar a correlação existente entre actividade antioxidante de substâncias polares e a capacidade de inibir, ou retardar, o aparecimento de células cancerígenas, para além de retardar o envelhecimento das células em geral (Barreiros *et al.*, 2006). Actualmente sabe-se que o consumo de alimentos contendo quantidades significativas de compostos antioxidantes pode auxiliar o organismo a reduzir o dano oxidativo relacionado com a idade e doenças como a aterosclerose, o cancro e a cirrose (Devi *et al.*, 2009). Outro factor de interesse ligado aos antioxidantes é a sua aplicação em diversos tipos de indústria, nomeadamente na produção de cosméticos, medicamentos e alimentos, prevenindo a decomposição oxidativa dos mesmos pela acção da luz, temperatura e humidade (Barreiros *et al.*, 2006).

Os compostos fenólicos são obtidos através da ingestão de alimentos e aqueles que têm maior interesse ao nível das propriedades antioxidantes, devido à sua estrutura lipofílica e hidrofílica e à sua localização na interface água-lípido da membrana, permitindo a captação dos radicais livres tanto no interior, como no exterior da célula (Fernandez-Orozco *et al.*, 2008).

Actualmente, o uso de compostos antioxidantes sintéticos tem suscitado algumas preocupações por não se conhecerem quais os seus efeitos a longo prazo, razão pela qual o interesse na utilização de antioxidantes de origem natural na inibição ou protecção contra o dano oxidativo tem crescido (Devi *et al.*, 2009).

Existem vários métodos de avaliação da actividade antioxidante de um composto ou extracto, tais como os ensaios de intercepção dos radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH•) (Molyneux, 2004), óxido nítrico, superóxido (Tarpey & Fridovich, 2001), peróxido e ensaios enzimáticos e não-enzimáticos de avaliação da inibição da peroxidação lipídica (Fernandez-orojco *et al.*, 2008). Nesta tese serão referidos aqueles que foram executados.

#### 1.3.1.2.1 Ensaio da actividade sequestrante do radical DPPH•

Este é um dos métodos mais utilizados na avaliação da actividade anti-radicalar e consiste na redução do radical DPPH•, o qual é estável, de coloração violeta, com um máximo de absorção a 515 nm. Quando em contacto com uma substância com capacidade para lhe doar um átomo de hidrogénio o DPPH• é reduzido, verificando-se uma diminuição da absorção naquele comprimento de onda. Actualmente este método é utilizado em vários estudos de avaliação de compostos ou extractos, para previsão da sua actividade anti-radicalar, apesar de ser um radical que não é formado no organismo (Molyneux, 2004).

#### 1.3.1.2.2. Ensaio da actividade sequestrante do radical superóxido

O radical superóxido pode ser gerado num sistema não enzimático: o metossulfato de fenazina (PMS) reduzido pelo NADH reage com o oxigénio, formando o radical superóxido. Este é capaz de doar um electrão ao azul de nitrotetrazólio (NBT), reduzindo-o a formazano, que apresenta um máximo de absorção a 560 nm. O potencial antioxidante de compostos ou extractos é avaliado através da capacidade para competir com o NBT pelo radical superóxido gerado (Oliveira *et al.*, 2009b).

#### 1.3.1.2.3. Ensaio da actividade sequestrante do radical óxido nítrico

Em solução aquosa e a pH fisiológico, o nitroprussiato de sódio (SNP) gera espontaneamente o radical •NO. Quando este reage com o oxigénio origina nitrito, que pode ser medido espectrofotometricamente após reacção com o reagente de Griess, por formação de um cromóforo que apresenta um máximo de absorção a 560 nm. O potencial antioxidante de compostos ou extractos é avaliado através da capacidade para competir com o oxigénio, reduzindo a formação de nitrito (Tarpey & Fridovich, 2001).

#### 1.3.2. Inibição da actividade da acetilcolinesterase

A acetilcolina é um neurotransmissor fundamental ao funcionamento do sistema nervoso. A perda gradual deste neurotransmissor está associada a uma deterioração cognitiva progressiva, bem como das funções neuromusculares e, por conseguinte, à diminuição da autonomia dos indivíduos (Soreq & Seidman, 2001). Entre as doenças caracterizadas pela deterioração cognitiva, a doença de Alzheimer está associada a défices de diversos neurotransmissores cerebrais, como a acetilcolina, a noradrenalina e a serotonina. O tratamento sintomático desta doença envolve primariamente a restauração da função colinérgica, pelo que se considera que a elevação do nível de acetilcolina poderá ser útil (Trevisan & Macedo, 2003).

A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima que regula a concentração de neurotransmissores na fenda sináptica, constituindo a sua principal função hidrolisar e inactivar a acetilcolina das sinapses colinérgicas (Soreq & Seidman, 2001; Colletier *et al.*, 2006). Até à presente data, a utilização de inibidores da AChE é o tratamento clínico mais eficiente para a doença de Alzheimer (Trevisan & Macedo, 2003).

Entre os vários ensaios *in vitro* de avaliação da capacidade de compostos ou extractos para inibir a AChE o mais usado é o ensaio fundamentado na reacção de Ellman. Este baseia-se na reacção da AChE com a acetiltiocolina (um derivado da acetilcolina), que é convertida num composto com um grupo tiol, a tiocolina. O reagente de Ellman, ou ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico (DTNB), reage com compostos com grupo tiol e origina o 5-tio-2-nitrobenzoato, que apresenta um máximo de absorção a 405 nm. Se no meio reaccional estiverem presentes compostos ou extractos com potencial para inibir a



enzima a conversão em tiocolina será diminuída, assim como a produção de 5-tio-2-nitrobenzoato e, portanto, haverá uma diminuição na absorvância a 405 nm (Trevisan & Macedo, 2003).

#### 1.4. Bactérias nodulantes

A inoculação de leguminosas representa um episódio de sucesso na história da agricultura. As primeiras tentativas de inoculação de plantas eram rudimentares e remontam ao séc. XIX. Em 1896, Beijerinck isolou e caracterizou, pela primeira vez, bactérias provenientes dos nódulos de raízes e usou-as para infectar legumes plantados em solos estéreis. A partir de então tornou-se conhecimento comum que haveria necessidade de inocular leguminosas destinadas a ser plantadas pela primeira vez ou quando a inoculação já tenha decorrido há um longo período de tempo (Deaker *et al.*, 2004; Dilworth *et al.*, 2008).

A fixação de azoto por bactérias pode ocorrer de duas formas, a simbiótica e a não simbiótica. Na não simbiótica os organismos são independentes entre si, enquanto na primeira é privilegiada uma associação com uma planta hospedeira, como é o caso das bactérias nodulantes dos géneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*. A associação planta-bactéria é simbiótica quando a planta fornece energia, hidratos de carbono e nutrientes minerais para as bactérias e estes microrganismos, por sua vez, usam essa energia para fixar azoto atmosférico, tornando-o biodisponível para a planta (Panzieri *et al.*, 2000).

Um dos elementos essenciais da agricultura sustentável é uma gestão eficaz do azoto no meio ambiente, ou seja, a utilização preferencial de N<sub>2</sub> (gás inerte) biologicamente fixado, uma vez que o azoto obtido via fertilizantes é mais susceptível à desnitrificação, volatilização e lixiviação (Graham & Vance, 2000). Apesar do azoto ser um dos principais constituintes da atmosfera terrestre não é captado pelos organismos vivos, pelo que tem de ser transformado em nitratos ou amónia, formas mais adequadas ao ciclo de vida (Panzieri *et al.*, 2000).

Actualmente cerca de 80% do N<sub>2</sub> é originado pela simbiose de plantas leguminosas com espécies de bactérias dos géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium* e *Allorhizobium* (Graham & Vance, 2000). No entanto, começam a surgir outros organismos e simbioses que também são vistos como factores

importantes de fixação de N<sub>2</sub>, em geral, e de sustentação da diversidade agrícola, florestal e das configurações do ecossistema, em particular (Graham & Vance, 2000; Dilworth *et al.*, 2008).

Os principais objectivos da inoculação são a redução da aplicação de fertilizantes químicos no cultivo e o aumento da produtividade da cultura pela presença de bactérias. Para obter tais resultados o inóculo deve ter sucesso na competição com outros organismos presentes no solo e alta capacidade de persistência (Panzieri *et al.*, 2000). Paralelamente o solo deve estar em boas condições. Solos demasiado ácidos ou básicos, assim como alta temperatura, baixa humidade ou salinidade podem ser prejudiciais para as bactérias inoculantes (Catroux *et al.*, 2001).

A associação entre plantas e bactérias fixadoras de azoto, em particular entre *Bradyrhizobium* spp. e soja, provou ser muito útil no desenvolvimento de uma agricultura mais sustentável (Fogher *et al.*, 1998). O azoto é frequentemente um factor limitante no cultivo e produtividade da soja, mas quando as bactérias fixadoras de azoto estão presentes em concentrações adequadas no solo a soja obtém da atmosfera o N<sub>2</sub> total de que necessita, não carecendo de fertilização adicional. Nessa medida, a actividade das bactérias de género *Bradyrhizobium* é extremamente importante, tanto do ponto de vista ambiental como económico. Por um lado, o custo do inóculo é relativamente baixo e, por outro, as bactérias introduzidas no solo persistem por algum tempo, podendo permanecer 3 a 4 anos. Assim, caso a soja seja cultivada no mesmo solo não há necessidade de inoculação adicional. Pelo que acima foi mencionado, considera-se que o desenvolvimento e a utilização desta técnica agrícola integrada devem ser fortemente encorajados, por se tratar de um procedimento económico, ecológico e perfeitamente compatível com uma agricultura sustentável (Panzieri *et al.*, 2000).

#### 1.4.1. *Bradyrhizobium japonicum*

O género *Bradyrhizobium* (designação com origem na palavra grega *bradus*, que significa lento) foi definido para incluir as bactérias com a capacidade de fixar azoto e formar nódulos em plantas leguminosas de crescimento lento (Figura 8) (Willems *et al.*, 2001; Vieira, 2007). Estão descritas várias espécies: *Bradyrhizobium japonicum*,

*Bradyrhizobium elkaniic*, *Bradyrhizobium betae*, *Bradyrhizobium canariense*, *Bradyrhizobium jicamae*, *Bradyrhizobium pachyrhizi*, *Bradyrhizobium denitrificans* e *Bradyrhizobium liaoningense* (DSMZ, 2011). A maioria das estirpes destas espécies foram isoladas de nódulos retirados de plantas do género *Glycine* (Willems *et al.*, 2001; Vieira, 2007).



**Figura 8.** Nódulos em raiz de *G. max* inoculada com *Bradyrhizobium japonicum*.

As bactérias da espécie *B. japonicum* são Gram (-), com um único flagelo polar, ou subpolar, e estabelecem uma relação de simbiose com a soja por meio de infecção da raiz alongada. Estas bactérias demonstraram ser muito eficientes na fixação de azoto, muito competitivas e revelaram alta resistência a alguns antibióticos, característica que as distingue do género *Rhizobium* (Barbour *et al.*, 1991; Rodriguez-Navarro *et al.*, 2011).

Num meio de cultura líquido o género *Bradyrhizobium* demora 3 a 5 dias a produzir turbidez moderada e 6 a 8 horas para duplicar o tamanho da população (Barbour *et al.*, 1991; Vieira, 2007; Saharan & Nehra, 2011). A sua motilidade e quimiotactismo, nas primeiras etapas do processo de inoculação, permitem à bactéria espalhar-se no solo, localizar os locais de infecção, nodular a planta e competir eficazmente na formação de nódulos (Barbour *et al.*, 1991).

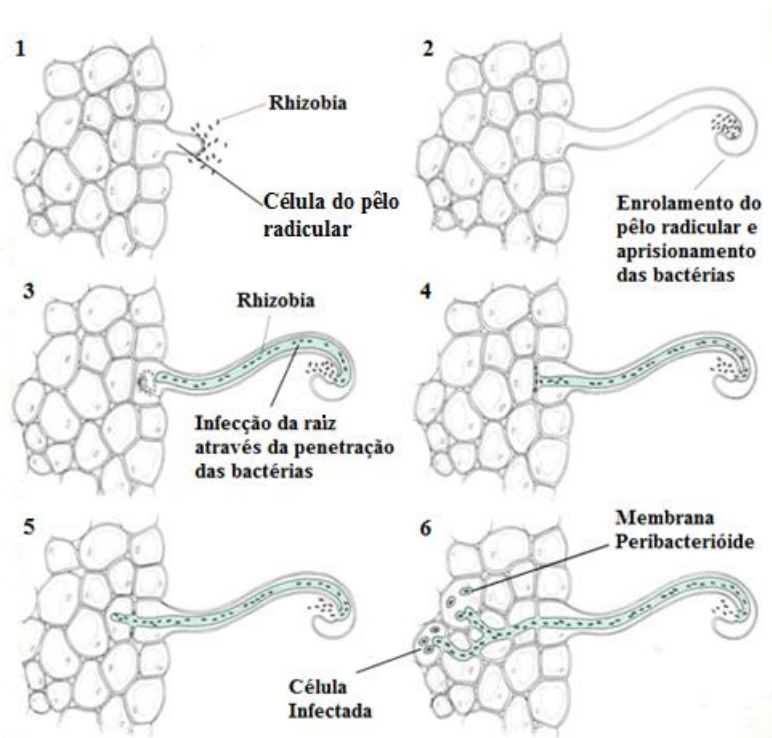
#### 1.4.2. Nodulação e fixação biológica de azoto

O processo de nodulação necessita da mútua secreção controlada de moléculas de sinalização e reconhecimento das mesmas, tanto por parte da planta, na sua globalidade, como pela bactéria simbiote (Limpens & Bisseling, 2003).

Existem fortes evidências de que os exsudados libertados pela raiz, constituídos por vários compostos orgânicos, são um importante agente iniciador e modelador do processo simbiótico com a bactéria simbiote (Badri & Vivanco, 2009). Diversos tipos de compostos, tais como ácidos orgânicos, aminoácidos e flavonóides, particularmente isoflavonas, são sinalizadores quimiotáticos, que estimulam a aproximação de bactérias benéficas do solo (Barbour *et al.*, 1991; Subramanian *et al.*, 2007). Um estudo sobre a resposta quimiostática de *B. japonicum* a exsudados de *G. max* realizado por Barbour *et al.* (1991) sugere que as isoflavonas não são o principal atractivo dos exsudados: outro tipo de flavonóides, aminoácidos e ácidos orgânicos também induzem uma forte resposta quimiostática da bactéria.

Uma vez atraídas as bactérias, os sinalizadores quimiotáticos presentes nos exsudados produzidos pela planta induzem a bactéria a produzir um conjunto específico de genes (*nod*) em redor da raiz. A transcrição dos genes *nod* ocorre após a ligação entre os flavonóides e proteínas da bactéria e dá origem à produção de oligossacáridos lipoquitínicos (factor Nod), secretados pela bactéria e reconhecidos pelos receptores específicos da planta. No caso da *G. max*, os compostos com maior potencial indutor dos genes *nod* de *B. japonicum* são as isoflavonas, mais especificamente a daidzeína, malonildaizina, genisteína, genistina e malonilgenistina (Subramanian *et al.*, 2007).

Os factores Nod ligam-se aos receptores quinase da planta, desencadeando uma cascata complexa de etapas fisiológicas e de desenvolvimento na planta hospedeira (Figura 9): i) enrolamento dos pêlos radiculares, para aprisionar as bactérias nodulantes que penetram na raiz; ii) divisão das células corticais da raiz e formação de um primórdio do nódulo; iii) invasão do primórdio do nódulo pelas bactérias; iv) formação do simbiossoma, estrutura que resulta da recolha de várias bactérias no interior de uma membrana peribacteriíode, que segrega os bacteriíodes do citoplasma da planta; v) diferenciação das bactérias em bacteriíodes maduros, que sintetizam a enzima responsável pela redução do N<sub>2</sub>, a nitrogenase; vi) continuação da divisão celular da planta e bactérias, para a formação de nódulos na raiz madura (Dilworth *et al.*, 2008).



**Figura 9.** Etapas do processo de infecção de bactérias nodulantes (Adaptado de Van Heerden *et al.*, 2007).

A redução de  $N_2$  a amónia ( $NH_4^+$ ) ocorre no citoplasma do bacteriíode através da acção da nitrogenase, que para ter uma actividade óptima necessita de uma baixa pressão e de uma alta dose de ATP. No entanto, o ião resultante não pode atravessar as membranas, nunca alcançando, assim, a célula hospedeira. Desta forma, a amónia e o amoníaco ( $NH_3$ ) são facilmente inter-convertidos, sendo o azoto na forma  $NH_3$  excretado do bacteriíode como produto da fixação de azoto. O produto da acção da nitrogenase é transferido para a célula hospedeira, onde é posteriormente convertido em glutamina e asparagina. No caso de algumas leguminosas como a soja, o azoto fixado é distribuído pela planta sob a forma de ureídeos, alantoína e ácido alantóico, e seguidamente incorporado em aminoácidos e proteínas (Prell & Poole, 2006; Kneip *et al.*, 2007).

O estabelecimento e a manutenção de uma simbiose efectiva dependem de diversos factores abióticos, tais como o pH, a fertilidade do solo, o stress hídrico e a temperatura (Serraj *et al.*, 1999). No entanto, mesmo em condições ideais de crescimento, a vida útil dos nódulos da raiz é reduzida, ocorrendo ao longo do tempo a sua senescência, fenómeno que é irreversível (Dilworth *et al.*, 2008). No caso da soja a senescência dos nódulos ocorre após o período de enchimento das vagens (Muller *et al.*, 2001).

#### 1.4.3. Impacto da inoculação de *B. japonicum* no metabolismo de *G. max*

O desenvolvimento do processo simbiótico, resultante da interação entre plantas leguminosas e bactérias fixadoras de azoto, é complexo e regulado pela troca mútua de moléculas difusíveis. Durante as primeiras fases do processo de infecção, as bactérias provocam a deformação da raiz, a despolarização da membrana celular, a reorientação do citoesqueleto, a fixação de cálcio, a divisão de células corticais e a alteração da expressão de uma variedade de genes das plantas (Stacey *et al.*; 2006). A formação do segmento de infecção, através do qual se processa a entrada da bactéria para a célula vegetal, também requer uma mudança drástica no metabolismo celular para apoiar a formação da parede celular e componentes da membrana (Brechenmacher *et al.*, 2010; Stacey *et al.*, 2006).

Já foram descritas inúmeras alterações, tanto ao nível da biossíntese da membrana, com aumento da mesma para apoiar a formação de novas membranas durante o processo de infecção e desenvolvimento de nódulos, como no fornecimento de fontes de carbono, para suportar a síntese de ATP e para responder ao acréscimo de azoto disponibilizado pelo simbiote (Roth & Stacey, 1989).

Os ácidos gordos, entre os quais se destaca o ácido linolénico descrito em raízes inoculadas com *B. japonicum*, estão potencialmente envolvidos na modificação da fluidez da membrana, a qual é necessária para que as bactérias colonizem a célula. Assim, o aumento dos ácidos gordos relatado no estudo de Brechenmacher *et al.* (2010) pode ser um simples reflexo da regulação das vias metabólicas necessárias para a síntese de novas membranas durante o processo de infecção. Nesse estudo os ácidos láurico e mirístico foram reprimidos na raiz 12 horas após a inoculação com *B. japonicum*, em contraste com os ácidos gordos livres acumulados em níveis mais elevados (Brechenmacher *et al.*, 2010). Esta repressão na raiz inoculada, associada à propriedade antifúngica do ácido láurico, pode estar na origem da regulação em baixa da reacção de defesa de soja (Walters *et al.*, 2003).

A regulação dos vários metabolitos sugere que *B. japonicum* possa suprimir vias de defesa da planta durante a infecção. Em relação às isoflavonas e ácidos gordos livres, a regulação das vias biossintéticas pode, neste caso, ser devida ao seu papel na sinalização durante a simbiose ou reflectir a necessidade de aumento da biossíntese celular para

criar os componentes estruturais necessários ao desenvolvimento simbiótico (Brechenmacher *et al.*, 2010; Libault *et al.*, 2010).

O envolvimento das ROS com a defesa antioxidante em etapas fundamentais da formação de nódulos, como no decorrer da infecção, revela a importância da regulação *redox* para o desenvolvimento dos nódulos. No entanto, existem várias estirpes bacterianas que apresentam fraca defesa antioxidante, alterando a sua capacidade de fixação de azoto, sem modificar o seu crescimento em condições de vida livre, o que sugere que o ambiente do nódulo é mais stressante do que o solo para as bactérias (Chang *et al.*, 2009).

A influência da inoculação com *B. japonicum* no metabolismo de *G. max* é, ainda, um tema pouco desenvolvido. Um estudo realizado por Couto *et al.* (2011) mostrou que a nodulação simbiótica de *B. japonicum* provocou alterações no metabolismo primário e secundário de *G. max*, tendo incrementado a biossíntese de compostos voláteis, ácidos orgânicos e compostos fenólicos, levando a um aumento da capacidade antioxidante das partes aéreas (Couto *et al.*, 2011).

## II. OBJECTIVOS

O trabalho desenvolvido teve como principais objectivos:

- A caracterização dos compostos fenólicos, ácidos orgânicos, fitosteróis, ácidos gordos e compostos voláteis presentes em rebentos de *G. max*, *V. radiata* e *M. sativa*;
- A avaliação da capacidade antioxidante dos rebentos de *G. max*, *V. radiata* e *M. sativa*;
- A avaliação da capacidade de inibição de acetilcolinesterase dos rebentos de *G. max*, *V. radiata* e *M. sativa*;
- O estabelecimento de correlações entre a composição química e a actividade biológica dos rebentos de *G. max*, *V. radiata* e *M. sativa*;
- A caracterização dos compostos fenólicos, ácidos orgânicos, fitosteróis, ácidos gordos e compostos voláteis presentes em sementes de *G. max* e avaliação da sua capacidade antioxidante e de inibição da acetilcolinesterase;
- A avaliação do efeito da inoculação com *B. japonicum* no metabolismo primário e secundário e actividade biológica das sementes de *G. max*;
- A comparação da composição química e actividade biológica de sementes e rebentos de *G. max*.



### III. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Substâncias de referência e reagentes

Todos os reagentes utilizados possuíam grau analítico adequado. As substâncias de referência foram adquiridas a diversos fornecedores: os ácidos cítrico, málico, quínico, succínico, oxálico, aconítico, chiquímico e fumárico, hexanal, octanal, ácidos *p*-cumárico e ferúlico, daidzeína, genisteína, malonildaidzina, malonilgenistina, daidzina, genistina, 3-metil-1-butanol, 2-metil-1-butanol, etil-octanoato, (*E,E*)-2,4-nonadienal, (*E*)-2-nonen-1-ol, 6-metil-5-hepten-2-ona, benzaldeído, linalol, eugenol, (*E*)-2-hexenal,  $\beta$ -ciclocitral,  $\beta$ -sitosterol, campesterol, estigmasterol e betulina eram da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA); o kit de metil-ésteres de ácidos gordos foi adquirido à Supelco (Bellafonte, PA, EUA) e o metil-jasmonato, 2-metil-butanal, 3-metil-butanal, sulfureto de dimetilo, trissulfureto de dimetilo, (*E*)-2-nonenal, (*E*)-2-octenal, 1-octen-3-ol, álcool benzílico,  $\beta$ -ionona, (*Z*)-2-heptenal, (*E,Z*)-2,6-nonadienal, (*Z*)-2-decenal, 1-penten-3-ol, 3-octen-2-ona, (*E,E*)-2,4-heptadienal, 2-*sec*-2-metil-pirazina e heptanal foram fornecidos pela SAFC (Steinheim, Alemanha); o eucaliptol, ácidos vanílico, cinâmico, cafeico e 5-*O*-cafeoilquínico, quercetina-3-*O*-glucósido, luteolina-4'-*O*-glucósido, luteolina-7-*O*-glucósido, campferol-3-*O*-glucósido, campferol-3-*O*-rutinósido foram adquiridos à Extrasynthèse (Genay, França); o mentol, 1-hexanol e limoneno eram da Fluka (Buchs, Suíça). O DPPH•, NADH, PMS, NBT, DTNB, sulfanilamida, AChE de enguia eléctrica (tipo VI-s, liofilizado), iodeto de acetiltiocolina (ATCI), SNP, tolueno, metanol e acetonitrilo foram adquiridos à Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). A N-(1-naftil)-etilenodiamina, etanol, di-hidrogenofosfato de potássio e o ácido sulfúrico foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). O sulfato de sódio anidro e o isoctano foram adquiridos à Panreac Química SA (Barcelona, Espanha). O hidróxido de potássio foi fornecido pela Pronalab (Lisboa, Portugal) e o trifluoreto de boro (BF<sub>3</sub>) pela Supelco (Bellafonte, PA, EUA). A água foi desionizada usando um sistema Milli-Q de purificação de água (Millipore, Bedford, MA).

### 3.2. Amostras de rebentos

Neste trabalho foram usados rebentos de *G. max*, *V. radiata* e *M. sativa* adquiridos numa superfície comercial local. As amostras foram congeladas, liofilizadas, e pulverizadas (1600 µm).

### 3.3. Amostras de sementes

As sementes de *G. max*, obtidas numa superfície comercial local, foram esterilizadas com etanol (70%), durante um minuto, passando depois para uma solução de hipoclorito de sódio (7%), durante 5 minutos, e seguidamente lavadas com água destilada estéril.

#### 3.3.1. Isolamento e inoculação de *B. japonicum*

A estirpe de *B. japonicum* foi isolada de nódulos de raízes de *G. max* provenientes da Argentina. O isolamento foi efectuado de acordo com o método de Vincent (1970) em meio levedura-manitol (Bergersen, 1961). As bactérias foram cultivadas em meio YMA e incubadas durante 48 h a 28 °C. A cultura resultante foi utilizada na inoculação das sementes de *G. max*: as sementes estéreis foram inoculadas com uma suspensão de *B. japonicum* contendo  $8 \times 10^8$  células/mL.

#### 3.3.2. Condições de crescimento

As sementes inoculadas e não inoculadas foram semeadas em vasos contendo solo estéril coberto com vermiculite, para tornar o solo mais poroso, evitando a sua colmatação, retendo água e sais minerais. Os vasos foram colocados numa câmara de crescimento com iluminação mista fluorescente e incandescente ( $400 \text{ microE m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ; 400 a 700 nm), programada para um fotoperíodo de 16 h (ciclo noite-dia), com uma temperatura constante (25 a 27 °C) e humidade relativa de 50 a 60%. A planta completou o ciclo de vida vinte semanas após a germinação (Figura 10), obtendo-se a semente madura. As sementes foram recolhidas, pesadas e pulverizadas (1600 µm).



**Figura 10.** Plantas de *G. max* inoculadas com *B. japonicum*: (A, B) antes da floração; (C) no final do ciclo de vida.

#### 3.4. Determinação dos compostos fenólicos

##### *Extracção:*

(1) Extractos aquosos de sementes e de rebentos: pesaram-se 3 g de cada material vegetal, que foram extraídos com 600 mL de água durante 15 minutos, à ebulição. Os extractos resultantes foram filtrados com recurso a um funil de Büchner, congelados e liofilizados. Os extractos foram mantidos num exsiccador e ao abrigo da luz. Para análise dos compostos fenólicos os extractos foram redissolvidos em água ultra pura e filtrados através de uma membrana de nylon de 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore, Bedford, MA).

(2) Extracto metanólico de sementes de *G. max*: pesou-se 1 g de material vegetal, ao qual se adicionou 50 mL de metanol. A extracção foi efectuada com agitação (300 rpm), durante 10 minutos e o extracto obtido foi filtrado através de funil de Büchner. O extracto metanólico foi concentrado até à secura sob condições de pressão reduzida, a uma temperatura constante de 35 °C, redissolvido em metanol e filtrado através de uma membrana de politetrafluoretileno (PTFE) de 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore, Bedford, MA).

*Análise por HPLC/DAD:* Os extractos foram analisados num sistema de HPLC (Gilson), usando uma coluna Spherisorb ODS2 (25,0 cm x 0,46 cm; 5  $\mu\text{m}$  de tamanho da partícula; Waters, Milford, MA). Os eluentes usados foram água:ácido fórmico (19:1) (A) e metanol (B), com o seguinte gradiente: a eluição iniciou-se com 5% de B, atingindo 15% aos 3 min, 30% aos 25 min, 35% aos 35 min, 45% aos 39 min, 45% aos

42 min, 50% aos 44 min, 55% aos 47 min, 70% aos 50 min, 75% aos 56 min e 80% aos 60 min. O fluxo de eluente foi de 0,9 mL/min e o volume de injeção de 20 µL. A detecção foi efectuada com um detector de díodos (DAD) (Gilson). Os dados espectrais dos picos foram recolhidos no intervalo de 200-400 nm e os cromatogramas obtidos para as amostras em estudo foram registados a 280, 320 e 350 nm, e analisados com o software Unipoint (Gilson Medical Electronics, Villiers-le-Bel, França). A identificação dos compostos fenólicos em cada extracto foi feita por comparação do tempo de retenção e do espectro de absorção no UV-Vis com os do composto padrão. A quantificação de compostos fenólicos foi obtida através da absorvância registada nos cromatogramas em relação aos padrões externos, sendo os ácidos fenólicos quantificados a 320 nm e os flavonóides a 350 nm.

#### 3.4.1. Determinação das isoflavonas

*Extracção:* O método utilizado para extracção das isoflavonas foi adaptado do procedimento descrito por Shi *et al.* (2010). Pesaram-se 0,5 g de sementes de *G. max* e 0,5 g de cada amostra de rebentos, que foram agitadas (300 rpm) com uma mistura de acetonitrilo/água (5 mL/3 mL) durante 2 horas, à temperatura ambiente. Seguidamente, adicionaram-se 2 mL de água e centrifugou-se (Rotofix 32 A Hettich centrifuge) durante 5 minutos a 4000 rpm. O sobrenadante foi filtrado por uma membrana PTFE de 0,45 µm e conservado a -20 °C até análise por HPLC.

*Análise por HPLC/DAD:* 20 µL de cada um dos extractos foram analisados num sistema de HPLC (Gilson), usando uma coluna Spherisorb ODS2 (25,0 cm x 0,46 cm; 5 µm de tamanho da partícula; Waters, Milford, MA). A fase móvel utilizada foi uma mistura de ácido acético 1% (v/v) em água (A) e acetonitrilo (B). O gradiente teve início com 10% de B, atingindo os 20% aos 40 min, e 100% aos 30 min. O fluxo de eluente foi de 0,8 mL/min. A detecção foi efectuada com um DAD (Gilson).

Os dados espectrais dos picos foram recolhidos no intervalo de 200-400 nm. Os cromatogramas obtidos para as amostras em estudo foram registados a 260 nm, e analisados com o software Unipoint (Gilson Medical Electronics, Villiers-le-Bel, França). A identificação das isoflavonas em cada extracto foi feita por comparação do seu tempo de retenção e do espectro de absorção no UV-Vis com os de padrões. A

quantificação de isoflavonas foi obtida através da absorvância registada nos cromatogramas em relação aos padrões externos.

### 3.5. Determinação dos fitosteróis

Para determinar a composição dos fitosteróis livres foram realizadas hidrólises ácida e alcalina.

*Hidrólise ácida:* foi utilizado o método descrito por Toivo *et al.* (2001) com algumas alterações. Resumidamente, 0,5 g de semente e 1,0 g de cada amostra de rebentos foram acidificados por refluxo com 20 mL de solução etanólica de HCl 0,5 M durante 1 hora, a uma temperatura constante de 80 °C. Posteriormente a mistura foi centrifugada e decantada para uma ampola de decantação, para extrair a fracção insaponificável com *n*-hexano (3 x 10 mL). A fase orgânica foi evaporada até à secura em evaporador rotativo. O resíduo foi redissolvido em 1 mL de metanol e o extracto foi filtrado através de uma membrana PTFE de 0,45 µm (Millipore, Bedford, MA).

*Hidrólise alcalina:* as condições de saponificação e extracção usadas foram adaptadas do método descrito por Sánchez-Machado *et al.* (2004). Resumidamente, 0,5 g de semente e 1,0 g de rebentos foram submetidos a saponificação, por refluxo com 20 mL de solução etanólica de KOH 1 M, durante 1 hora, à temperatura constante de 80 °C. Posteriormente a mistura foi centrifugada e decantada para uma ampola de decantação, de forma a extrair a fracção insaponificável com *n*-hexano (3 x 10 mL). A fase orgânica foi evaporada até à secura em evaporador rotativo, sendo redissolvida em 1 mL de metanol e filtrada através de uma membrana de PTFE de 0,45 µm (Millipore, Bedford, MA).

*Análise por HPLC/DAD:* Os extractos (20 µl) foram injectados num sistema de HPLC (Gilson), equipado com uma coluna de fase reversa Hypersil ODS (200 mm x 4,0 mm; 5 µm de tamanho de partícula; Thermo Scientific, Waltham, MA). A fase móvel utilizada foi a mistura metanol:acetonitrilo (30:70), com fluxo de 0,8 mL/min. A detecção foi obtida com recurso a um detector de díodos (Gilson). Os dados espectrais de todos os picos foram obtidos entre 190 e 400 nm. Os cromatogramas foram registados a 205 nm e analisados pelo software Unipoint (Gilson Medical Electronics, Villiers le Bel, França).

Os fitosteróis foram identificados por comparação dos tempos de retenção e dos espectros de absorção no UV, com os das substâncias de referência utilizadas. A quantificação foi efectuada através da absorvância registada nos cromatogramas correspondentes às amostras relativamente aos padrões externos.

### 3.6. Determinação dos ácidos orgânicos

*Extracção:* os ácidos orgânicos foram extraídos de 1,0 g de sementes e 0,125 g de rebentos com recurso a 50 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,01 N e agitação a 300 rpm, durante 30 minutos. Os extractos obtidos foram filtrados e evaporados à secura (40 °C) em condições de pressão reduzida. O extracto seco foi redissolvido em 1 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,01 N e posteriormente filtrado por membrana de PTFE de 0,45 µm.

*Análise por HPLC/UV:* os ácidos orgânicos foram analisados num sistema de HPLC (Gilson), utilizando uma coluna de troca iónica Nucleogel Ion 300 AO (300 mm x 7,7 mm; Mancherrey-Nagel, Düren, Alemanha), em conjunto com um dispositivo de aquecimento da coluna, com temperatura constante de 30 °C. A eluição foi realizada num intervalo de 70 minutos, usando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,01 N como fase móvel, com um fluxo de 0,2 mL/min. O volume de injeção foi de 20 µL. Para a detecção dos compostos foi utilizado um detector UV-VIS (Gilson) a 214 nm. A identificação e quantificação dos ácidos orgânicos foram obtidas por comparação com os tempos de retenção e absorvância registada nos cromatogramas relativamente a padrões externos.

### 3.7. Determinação dos ácidos gordos

Os ácidos gordos encontram-se presentes nas amostras, tanto na forma livre como na forma esterificada, sendo necessário proceder à hidrólise alcalina dos ésteres para obter os ácidos gordos totais da amostra.

*Extracção e derivatização:* foi efectuada o procedimento descrito por Ribeiro *et al.* (2009). Assim, os ácidos gordos esterificados nas sementes (0,010 g) e nos rebentos (0,125 g) foram hidrolisados com uma solução metanólica de KOH (11 g/L), a 90 °C durante 10 minutos. Os ácidos gordos livres presentes inicialmente e os obtidos por hidrólise alcalina foram derivatizados para a forma de ésteres metílicos usando solução

metanólica de BF<sub>3</sub> (10%), a 90 °C, durante 10 minutos. Os ésteres metílicos foram extraídos com isoctano e, para garantir a ausência de água, foi adicionado sulfato de sódio anidro. Finalmente, o extracto resultante foi evaporado à secura por corrente de azoto e redissolvido em isoctano (400 µL).

*Análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS):* A mistura de padrões de ácidos gordos e os extractos das várias amostras foram analisados num cromatógrafo de fase gasosa Varian CP-3800 (EUA), equipado com um detector de massa Varian Saturn 4000 (EUA) e com o software para análise de resultados Saturn GC/MS, versão 6.8. A coluna utilizada foi VF-5 ms (30 m x 0,25mm x 0,25 µm; Varian, Santa Clara, EUA). O injector foi aquecido a 250 °C e as injeções foram efectuadas em modo *split* com uma proporção de 1/40. Como fase móvel foi usado o Hélio C-60 (Gasin, Portugal), com um fluxo constante de 1 mL/min. A temperatura da coluna foi fixada em 40 °C durante 1 minuto, de seguida foi aumentada 5 °C/min até 250 °C e, posteriormente, 3 °C/min até 300 °C. Todos os espectros de massa foram obtidos por impacto electrónico (EI). Nos primeiros 4 minutos a ionização foi mantida inactiva para a evitar a sobrecarga de solvente. O detector *Ion Trap* foi programado nas seguintes condições: temperatura de *transfer line*, *manifold* e *trap* de 280, 50 e 180 °C, respectivamente. Os intervalos de massa foram definidos para 50 a 600 *m/z*, com uma frequência de 6 scans/segundo. A emissão de corrente foi de 50 mA, e o multiplicador de electrões foi programado em modo de auto-calibração. O tempo máximo de ionização foi de 25,000 µs, com um nível de armazenamento de 35 *m/z*. O volume de injeção para os extractos e para a mistura de padrões de ácidos gordos foi de 1 µL e a análise foi realizada em modo *full scan*.

A identificação dos compostos foi efectuada através da comparação dos seus tempos de retenção e espectros de massa com os da mistura de padrões de ácidos gordos analisados nas mesmas condições, e com a base de dados do *National Institute of Standards and Technology* (NIST) MS 05 (correspondência superior a 80%). A quantidade de ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME) presentes nas amostras foi obtida através da curva de calibração da mistura de padrões de FAME.

### 3.8. Determinação dos compostos voláteis

*Fibras para microextração em fase sólida (SPME):* várias fibras comerciais podem ser usadas para a extração de compostos voláteis; para este estudo a escolha foi baseada nas recomendações do fornecedor (Supelco, Bellefonte, PA, USA) e no conhecimento prévio da eficácia da fibra em questão (Guedes de Pinho, 2009a, 2009b). Como tal, foi utilizada uma fibra revestida com divinilbenzeno e polidimetilsiloxano (DVB/PDMS) com 65 µm de espessura.

*Headspace-microextração em fase sólida (HS-SPME):* Foram testadas diversas condições: presença ou ausência de água e presença ou ausência de NaCl. Obteve-se um maior rendimento de extração dos compostos voláteis com a exposição da fibra às amostras misturadas com 5 mL de água, juntamente com 2 g de NaCl, durante 10 minutos. De acordo com a bibliografia, a presença de quantidades significativas de NaCl melhora a eficácia do processo extractivo de compostos com propriedades de ácidos de Lewis, tais como álcoois e ácidos (Ortega *et al.*, 2001; Dong *et al.*, 2006).

Assim, 0,010 g de sementes pulverizadas e 0,125 g de cada amostra de rebentos pulverizados foram agitados (500 rpm) com 5 mL de água e 2 g de NaCl a uma temperatura de 45 °C, durante 5 minutos. A fibra foi exposta ao *headspace* do *vial* que continha a amostra durante 10 minutos, a uma temperatura de 45 °C e com agitação (250 rpm). De seguida, a fibra foi recolhida para dentro da agulha e o dispositivo de SPME foi removido do *vial* e inserido no injector do cromatógrafo de fase gasosa para dessorção térmica dos compostos, durante 1 minuto. A fibra foi posteriormente removida e condicionada no injector do GC durante 10 minutos a uma temperatura de 250 °C.

*Análise por GC-MS:* A análise de compostos voláteis foi realizada num cromatógrafo gasoso Varian CP-3800 (EUA) acoplado a um detector de massa Varian Saturn 4000 (EUA) e com o software Saturn GC/MS versão 6.8. A coluna usada foi VF-5 ms (30 m x 0,25mm x 0,25 µm; Varian, Santa Clara, EUA). O injector foi aquecido a uma temperatura de 220 °C, e as injeções foram efectuadas em modo *splitless*. A fase móvel utilizada foi hélio C-60 (Gasin, Portugal), com um fluxo constante de 1 mL/min. O gradiente de temperatura utilizado foi o seguinte: a temperatura inicial da coluna foi fixada em 40 °C durante 1 minuto; posteriormente foi aumentada 2 °C/min até atingir 98 °C. Todos os espectros de massa foram obtidos por EI. A ionização permaneceu inactiva



durante o primeiro minuto. O detector *Ion Trap* foi programado do seguinte modo: temperatura de *transfer line*, *manifold* e *trap* de 280, 50 e 180 °C, respectivamente.

Uma vez que numa análise preliminar as matrizes revelaram a presença de compostos de baixo peso molecular (inferior a 350 *m/z*), a sensibilidade do método foi aumentada para abranger valores de massa situados entre 40 e 350 *m/z*, a uma frequência de 6 *scans*/segundo. A emissão de corrente foi de 50 mA e o multiplicador de iões foi programado em modo de auto-calibração. O tempo máximo de ionização foi de 25,000  $\mu$ s, com um nível de armazenamento de 35 *m/z*. A análise foi efectuada no modo *full scan*.

A identificação dos compostos voláteis foi efectuada com base nos seus índices de retenção (índices Kovats) relativamente à série de *n*-alcanos C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>, espectros de massa dos respectivos padrões injectados nas mesmas condições, na base de dados NIST MS 05 (correspondência superior a 80%) e na comparação dos índices de retenção com os dados da literatura. As áreas dos picos foram obtidas a partir da análise do cromatograma em modo *full scan* e com auxílio dos iões de quantificação específicos de cada composto.

### 3.9. Análise estatística

A análise de componentes principais (PCA) foi realizada usando o software XLSTAT 2011. A PCA apresenta as semelhanças entre as amostras, através da projecção das mesmas num plano, permitindo identificar quais as variáveis que determinam as semelhanças e de que forma, em função da constituição química das amostras.

Todos os dados são apresentados na forma de média  $\pm$  desvio padrão de triplicados. As comparações estatísticas foram efectuada por análise de variância (ANOVA) para as amostras dos rebentos e pelo teste *t* para as amostras das sementes (Graph Pad Prism versão 5.00, Graph Pad Software, Inc, San Diego, CA). As diferenças foram consideradas significativas para  $p \leq 0,05$ .

### 3.10. Actividade antioxidante

Na avaliação da actividade antioxidante foram utilizados dois tipos de extractos. No caso das sementes foram testados os extractos metanólicos nos ensaios de DPPH•, radical anião superóxido e radical óxido nítrico e dos rebentos foram usados extractos aquosos liofilizados.

#### 3.10.1. Avaliação da intercepção do radical DPPH•

A capacidade dos extractos para interceptar o radical DPPH• foi determinada por espectrofotometria num leitor de placas Multiskan Ascent (Thermo; electron corporation), monitorizando o desaparecimento do DPPH• a 515 nm, de acordo com o procedimento descrito por Oliveira *et al.* (2009a). Numa placa de 96 poços, foram preparadas séries de diluições com 5 concentrações diferentes de extracto, tendo-se realizado três ensaios em triplicado. A mistura de reacção nos poços consistia em 25 µL de extracto e 200 µL de DPPH• 150 µM dissolvido em metanol. Simultaneamente, para cada ensaio foi efectuado um controlo no qual o extracto foi substituído por água (no caso dos rebentos) ou metanol (no caso das sementes) e realizou-se o ensaio em branco para cada concentração de extracto substituindo-se o DPPH• por metanol. Após a adição de DPPH•, que inicia a reacção, as placas foram incubadas durante 30 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Os resultados foram expressos em percentagem de intercepção do DPPH• relativamente ao controlo.

#### 3.10.2. Avaliação da intercepção do óxido nítrico

A actividade sequestrante do radical óxido nítrico foi determinada por espectrofotometria num leitor de placas Multiskan Ascent (Thermo; electron corporation), monitorizando o desaparecimento do radical a 562 nm, de acordo com o procedimento descrito por Oliveira *et al.* (2009a). Numa placa de 96 poços, foram preparadas séries de diluições com 5 concentrações diferentes de extracto, tendo-se realizado três ensaios em triplicado. A mistura reaccional em cada poço consistia em 100 µL de SNP 20 mM e 100 µL de extracto redissolvido em tampão fosfato (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM, pH = 7,4). Para cada ensaio foi efectuado um controlo no qual o extracto foi

substituído por tampão fosfato. As placas foram incubadas durante 60 minutos à temperatura ambiente e sob a luz. Após incubação, efectuou-se a adição de 100 µL do reagente de Griess [1% de sulfanilamida e 0,1% de dicloridrato de N-(1-naftil)-etilenodiamina, em 2% de ácido fosfórico], ou 100 µL de solução de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 2% (ensaio em branco). A mistura resultante foi incubada durante 10 minutos, à temperatura ambiente, antes da leitura das absorvâncias.

### 3.10.3. Actividade sequestrante do radical superóxido

A actividade sequestrante do radical superóxido foi determinada por espectrofotometria num leitor de placas Multiskan Ascent (Thermo; electron corporation), monitorizando o desaparecimento do radical a 560 nm, de acordo com o procedimento descrito por Oliveira *et al.* (2009a). Todos os componentes foram dissolvidos em tampão fosfato (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 19 mM, pH 7,4). Numa placa de 96 poços foram preparadas séries de diluições com 5 concentrações diferentes de extracto, tendo-se realizado três ensaios em triplicado. A mistura reaccional em cada poço consistia em 50 µL de extracto, 100 µL de solução de NADH (166 µM), 100 µL de solução de NBT (43 µM) e 50 µL de solução de PMS (2,7 µM). Para cada ensaio foi realizado um controlo, no qual o extracto foi substituído por tampão fosfato. A leitura foi realizada durante 2 minutos e à temperatura ambiente, a partir do momento em que se adicionou a solução de PMS. Os resultados foram expressos em percentagem de inibição da redução do NBT relativamente ao controlo.

### 3.11. Avaliação da inibição da actividade da acetilcolinesterase

A determinação da inibição da acetilcolinesterase pelos extractos aquosos das amostras foi realizada em placas de 96 poços, usando um leitor de placas Multiskan Ascent (Thermo Electron Corporation), e baseada no método de Ellman, de acordo com o procedimento descrito por Oliveira *et al.* (2009a).

Foram utilizadas as seguintes soluções tampão: tampão A (50 mM Tris-HCl, pH 8,0), tampão B (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, contendo 0,1% de albumina de soro bovino) e

tampão C (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, contendo 0,1 M de NaCl e 0,02 M de MgCl.6H<sub>2</sub>O).

Em cada poço adicionou-se, em triplicado, 25 µl de acetilcolina (15 mM), 125 µl de DTNB (3 mM) em tampão C, 50 µl de tampão B e 25 µl de extracto redissolvido em 10% de metanol em tampão A e a cinética da absorvância foi determinada a 405 nm. Posteriormente, adicionaram-se 25 µl da solução de acetilcolinesterase (0,44 U/mL), efectuando-se novamente a determinação. A absorvência lida previamente à adição da enzima foi subtraída à absorvência após adição da enzima, de modo a anular a hidrólise espontânea do substrato. A percentagem de inibição foi calculada comparando o extracto com o controlo (substituindo o extracto por metanol a 10% em tampão A).

## IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

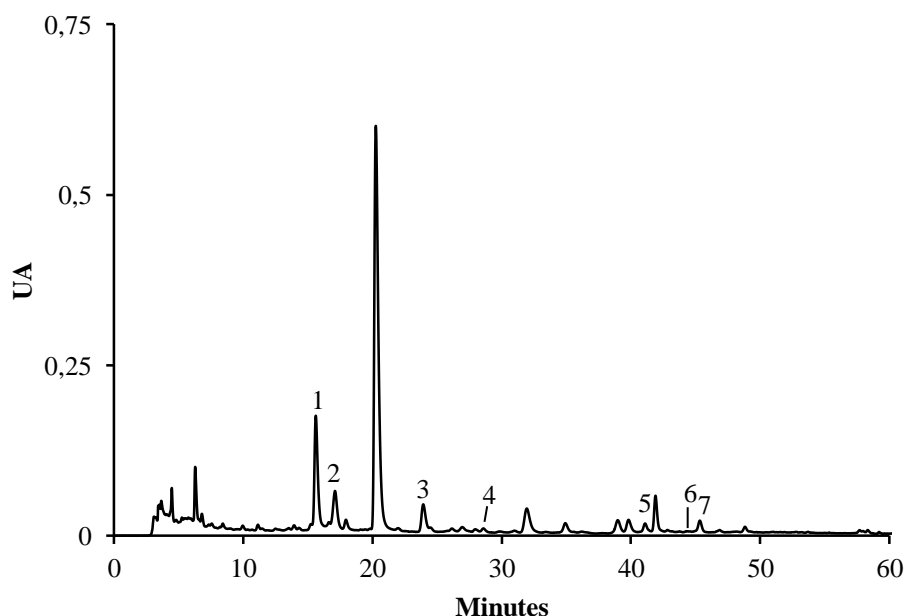
### 4.1. Rebentos de *G. max*, *V. radiata* e *M. sativa*

#### 4.1.1. Caracterização química

##### 4.1.1.1. Perfil de compostos fenólicos

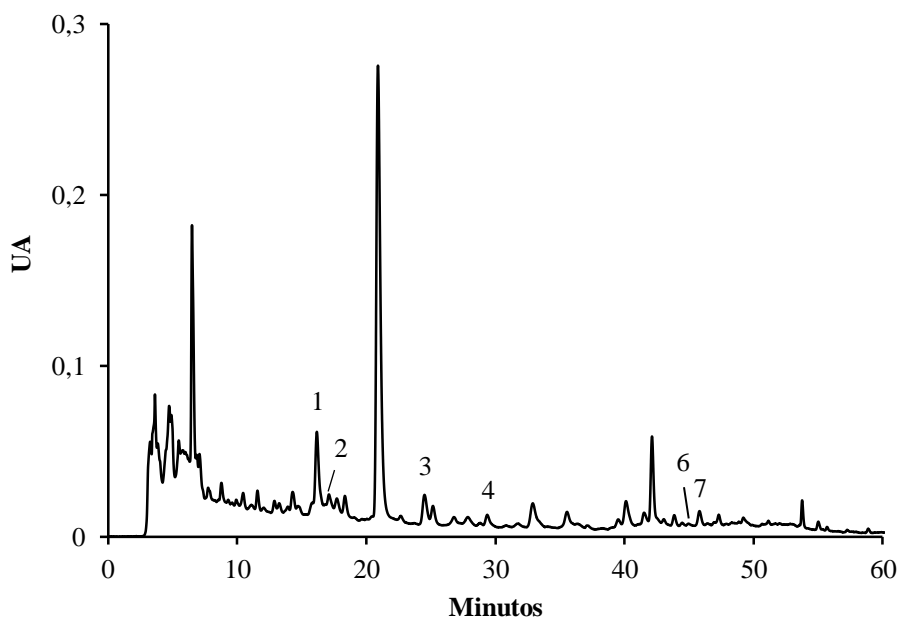
Por HPLC/DAD foram identificados um total de 10 compostos fenólicos, especificamente 7 nos rebentos de *G. max*, 6 nos rebentos de *V. radiata* e 5 em rebentos de *M. sativa*. Para avaliar a recuperação de compostos fenólicos, alíquotas de uma solução padrão de ácido *p*-cumárico, composto comum a todas as amostras, foram tratadas da mesma forma que as amostras e quantificadas por HPLC/DAD, tendo-se obtido uma recuperação de  $86\pm 1,3\%$ .

Nos rebentos de *G. max* foram identificados quatro ácidos hidroxicinâmicos (cafeico, *p*-cumárico, 5-*O*-cafeoilquínico e ferúlico) e três flavonóis glicosilados (quercetina-3-*O*-rutinósido, campferol-3-*O*-glucósido e campferol-3-*O*-rutinósido) (Figura 11).



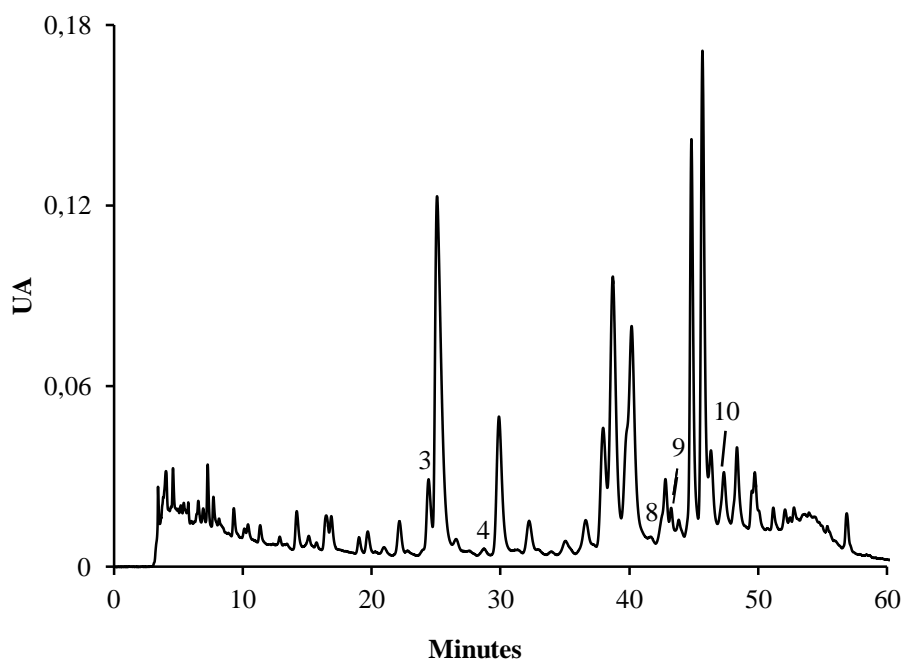
**Figura 11.** Perfil cromatográfico dos compostos fenólicos de rebentos de *G. max* obtido por HPLC/DAD. Detecção a 320 nm. (1) ácido 5-*O*-cafeoilquínico; (2) ácido cafeico; (3) ácido *p*-cumárico; (4) ácido ferúlico; (5) quercetina-3-*O*-rutinósido; (6) campferol-3-*O*-glucósido; (7) campferol-3-*O*-rutinósido.

O perfil de compostos fenólicos encontrado nos rebentos de *V. radiata* foi similar ao de *G. max*, tendo sido identificados os mesmos compostos, com a exceção da quercetina-3-*O*-rutinósido (Figura 12).



**Figura 12.** Perfil cromatográfico dos compostos fenólicos de rebentos de *V. radiata* obtido por HPLC/DAD. Detecção a 320 nm. (1) ácido 5-*O*-cafeoilquínico; (2) ácido cafeico; (3) ácido *p*-cumárico; (4) ácido ferúlico; (6) campferol-3-*O*-glucósido; (7) campferol-3-*O*-rutinósido.

O perfil dos rebentos de *M. sativa* revelou-se distinto dos anteriores. Nesta amostra foram identificados o ácido cinâmico e dois derivados deste (ácidos *p*-cumárico e ferúlico) e duas flavonas glicosiladas (luteolina-4'-*O*-glucósido e luteolina-7-*O*-glucósido) (Figura 13).



**Figura 13.** Perfil cromatográfico dos compostos fenólicos de rebentos de *M. sativa* obtido por HPLC/DAD. Detecção a 320 nm. (3) ácido *p*-cumárico; (4) ácido ferúlico; (8) ácido cinâmico; (9) luteolina-7-*O*-glucósido; (10) luteolina-4'-*O*-glucósido.

Todos os ácidos fenólicos identificados nos rebentos de *G. max* foram anteriormente reportados por Kim *et al.* (2006) e por Prakash *et al.* (2007). Dos três flavonóides identificados apenas a quercetina-3-*O*-rutinosídeo já tinha sido descrita, sendo o campferol-3-*O*-glucósido e o campferol-3-*O*-rutinosídeo identificados pela primeira vez neste estudo. No entanto, o campferol já tinha sido encontrado em rebentos de *G. max* (Prakash *et al.*, 2007).

Relativamente aos rebentos de *V. radiata* este é, ao que se sabe, o primeiro estudo sobre o perfil fenólico desta matriz. No caso dos rebentos de *M. sativa*, com a exceção do ácido cinâmico e da luteolina-4'-*O*-glucósido, todos os compostos identificados foram previamente descritos por Oh & Rajashekar (2009).

Os rebentos de *M. sativa* e *G. max* apresentaram quantidades de compostos fenólicos similares e os de *V. radiata* os teores mais baixos, com um total de 97,2, 86,7 e 34,5 mg/kg, respectivamente (Tabela 2). Comparando os rebentos das três espécies, constata-se que apenas os ácidos ferúlico e *p*-cumárico são comuns a todos, sendo os rebentos de

*M. sativa* os que apresentaram maiores quantidades destes ácidos, 6,0 e 14,4 mg/kg, respectivamente.

**Tabela 2.** Ácidos fenólicos, flavonas e flavonóis em rebentos de *G. max*, *V. radiata* e *M. sativa* (mg/kg).<sup>1</sup>

Compostos Fenólicos	<i>Glycine max</i>	<i>Vigna radiata</i>	<i>Medicago sativa</i>
Ácido cafeico	25,9 ± 0,9	21,2 ± 0,1 <sup>b</sup>	nd <sup>b</sup>
Ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquínico	5,4 ± 0,0	2,4 ± 0,0 <sup>b</sup>	nd <sup>b</sup>
Quercetina -3- <i>O</i> -rutinósido	29,5 ± 0,3	nd <sup>b</sup>	nd <sup>b</sup>
Ácido <i>p</i> -cumárico	9,5 ± 0,0	2,6 ± 0,0 <sup>b</sup>	14,4 ± 0,0 <sup>b</sup>
Campferol-3- <i>O</i> -glucósido	1,9 ± 0,0	1,0 ± 0,0 <sup>b</sup>	nd <sup>b</sup>
Campferol-3- <i>O</i> -rutinósido	12,9 ± 0,5	3,2 ± 0,1 <sup>b</sup>	nd <sup>b</sup>
Ácido ferúlico	1,6 ± 0,0	4,1 ± 0,0 <sup>b</sup>	6,0 ± 0,0 <sup>b</sup>
Ácido cinâmico	nd	nd <sup>a</sup>	57,9 ± 0,2 <sup>b</sup>
Luteolina-4'- <i>O</i> -glucósido	nd	nd <sup>a</sup>	17,4 ± 0,1 <sup>b</sup>
Luteolina-7- <i>O</i> -glucósido	nd	nd <sup>a</sup>	1,5 ± 0,0 <sup>b</sup>
Σ	86,7	34,5	97,2

<sup>1</sup> Os valores são expressos em média ± desvio padrão de três determinações; Σ soma dos compostos fenólicos determinados; nd: não detectado. <sup>a</sup> Em comparação com a amostra de *G. max* as diferenças não são significativas ( $p > 0,05$ ). <sup>b</sup> Em comparação com a amostra de *G. max* existem diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ).

Analisando cada uma das amostras individualmente, nos rebentos de *G. max* o composto maioritário foi a quercetina-3-*O*-rutinósido. Este composto possui uma variedade de actividades farmacológicas, tais como, antitumoral, antidiarreica, antimutagénica, imunomoduladora, anti-inflamatória, protectora do miocárdio e hepatoprotectora (Kamalakkannan & Prince, 2006).

Nos rebentos de *V. radiata* o composto maioritário foi o ácido cafeico. Este composto pode induzir efeitos biológicos na corrente sanguínea, inibir a oxidação do colesterol LDL e ter um efeito protector contra doenças cardiovasculares. Também está descrito o seu potencial antioxidante *in vitro*, sendo capaz de inibir a formação de compostos azotados mutagénicos e carcinogénicos (Olthof *et al.*, 2001).

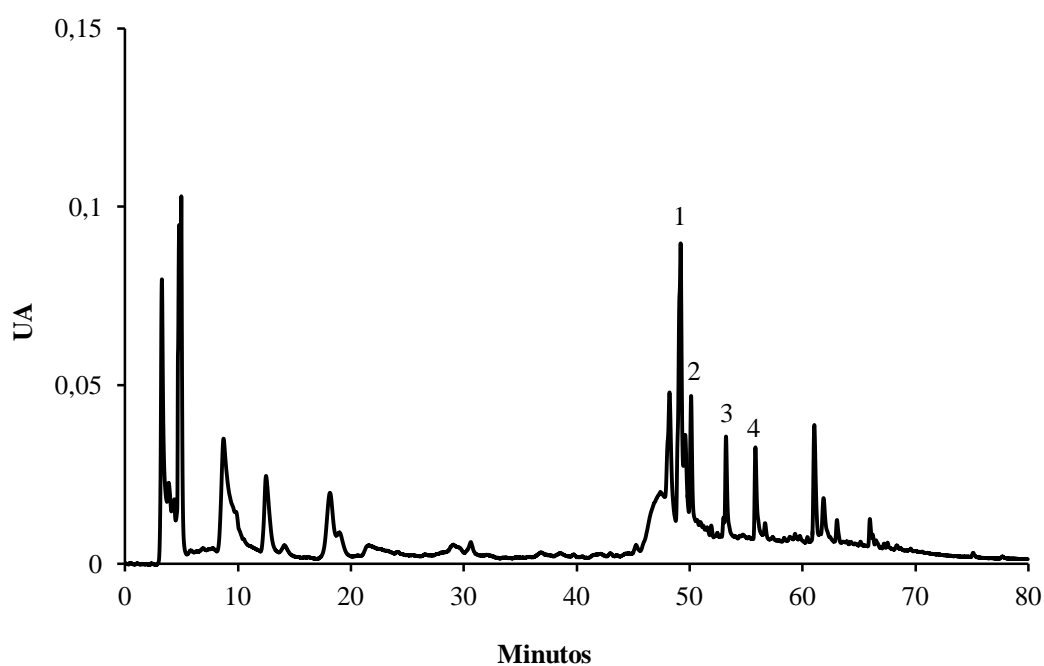
O ácido cinâmico foi o composto identificado em maiores quantidades nos rebentos de *M. sativa*. Este composto possui propriedades antimicrobianas contra *Echerichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter subtilis* e *Bacillus subtilis* (Nascimento *et al.*, 2000) e potencial antioxidante (Yalpani *et al.*, 1993).



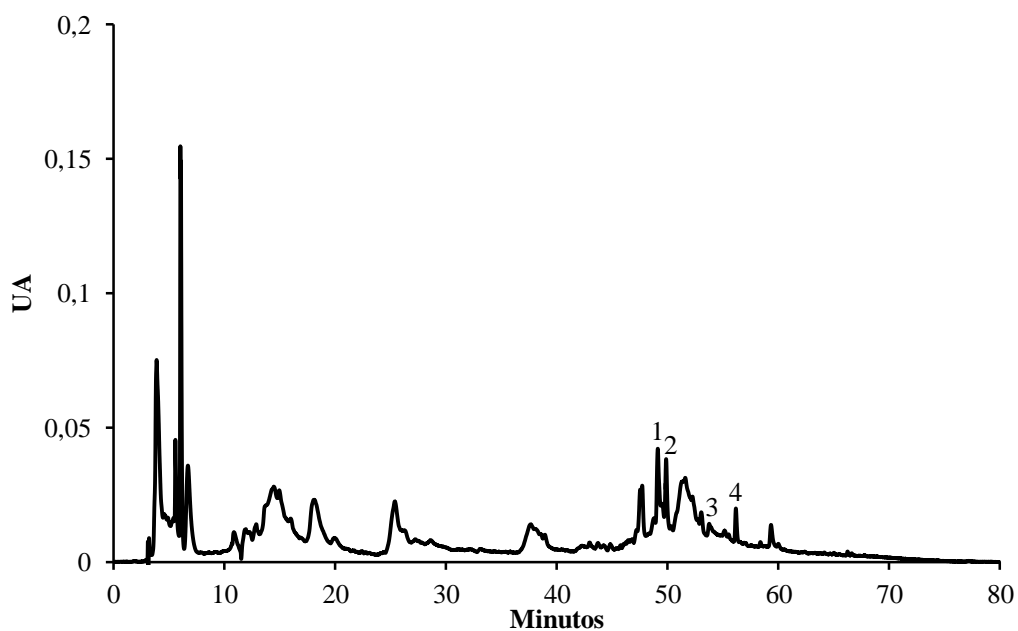
#### 4.1.1.1.1. Perfil de isoflavonas

Em todos os rebentos analisados foram identificadas duas agliconas – daidzeína e genisteína – e dois derivados glicosilados – daidzina e genistina (Figuras 14 a 16). Todos estes compostos estavam já descritos em rebentos de *G. max* (Mazur *et al.*, 1998; Orhan *et al.*, 2007; Devi *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2006; Shi *et al.*, 2010). Mazur *et al.* (1998) identificaram também a daidzeína e a genisteína em rebentos de *M. sativa* e em semente de *V. radiata*.

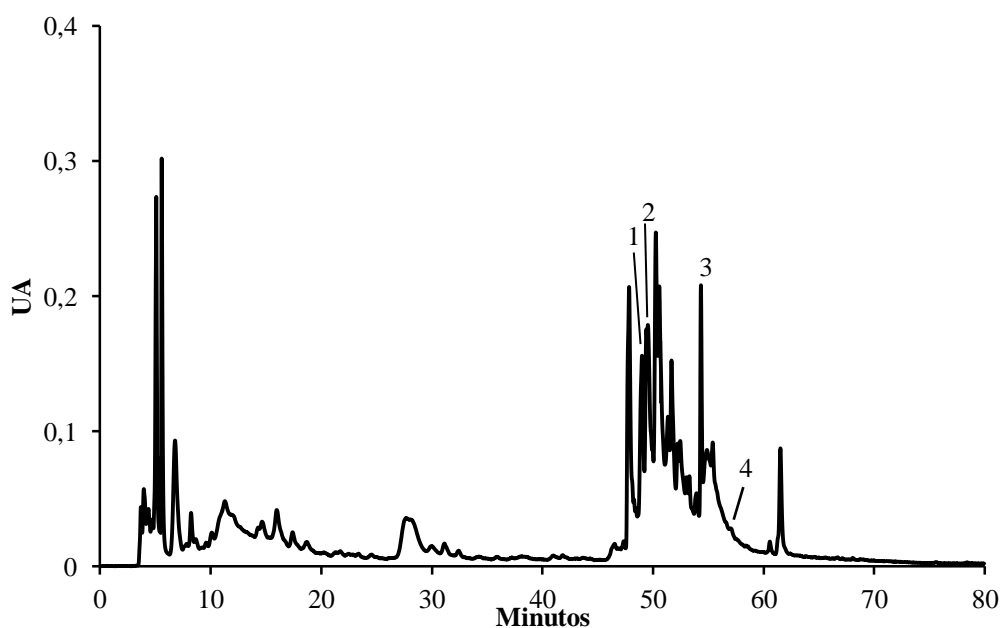
Para avaliar a recuperação de isoflavonas pelo método utilizado, alíquotas de uma solução padrão de genistina foram tratadas e quantificadas por HPLC/DAD da mesma forma que a amostra, tendo-se obtido uma recuperação de  $87 \pm 1,5\%$ .



**Figura 14.** Perfil cromatográfico das isoflavonas de rebentos de *G. max* obtido por HPLC/DAD. Detecção a 260 nm. (1) daidzina; (2) genistina; (3) daidzeína; (4) genisteína.



**Figura 15.** Perfil cromatográfico das isoflavonas de rebentos de *V. radiata* obtido por HPLC/DAD. Detecção a 260 nm. (1) daidzina; (2) genistina; (3) daidzeína; (4) genisteína.



**Figura 16.** Perfil cromatográfico das isoflavonas de rebentos de *M. sativa* obtido por HPLC/DAD. Detecção a 260 nm. (1) daidzina; (2) genistina; (3) daidzeína; (4) genisteína.

Os rebentos de *M. sativa* são os mais ricos neste tipo de compostos (814,5 mg/kg), seguidos pelos rebentos de soja (624,8 mg/kg), reconhecidos como fonte de isoflavonas, e pelos rebentos de *V. radiata*, que apresentaram teores mais baixos (278,5 mg/kg) (Tabela 3). A daidzina é o composto maioritário em todas as amostras.

**Tabela 3.** Isoflavonas em rebentos de *G. max*, *V. radiata* e *M. sativa* (mg/kg).<sup>1</sup>

Isoflavonas	<i>Glycine max</i>	<i>Vigna radiata</i>	<i>Medicago sativa</i>
Daidzina	556,4 ± 12,8	187,8 ± 10,9 <sup>b</sup>	664,3 ± 0,4 <sup>b</sup>
Genistina	52,9 ± 2,4	48,7 ± 5,1 <sup>a</sup>	123,7 ± 0,4 <sup>b</sup>
Daidzeína	9,8 ± 0,4	26,3 ± 1,1 <sup>b</sup>	18,9 ± 0,1 <sup>b</sup>
Genisteína	5,7 ± 0,1	15,7 ± 0,4 <sup>b</sup>	7,6 ± 0,1 <sup>b</sup>
Σ	<b>624,8</b>	<b>278,5</b>	<b>814,5</b>

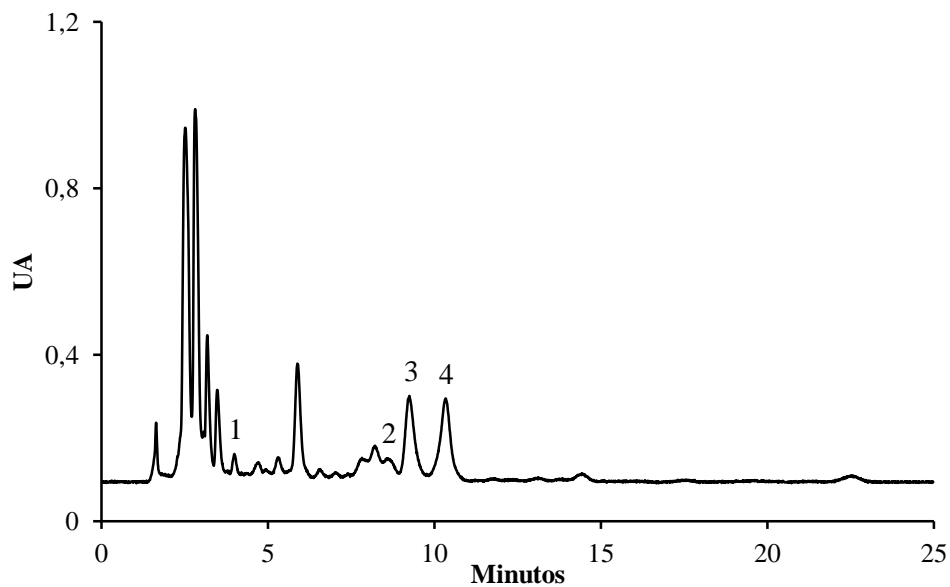
<sup>1</sup> Valores são expressos em média ± desvio padrão de três determinações; Σ Soma das isoflavonas determinadas. <sup>a</sup> Em comparação com a amostra de *G. max* as diferenças não são significativas ( $p > 0,05$ ). <sup>b</sup> Em comparação com a amostra de *G. max* existem diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ).

Para além das já reconhecidas propriedades antioxidantes das isoflavonas, a daidzina também tem sido investigada como anti-dipsotrópico, isto é, como princípio activo no tratamento do alcoolismo, reduzindo o consumo de álcool em testes laboratoriais efectuados em animais (Gao *et al.*, 2003).

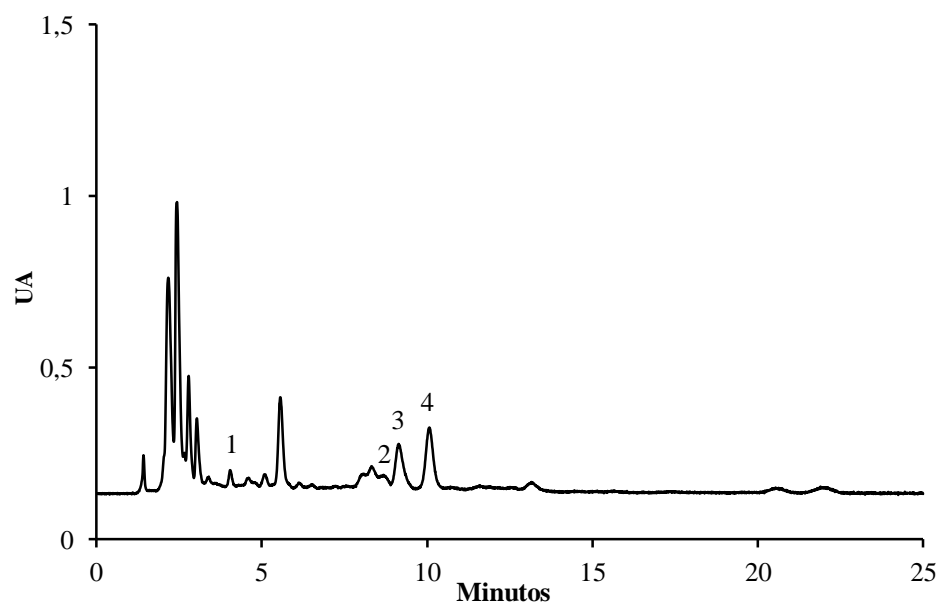
#### 4.1.1.2. Perfil de fitosteróis

A análise de fitosteróis em rebentos de *G. max*, *V. radiata* e *M. sativa* foi efectuada em extractos obtidos após hidrólise alcalina, dado que esta apresentou melhores resultados em comparação com a hidrólise ácida. Para avaliar a recuperação dos fitosteróis alíquotas de uma solução padrão de betulina foram tratadas e quantificadas por HPLC/DAD da mesma forma que a amostra, tendo-se obtido uma recuperação de 81±0,2%.

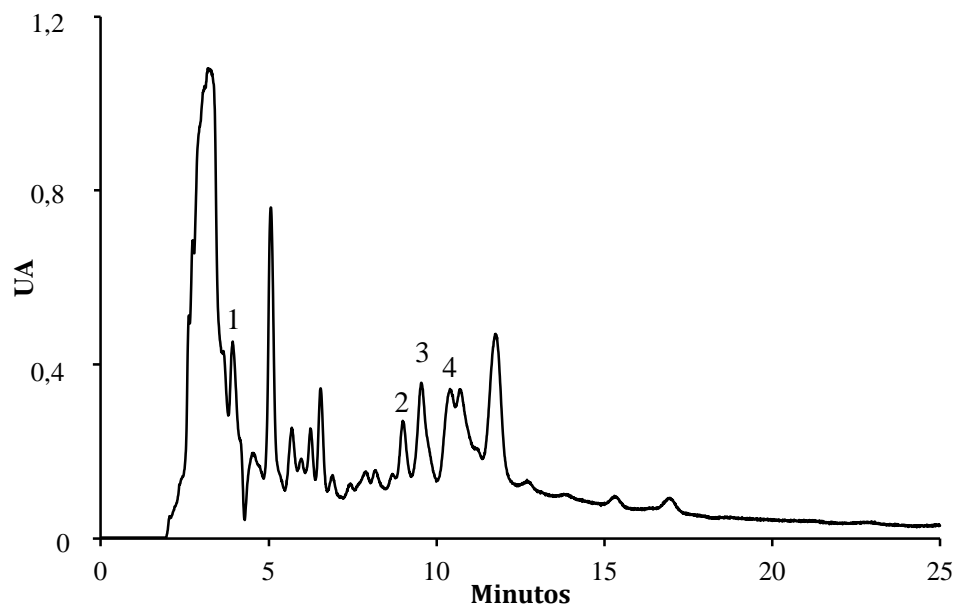
Em todas as amostras analisadas foram identificados quatro compostos: betulina, estigmasterol, campesterol e  $\beta$ -sitosterol (Figuras 17 a 19). Shi *et al.* (2010) descreveram a existência de  $\beta$ -sitosterol, campesterol e estigmasterol em rebentos de soja. Em sementes e rebentos de *M. sativa* estavam já identificados  $\beta$ -sitosterol, campesterol e estigmasterol (Pironen *et al.*, 2003). Geuns (1973) demonstrou a presença dos mesmos três compostos em rebentos de *V. radiata* com 5 dias de crescimento. A betulina foi descrita pela primeira vez em todas as amostras neste trabalho.



**Figura 17.** Perfil cromatográfico dos fitosteróis no extracto hidrolisado de rebentos de *G. max* obtido por HPLC/DAD. Detecção a 205 nm. (1) betulina; (2) estigmasterol; (3) campesterol; (4)  $\beta$ -sitosterol.



**Figura 18.** Perfil cromatográfico dos fitosteróis no extracto hidrolisado de rebentos de *V. radiata* obtido por HPLC/DAD. Detecção a 205 nm. (1) betulina; (2) estigmasterol; (3) campesterol; (4)  $\beta$ -sitosterol.



**Figura 19.** Perfil cromatográfico dos fitosteróis no extracto hidrolisado de rebentos de *M. sativa* obtido por HPLC/DAD. Detecção a 205 nm. (1) betulina; (2) estigmasterol; (3) campesterol; (4)  $\beta$ -sitosterol.

Analisando os resultados obtidos em termos quantitativos (Tabela 4), verificou-se que a amostra de rebentos mais rica neste tipo de compostos é a de *V. radiata* (227,0 mg/kg), seguida da *M. sativa* (160,4 mg/kg) e, com menor conteúdo, a de *G. max* (140,9 mg/kg). O composto maioritário em todas as amostras é o campesterol, representando 56, 45 e 44% dos fitosteróis de *V. radiata*, *G. max* e *M. sativa*, respectivamente.

**Tabela 4.** Fitosteróis em rebentos de *G. max*, *V. radiata* e *M. sativa* (mg/kg) <sup>1</sup>.

Fitosteróis	<i>Glycine max</i>	<i>Vigna radiata</i>	<i>Medicago sativa</i>
Betulina	61,5 ± 0,3	77,5 ± 0,4 <sup>b</sup>	62,8 ± 0,5 <sup>b</sup>
Estigmasterol	3,5 ± 0,3	3,7 ± 0,3 <sup>a</sup>	3,2 ± 0,3 <sup>a</sup>
Campesterol	63,1 ± 0,1	127,5 ± 0,3 <sup>b</sup>	70,4 ± 0,3 <sup>b</sup>
$\beta$ -Sitosterol	12,8 ± 0,3	18,3 ± 0,6 <sup>b</sup>	24,0 ± 0,3 <sup>b</sup>
$\Sigma$	<b>140,9</b>	<b>227,0</b>	<b>160,4</b>

<sup>1</sup> Os valores são expressos em média ± desvio padrão de três determinações;  $\Sigma$  soma dos fitosteróis determinados. <sup>a</sup> Em comparação com a amostra de *G. max* as diferenças não são significativas ( $p > 0,05$ ). <sup>b</sup> Em comparação com a amostra de *G. max* existem diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ).

Os resultados obtidos eram de certo modo esperados, atendendo a que o campesterol é um dos mais abundantes fitosteróis identificados em plantas (Fernandes & Cabral, 2007), sendo aquele que apresenta uma maior percentagem de absorção ao nível do

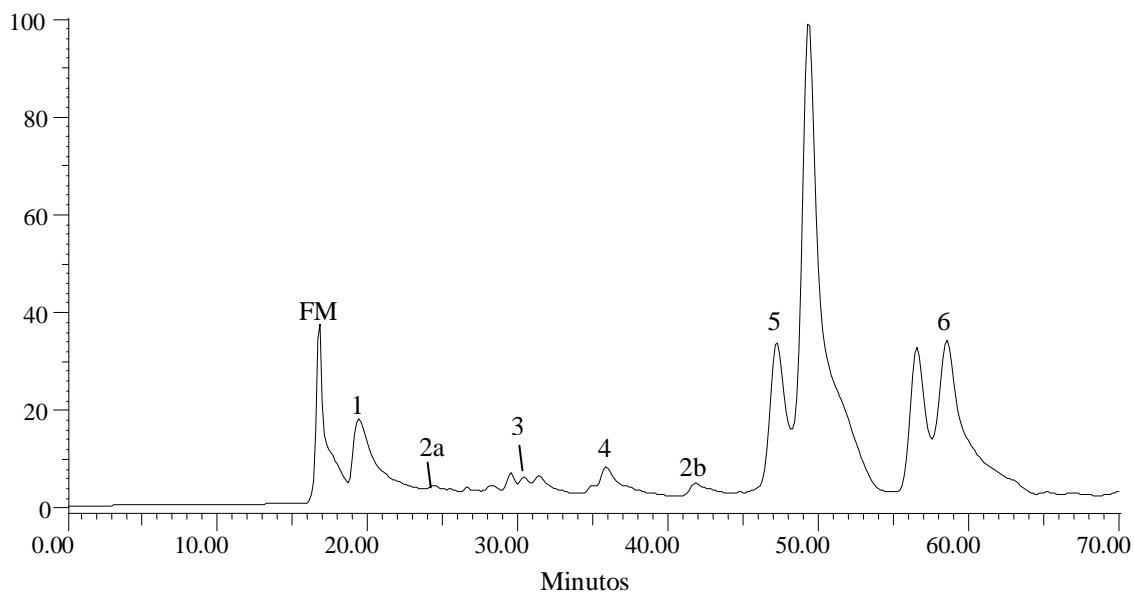
intestino (Piironen *et al.*, 2000). Este composto é um dos fitosteróis mais eficientes na redução da permeabilidade da bicamada fosfolipídica das membranas e na regulação da fluidez da membrana (Piironen *et al.*, 2000). Para além dos benefícios dos fitosteróis para a saúde, o campesterol demonstrou ter uma forte actividade antifúngica contra *Candida albicans* (Singh *et al.*, 2011).

O segundo fitoesterol em maior quantidade nos rebentos é a betulina, correspondendo a 43, 39 e 34% dos compostos de *G. max*, *M. sativa* e *V. radiata*, respectivamente. A betulina pode ser facilmente convertida em ácido betulínico, o qual possui um largo espectro de actividades biológicas e farmacológicas, nomeadamente uma excelente actividade anti-cancerígena e anti-HIV (Sami *et al.*, 2006).

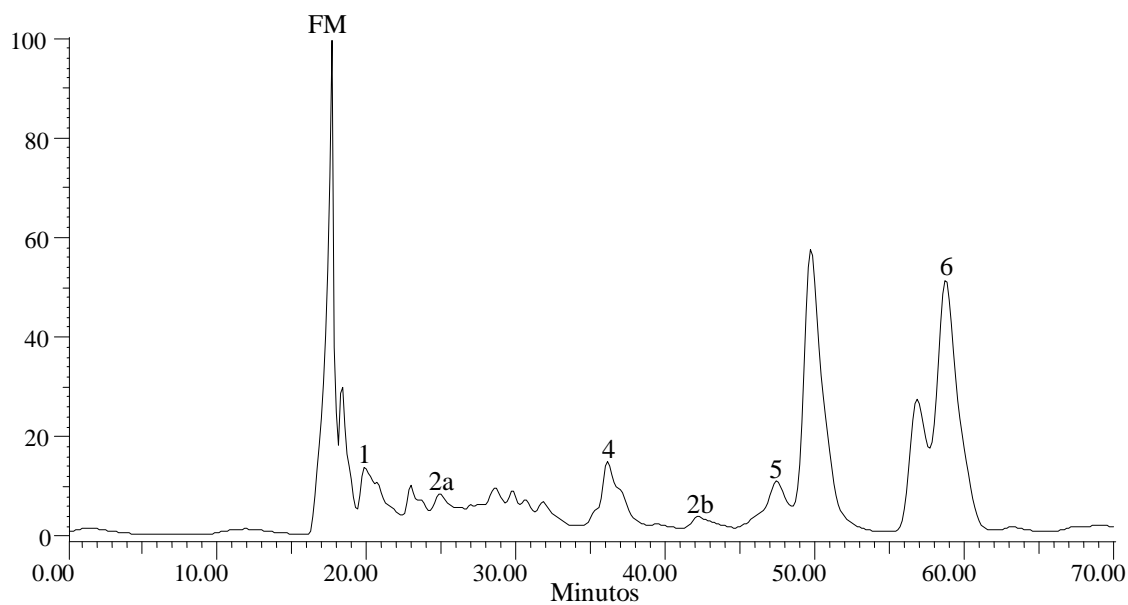
#### 4.1.1.3. Perfil de ácidos orgânicos

Por serem compostos naturais com potencial conservante, antioxidante, aromático e acidificante e, paralelamente, de custo reduzido, os ácidos orgânicos são considerados uma boa opção e muito utilizados na indústria de processamento de fruta (Raybaudi-Massilia *et al.*, 2009).

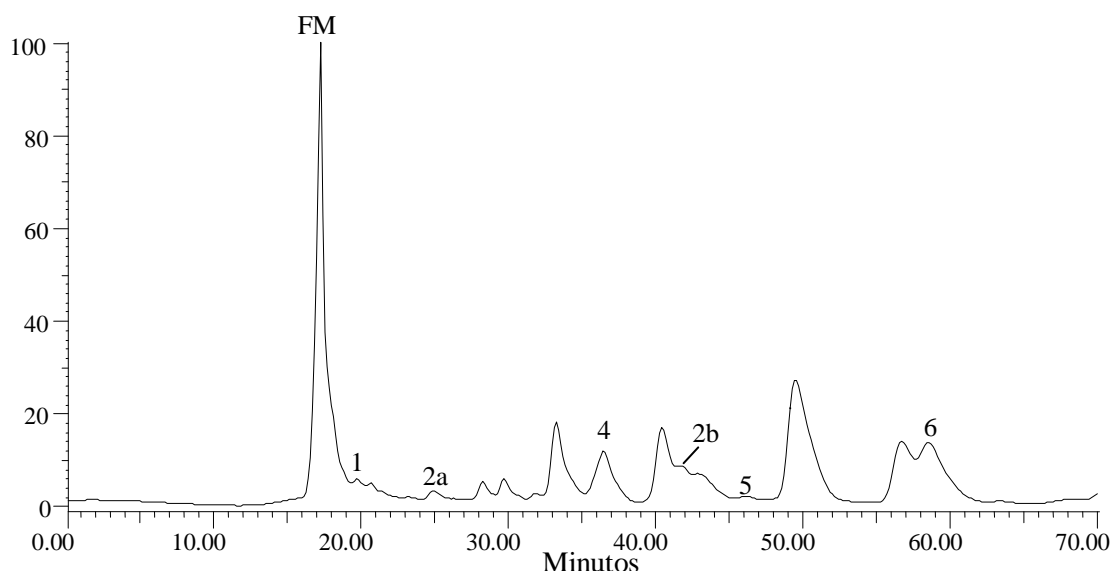
As diversas amostras apresentaram um perfil cromatográfico semelhante, tendo sido identificados em todos os rebentos os ácidos oxálico, málico, quínico, succínico, fumárico, cítrico e aconítico (Figuras 20 a 22). O ácido cítrico foi identificado apenas nos rebentos de *G. max*. Para avaliar a recuperação dos ácidos orgânicos alíquotas de uma solução padrão de ácido fumárico foram tratadas e quantificadas por HPLC/UV da mesma forma que a amostra, tendo-se obtido uma recuperação de  $88 \pm 0,8\%$ .



**Figura 20.** Perfil cromatográfico dos ácidos orgânicos de rebentos de *G. max* obtido por HPLC/UV. Detecção a 214 nm. (FM) Fase móvel; (1) ácido oxálico; (2a) ácido *cis*-aconítico; (2b) ácido *trans*-aconítico; (3) ácido cítrico; (4) ácido málico + quínico; (5) ácido succínico; (6) ácido fumárico.



**Figura 21.** Perfil cromatográfico dos ácidos orgânicos de rebentos de *V. radiata* obtido por HPLC/UV. Detecção a 214 nm. (FM) Fase móvel; (1) ácido oxálico; (2a) ácido *cis*-aconítico; (2b) ácido *trans*-aconítico; (4) ácido málico + quínico; (5) ácido succínico; (6) ácido fumárico.



**Figura 22.** Perfil cromatográfico dos ácidos orgânicos de rebentos de *M. sativa* obtido por HPLC/UV. Detecção a 214 nm. (FM) Fase móvel; (1) ácido oxálico; (2a) ácido *cis*-aconítico; (2b) ácido *trans*-aconítico; (4) ácido málico + quínico; (5) ácido succínico; (6) ácido fumárico.

Tanto quanto sabemos, a composição em ácidos orgânicos de rebentos de *M. sativa* e *G. max* foi descrita pela primeira vez neste trabalho. No entanto, num estudo realizado por Couto *et al.* (2011) em folhas de *G. max* foram descritos todos estes compostos, excepto o ácido quínico. Formigoni *et al.* (2003) descreveram a presença dos ácidos málico, fumárico e aconítico em plantas de *M. sativa*, sendo o primeiro o maioritário. No caso da *V. radiata*, os ácidos fumárico e málico já tinham sido encontrados nos seus rebentos (Jom *et al.*, 2010). Com a excepção do ácido quínico, identificado aqui pela primeira vez, todos os outros já tinham sido reportados nas suas sementes (Jom *et al.*, 2010).

Em termos quantitativos, os rebentos de *V. radiata* foram os que apresentaram maior quantidade destes compostos (208,7 g/kg), sendo essa próxima da contida nos de *M. sativa* (205,5 g/kg), e muito superior à encontrada nos de *G. max* (96,7 g/kg) (Tabela 5).

**Tabela 5.** Ácidos orgânicos em rebentos de *G. max*, *V. radiata* e *M. sativa* (mg/kg) <sup>1</sup>.

Ácidos Orgânicos	<i>Glycine max</i>	<i>Vigna radiata</i>	<i>Medicago sativa</i>
<b>Oxálico</b>	2730,4 ± 13,2	20427,8 ± 98,7 <sup>a</sup>	1336,6 ± 6,5 <sup>a</sup>
<b>Málico + Quínico</b>	18974,4 ± 187,3	114270,2 ± 1128,0 <sup>a</sup>	176324,9 ± 1740,5 <sup>a</sup>
<b>Succínico</b>	54928,2 ± 111,1	29723,6 ± 60,1 <sup>a</sup>	4272,1 ± 8,7 <sup>a</sup>
<b>Fumárico</b>	14869,2 ± 174,0	44110,6 ± 516,0 <sup>a</sup>	23168,4 ± 271,0 <sup>a</sup>
<b>Cítrico</b>	5113,5 ± 201,1	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>
<b>Aconítico</b>	50,5 ± 0,8	200,9 ± 3,2 <sup>a</sup>	438,5 ± 7,0 <sup>a</sup>
<b>Σ</b>	<b>96666,2</b>	<b>208733,1</b>	<b>205540,5</b>

<sup>1</sup> Os valores são expressos em média ± desvio padrão de três determinações; Σ soma dos ácidos orgânicos determinados; nd: Não detectado. <sup>a</sup> Em comparação com a amostra de *G. max* existem diferenças significativas (p ≤ 0,05).



Nos rebentos de *G. max* o principal composto é o ácido succínico, representando 57% do total de ácidos orgânicos identificados nesta matriz. O par composto pelos ácidos málico e quínico é maioritário nos rebentos de *V. radiata* e *M. sativa*, correspondendo, respectivamente, a 55 e 86%. O composto minoritário em todas as amostras analisadas é o ácido aconítico, correspondendo a 0,05% em *G. max*, 0,10% em *V. radiata* e 0,21% em *M. sativa*.

Para além de ser reconhecido pela sua actividade antioxidante (Gil *et al.*, 2000), o ácido málico é um bom agente antimicrobiano contra várias bactérias, tais como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* e *E. coli* (Raybaudi-Massilia *et al.*, 2009).

O ácido succínico tem um grande uso industrial, nomeadamente na produção de alimentos, fármacos, surfactantes e detergentes, solventes verdes, plásticos biodegradáveis e estimulantes do crescimento animal e vegetal (Zeikus *et al.*, 1999).

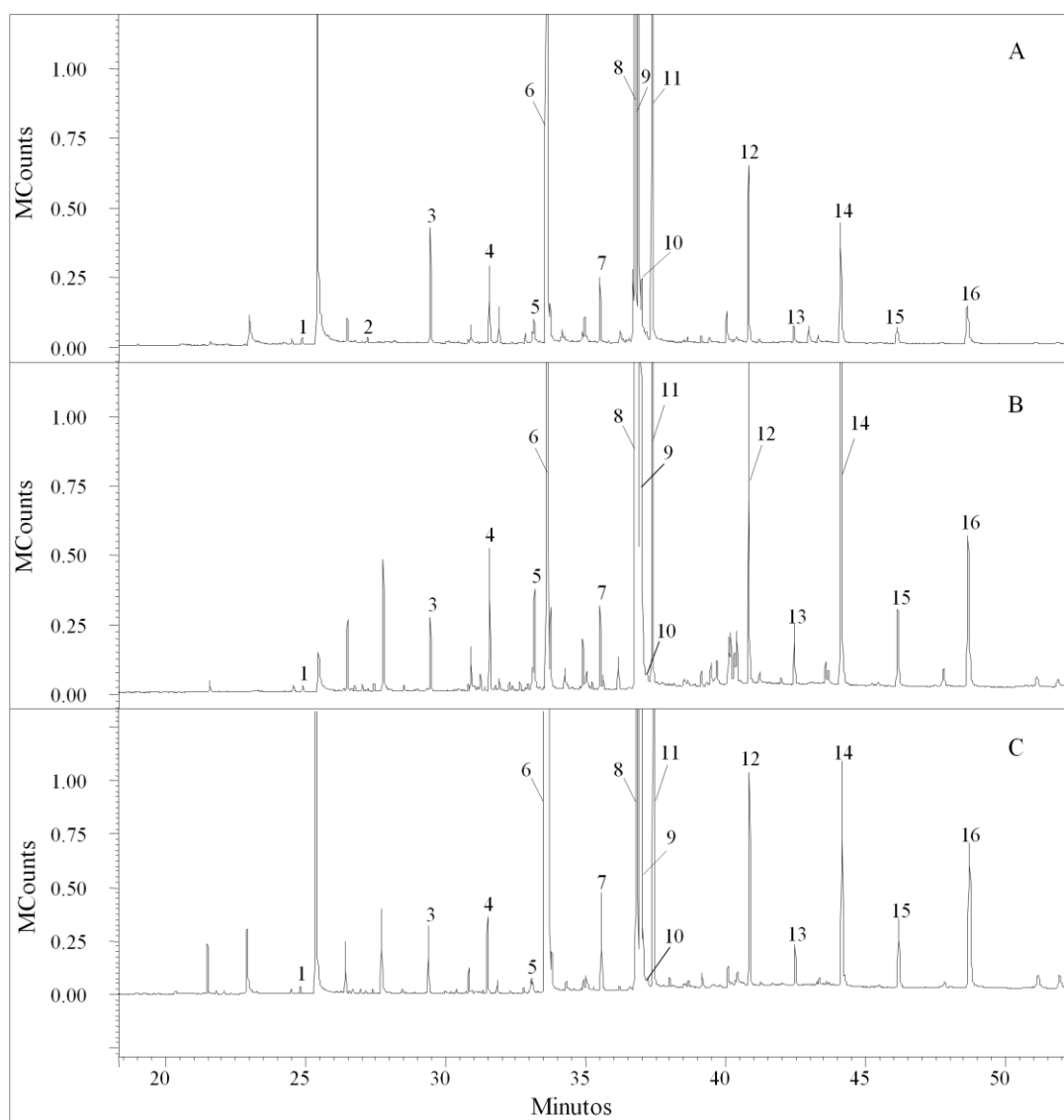
O ácido fumárico possui actividade antimicrobiana contra bactérias Gram (+) (*S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Bacillus cereus*), sendo um dos ácidos orgânicos mais activos (Taveira *et al.*, 2010). Derivados deste ácido orgânico, como o fumarato de monoetilo e fumarato de dimetilo, provaram ser seguros e eficazes no tratamento de psoríase (Mrowietz *et al.*, 1999).

#### 4.1.1.4. Perfil de ácidos gordos

A análise por GC-MS permitiu a identificação de 16 ácidos gordos nos rebentos de *G. max* e 15 nos de *V. radiata* e de *M. sativa*: ácidos láurico (C12:0), mirístico (C14:0), pentadecanóico (C15:0), palmítico (C16:0), palmitoleico (C16:1), heptadecanóico (C17:0), esteárico (C18:0), oleico (C18:1c), elaídico (C18:1t), linoleico (C18:2), araquídico (C20:0), heneicosanóico (C21:0), beénico (C22:0), tricosanóico (C23:0) e lignocérico (C24:0); o ácido tridecanóico (C13:0) foi encontrado apenas nos rebentos de *G. max* (Figura 23).

As sementes de *G. max* e de *V. radiata* estão descritas como fontes importantes de óleo vegetal (Anwar *et al.*, 2007; Dhakal *et al.*, 2009). Nos estudos realizados por Orhan *et al.* (2007) e Dhakal *et al.* (2009) foram reportados os ácidos palmítico, esteárico, oleico, linoleico, beénico e palmitoleico em rebentos de *G. max*. No que concerne aos rebentos

de *V. radiata* foram descritos anteriormente os ácidos palmítico, esteárico e heneicosanóico (Jom *et al.*, 2010). No entanto, em estudos com sementes desta espécie, para além destes compostos foram identificados os ácidos mirístico, oleico, linoleico e araquídico (Anwar *et al.*, 2007). No que diz respeito à *M. sativa*, embora nas raízes já tenham sido encontrados os ácidos mirístico, pentadecanóico, palmítico, palmitoleico, esteárico, oleico e linoleico (Gerloff *et al.*, 1966), é a primeira vez que estes são identificados nos seus rebentos. Adicionalmente, neste estudo é descrita pela primeira vez a presença dos ácidos láurico, heptadecanóico, elaídico, araquídico, heneicosanóico, beénico, tricosanóico e lignocérico em *M. sativa*.



**Figura 23.** Perfil cromatográfico dos ácidos gordos de rebentos de *G. max* (A), *V. radiata* (B) e *M. sativa* (C) obtido por GC-MS. (1) ácido láurico, (2) ácido tridecanóico, (3) ácido mirístico, (4) ácido pentadecanóico, (5) ácido palmitoleico, (6) ácido palmítico, (7) ácido heptadecanóico, (8) ácido linoleico, (9) ácido oleico, (10) ácido elaídico (11) ácido esteárico, (12) ácido araquídico, (13) ácido heneicosanóico, (14) ácido beénico, (15) ácido tricosanóico, (16) ácido lignocérico.

Para avaliar a recuperação dos ácidos gordos, alíquotas de uma solução padrão de ácido oleico foram tratadas e quantificadas por GC-MS da mesma forma que a amostra, tendo-se obtido uma recuperação de  $72 \pm 0,7\%$ .

As curvas de calibração utilizadas para a quantificação de cada um dos compostos foram obtidas a partir de soluções padrão (5 concentrações diferentes) e encontram-se na Tabela 6. Os resultados obtidos mostram uma boa correlação ( $R^2 \geq 0,9930$ ). Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) para cada um dos compostos também são apresentados na Tabela 6.

**Tabela 6.** Parâmetros de validação do método usado na determinação de ácidos gordos livres em rebentos de *G. max*, *V. radiata* e *M. sativa* e seu conteúdo nas amostras.

Ácidos gordos <sup>A</sup>	Equações de regressão	R <sup>2</sup>	LD <sup>E</sup> (mg/L)	LQ <sup>F</sup> (mg/L)	Repetibilidade (CV %) <sup>G</sup>	Precisão intermédia (CV %) <sup>G</sup>	<i>Glycine max</i> (mg/kg) <sup>H</sup>	<i>Vigna radiata</i> (mg/kg) <sup>H</sup>	<i>Medicago sativa</i> (mg/kg) <sup>H</sup>
<b>C12:0</b>	y=29946x-339,65	0,9997	0,019	0,062	7,53	12,64	8,5 ± 0,8	3,7 ± 0,2 <sup>b</sup>	2,8 ± 0,2 <sup>b</sup>
<b>C13:0</b>	y=33536x-717,4	0,9980	0,017	0,055	5,88	8,21	3,2 ± 0,3	nd <sup>b</sup>	nd <sup>b</sup>
<b>C14:0</b>	y=34968x-407,1	0,9998	0,016	0,053	3,43	4,51	64,4 ± 1,9	27,6 ± 1,0 <sup>b</sup>	37,3 ± 2,5 <sup>b</sup>
<b>C15:0</b>	y=41478x-1075,9	0,9947	0,013	0,045	3,11	3,58	61,4 ± 1,8	41,5 ± 2,5 <sup>b</sup>	70,4 ± 3,9 <sup>b</sup>
<b>C16:0</b>	y=69568x-5994,2	0,9980	0,010	0,032	6,38	8,61	729,8 ± 44,1	431,9 ± 27,3 <sup>b</sup>	485,2 ± 43,7 <sup>b</sup>
<b>C16:1</b>	y=58010x-3651,1	0,9952	0,008	0,027	2,98	4,30	14,6 ± 1,2	23,1 ± 1,6 <sup>b</sup>	30,0 ± 1,6 <sup>b</sup>
<b>C17:0</b>	y=28597x-751,3	0,9964	0,019	0,065	4,51	7,38	121,5 ± 7,7	47,6 ± 4,3 <sup>b</sup>	56,4 ± 1,2 <sup>b</sup>
<b>C18:0</b>	y=41782x-1094,5	0,9933	0,002	0,006	4,20	9,51	633,6 ± 20,6	283,0 ± 21,9 <sup>b</sup>	350,4 ± 33,8 <sup>b</sup>
<b>C18:1c</b>	y=161434x-5193,8	0,9994	0,003	0,011	2,67	8,71	340,2 ± 5,5	272,7 ± 25,8 <sup>b</sup>	350,3 ± 3,5 <sup>a</sup>
<b>C18:1t</b>	y=56860x-1589,6	0,9864	0,010	0,033	2,46	5,81	16,3 ± 1,3	24,5 ± 1,2 <sup>b</sup>	27,0 ± 1,5 <sup>b</sup>
<b>C18:2</b>	y=315587x+5906,3	0,9974	0,006	0,019	3,34	6,65	153,4 ± 6,9	158,1 ± 14,1 <sup>a</sup>	294,7 ± 9,3 <sup>b</sup>
<b>C20:0</b>	y=43010x-641,3	0,9967	0,013	0,043	5,00	8,85	184,1 ± 3,4	74,4 ± 5,2 <sup>b</sup>	181,7 ± 7,0 <sup>a</sup>
<b>C21:0</b>	y=42367x-1421,4	0,9930	0,013	0,044	4,61	10,30	33,8 ± 0,1	18,9 ± 1,6 <sup>b</sup>	34,5 ± 2,6 <sup>a</sup>
<b>C22:0</b>	y=47023x-2643,2	0,9965	0,012	0,039	1,90	7,94	206,9 ± 3,7	122,0 ± 11,6 <sup>b</sup>	259,0 ± 22,5 <sup>b</sup>
<b>C23:0</b>	y=40762x-1670,4	0,9930	0,014	0,045	5,97	8,75	86,6 ± 4,0	42,0 ± 4,2 <sup>b</sup>	70,1 ± 4,8 <sup>b</sup>
<b>C24:0</b>	y=84071x-3003,9	0,9945	0,007	0,022	4,81	5,53	116,7 ± 4,4	54,1 ± 2,3 <sup>b</sup>	74,8 ± 3,0 <sup>b</sup>
<b>Total</b>							<b>2775,0</b>	<b>1625,1</b>	<b>2324,6</b>
<b>SFA<sup>B</sup></b>							<b>2250,5</b>	<b>1146,7</b>	<b>1622,6</b>
<b>MUFA<sup>C</sup></b>							<b>354,8</b>	<b>295,8</b>	<b>380,3</b>
<b>PUFA<sup>D</sup></b>							<b>169,7</b>	<b>182,6</b>	<b>321,7</b>

<sup>A</sup> C12:0, ácido láurico; C13:0, ácido tridecanóico; C14:0, ácido mirístico; C15:0, ácido pentadecanóico; C16:0, ácido palmítico; C16:1, ácido palmitoleico; C17:0, ácido heptadecanóico; C18:0, ácido esteárico; C18:1c, ácido oleico; C18:1t, ácido eláidico; C18:2, ácido linoleico; C20:0, ácido araquídico; C21:0, ácido heneicosanóico; C22:0, ácido beénico; C23:0, ácido tricosanóico; C24:0, ácido lignocérico. <sup>B</sup> SFA, ácidos gordos saturados. <sup>C</sup> MUFA, ácidos gordos monoinsaturados. <sup>D</sup> PUFA, Ácidos gordos polinsaturados. <sup>E</sup> LD, limite de detecção. <sup>F</sup> LQ, limite de quantificação. <sup>G</sup> CV, coeficiente de variação. <sup>H</sup> Resultados são expressos em média ± desvio padrão de três determinações. <sup>a</sup> Em comparação com a amostra de *G. max* as diferenças não são significativas (p>0,05). <sup>b</sup> Em comparação com a amostra de *G. max* existem diferenças significativas (p≤0,05).

A repetibilidade do método analítico foi avaliada através de 5 determinações da mesma amostra de rebentos de *G. max* realizadas no mesmo dia. A repetibilidade é boa, uma vez que os coeficientes de variação apresentaram valores inferiores a 8%. A precisão intermédia foi determinada através da análise de uma amostra de rebentos de *G. max* em 5 dias diferentes. Os coeficientes de variação obtidos estão discriminados na Tabela 6. Todos os valores obtidos são inferiores a 13%, verificando-se que o método utilizado é preciso para a matriz em estudo.

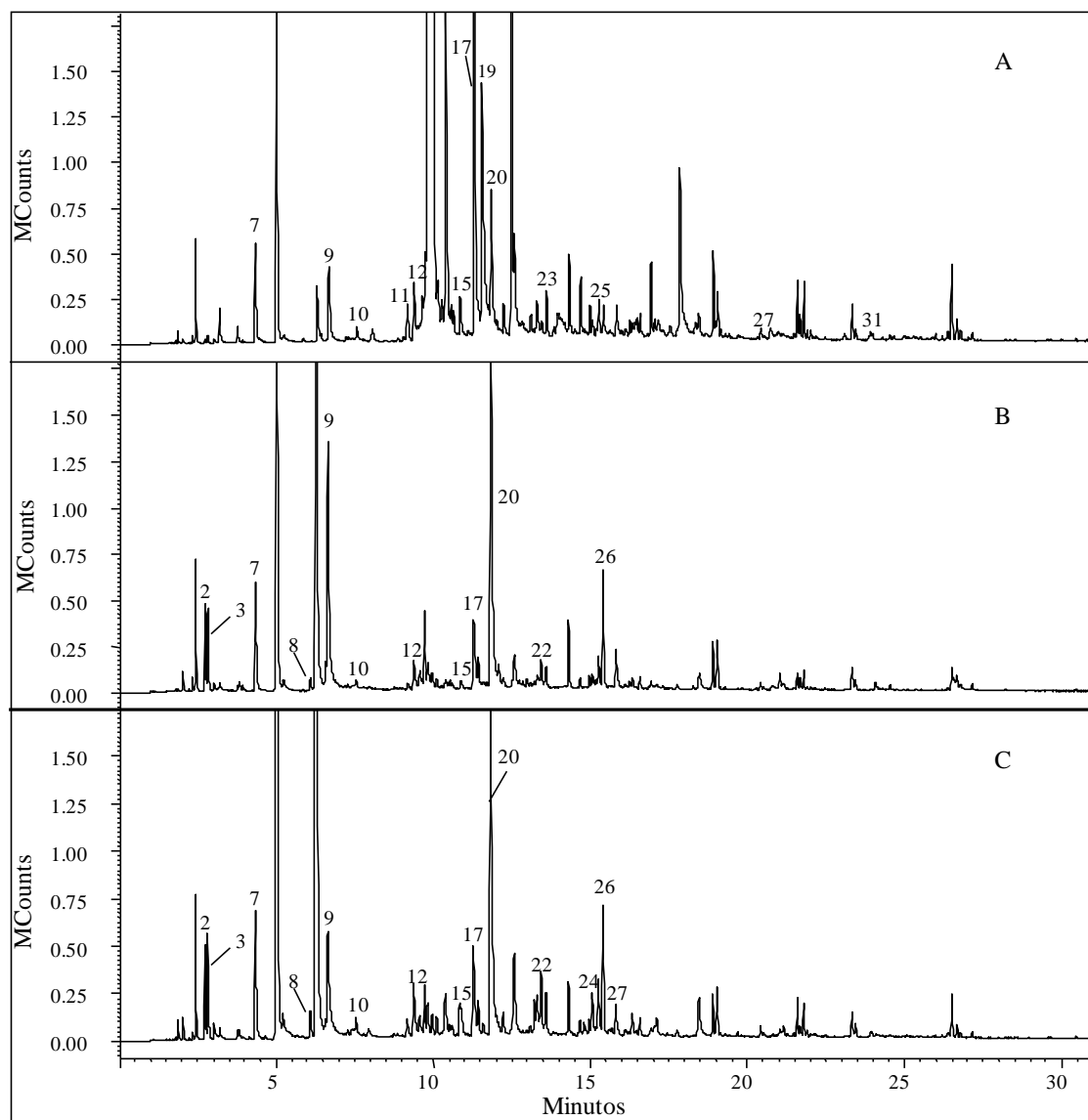
Todos os rebentos são essencialmente constituídos por SFA: 81, 71 e 69% do total de ácidos gordos determinados em *G. max*, *V. radiata* e *M. sativa*, respectivamente. Relativamente aos conteúdos em ácidos gordos insaturados, os MUFA correspondem a 13% em *G. max*, 18% em *V. radiata* e 16% em *M. sativa*, enquanto os PUFA representam 6, 11 e 14%, respectivamente.

Do ponto de vista quantitativo, a *G. max* revelou originar rebentos com maior quantidade de ácidos gordos (2775,0 mg/kg), seguida de *M. sativa* (2324,6 mg/kg) e de *V. radiata* (1635,1 mg/kg). Em todos os rebentos o ácido palmítico é o principal ácido gordo, correspondendo a 26% do total de ácidos gordos de *G. max* e de *V. radiata* e 21% do de *M. sativa*. Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores que descreveram este ácido como maioritário em rebentos de *G. max* (Orhan *et al.*, 2007) e de *V. radiata* (Jom *et al.*, 2010).

O ácido palmítico demonstrou possuir potencial antimicrobiano contra estirpes de *S. aureus* resistentes à metilina, *Helicobacter pylori* e *Streptococcus pyogenes*, embora os ácidos gordos saturados de cadeia longa sejam menos efectivos que os ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa (Zheng *et al.*, 2005).

#### 4.1.1.5. Perfil de compostos voláteis

Foram identificados 31 compostos voláteis nos rebentos de *G. max*, *V. radiata* e *M. sativa* por HS-SPME/GC-MS. Estes compostos pertencem a classes diferentes: 12 aldeídos, 7 álcoois, 1 cetona, 1 éster, 3 monoterpenos, 2 norisoprenóides, 2 compostos com enxofre e 3 compostos de outras classes (Figura 24).



**Figura 24.** Perfil cromatográfico de compostos voláteis de rebentos de (A) *M. sativa*, (B) *V. radiata* e (C) *G. max* obtido por HS-SPME/GC-MS. (2) 3-metil-butanal; (3) 2-metil-butanal; (7) tolueno; (8) (*E*)-2-hexenal; (9) hexanol; (10) heptanal; (11) (*Z*)-2-heptenal; (12) benzaldeído; (15) (*E,E*)-2,4-heptadienal; (17) 2-etil-1-hexanol; (19) álcool benzílico; (20) fenilacetaldeído; (22) linalol; (23) (*E*)-2-nonen-1-ol; (24) (*E,Z*)-2,6-nonadienal; (25) (*E*)-2-nonenal; (26) 2-*sec*-butil-3-metoxipirazina; (27) mentol; (30) eugenol e (31)  $\beta$ -ionona.

Nenhum dos compostos identificados estava descrito em rebentos das espécies estudadas. No entanto, o 3-metil-1-butanol, o 2-metil-1-butanol, o álcool benzílico e o eugenol já tinham sido encontrados nas sementes de *V. radiata* (Lee & Shibamoto, 2000).

Relativamente aos compostos identificados nos rebentos de *M. sativa*, o (*E*)-2-hexenal, o hexanol, o benzaldeído, o álcool benzílico, o fenilacetaldeído e o (*E*)-2-nonenal já

estavam descritos nas flores desta espécie (Buttery *et al.*, 1982) e Core *et al.* (1994) tinham identificado o heptanal, o (Z)-2-heptenal, o (E)-2-nonenal e o  $\beta$ -ciclocitral na sua parte aérea.

No que concerne aos compostos identificados nos rebentos de *G. max* o sulfureto de dimetilo, o 3-metil-1-butanol, o 2-metil-1-butanol, o pentanol, o tolueno, o (E)-2-hexenal, o heptanal, o benzaldeído, o (E,E)-2,4-heptadienal, o octanal, o 2-etil-1-hexanol, o álcool benzílico, o fenilacetaldéido, o (E)-2-octenal, o (E,Z)-2,6-nonadienal e o (E)-2-nonenal já tinham sido descritos nas suas sementes (Lee & Shibamoto, 2000; Boué *et al.*, 2003; Ruth *et al.*, 2005) e o (E)-2-hexenal, o hexanol, o  $\beta$ -ciclocitral e a  $\beta$ -ionona na sua parte aérea (Couto *et al.*, 2011).

De modo geral, todas as amostras exibiram uma diversidade de compostos semelhante. Através da análise da Tabela 7 pode-se concluir que os rebentos mais ricos nestes compostos são os de *M. sativa*, sendo os de *V. radiata* os mais pobres.

**Tabela 7.** Compostos voláteis em rebentos de *G. max*, *V. radiata* e *M. sativa*.

Compostos	RI <sup>1</sup>	ID <sup>2</sup>	QI <sup>3</sup>	A <sup>4</sup> /1000			
				<i>Glycine max</i>	<i>Vigna radiata</i>	<i>Medicago sativa</i>	
<b>Aldeídos</b>							
2	3- Metil-butanal	662	S, MS (72/74)	41/44/58	264,4(0,4)	171,4(2,4) <sup>b</sup>	16,3(0,4) <sup>b</sup>
3	2- Metil-butanal	671	S, MS (80/82)	41/57	260,0(17,5)	240,6(8,4) <sup>a</sup>	27,0(2,5) <sup>b</sup>
8	( <i>E</i> )-2-Hexenal	858	S, MS (84/92)	55/69/83/99	192,4(9,6)	74,1(7,2) <sup>b</sup>	324,6(16,4) <sup>b</sup>
10	Heptanal	902	S, MS (79/83)	55/70/81	57,1(2,9)	20,9(1,3) <sup>b</sup>	21,8(2,4) <sup>b</sup>
11	( <i>Z</i> )-2-Heptenal	965	MS (83/90)	55/83	66,9(5,8)	19,8(1,2) <sup>b</sup>	140,6(14,1) <sup>b</sup>
12	Benzaldeído	972	S, MS (86/88)	77/105	478,0(2,0)	220,5(15,6) <sup>b</sup>	266,3(25,4) <sup>b</sup>
15	( <i>E,E</i> )-2,4-Heptadienal	1002	MS (81/83)	53/81	228,8(0,1)	46,6(4,1) <sup>b</sup>	242,6(15,6) <sup>a</sup>
16	Octanal	1007	S, MS (85/91)	67/81/95	4,4(0,4)	2,6(0,2) <sup>a</sup>	22,7(1,0) <sup>b</sup>
20	Fenilacetaldéido	1053	MS (85/87)	91	2954,0(7,1)	2030,0(192,7) <sup>b</sup>	900,2(83,8) <sup>b</sup>
21	( <i>E</i> )-2-Octenal	1065	S, MS (85/87)	55/70/83	85,7(8,8)	nd <sup>b</sup>	111,0(3,8) <sup>b</sup>
24	( <i>E,Z</i> )-2,6-Nonadienal	1160	S, MS (83/85)	55/70/83	215,5(1,7)	30,4(3,6) <sup>b</sup>	47,1(0,8) <sup>b</sup>
25	( <i>E</i> )-2-Nonenal	1166	MS (86/88)	55/70/83	144,7(1,0)	43,1(4,7) <sup>b</sup>	96,2(8,0) <sup>b</sup>
		Σ			<b>4951,7</b>	<b>2900,0</b>	<b>2216,4</b>
<b>Álcoois</b>							
4	Pentanol	742	S, MS (81/87)	55/70	20,2(0,1)	nd <sup>b</sup>	20,2(4,5) <sup>a</sup>
5	3-Metil-1-butanol	741	S, MS (80/85)	56/71	nd	1,6(0,1) <sup>b</sup>	nd <sup>a</sup>
6	2-Metil-1-butanol	745	S, MS (81/87)	56/70	17,2(0,3)	20,3(2,1) <sup>b</sup>	nd <sup>b</sup>
9	Hexanol	876	S, MS (80/83)	56/69	nd	nd <sup>a</sup>	362,8(14,1) <sup>b</sup>
17	2-Etil-1-hexanol	1034	MS (81/86)	41/57/70	592,3(4,1)	313,0(21,4) <sup>b</sup>	4839,0 (86,6) <sup>b</sup>
19	Álcool benzílico	1043	S, MS (83/84)	79/91/108	nd	nd <sup>a</sup>	2003,0(0,7) <sup>b</sup>
23	( <i>E</i> )-2-Nonen-1-ol	1108	S,MS (83/86)	57/70/82	103,6(0,3)	10,2(0,8) <sup>b</sup>	93,7(2,5) <sup>b</sup>
		Σ			<b>733,3</b>	<b>345,1</b>	<b>7318,7</b>
<b>Cetonas</b>							
14	6-Metil-5-heptene-2-ona	989	S, MS (68/83)	93/108	24,8(1,2)	14,2(3,1) <sup>b</sup>	nd <sup>b</sup>
		Σ			<b>24,8</b>	<b>14,2</b>	<b>0</b>
<b>Ésteres</b>							
28	Etil-octanoato	1198	MS (81/83)	88/101/127	4,6(0,5)	18,0(0,3) <sup>b</sup>	nd <sup>b</sup>
		Σ			<b>4,6</b>	<b>18</b>	<b>0</b>
<b>Monoterpenos</b>							
18	Eucaliptol	1040	S, MS (82/85)	81/93/108	61,2(0,2)	63,7(2,7) <sup>a</sup>	nd <sup>b</sup>
22	Linalol	1102	S, MS (80/81)	57/70/82	56,9(3,2)	2,4(0,2) <sup>b</sup>	21,6(0,7) <sup>b</sup>

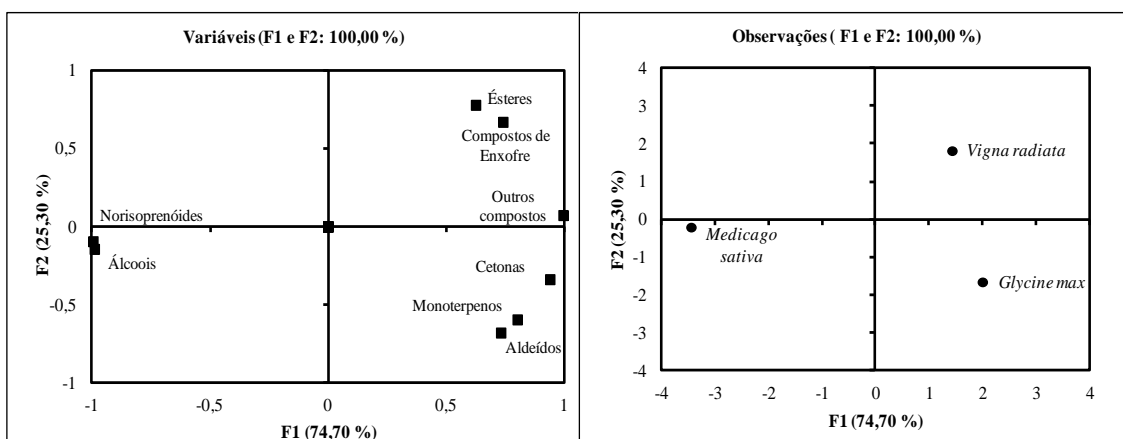
(continua na página seguinte)



Compostos	RI <sup>1</sup>	ID <sup>2</sup>	QI <sup>3</sup>	A <sup>4</sup> /1000		
				<i>Glycine max</i>	<i>Vigna radiata</i>	<i>Medicago sativa</i>
27 Mentol	1184	S, MS (85/88)	81	46,9(2,6)	26,0(2,1) <sup>b</sup>	36,9(2,1) <sup>b</sup>
	Σ			<b>165,0</b>	<b>92,1</b>	<b>58,5</b>
<b>Norisoprenóides</b>						
29 β-Cyclocitral	1215	S, MS (78/82)	109/137/152	nd	nd <sup>a</sup>	33,9(0,0) <sup>b</sup>
31 β-Ionona	1386	S, MS (80/82)	177	nd	nd <sup>a</sup>	28,4(2,6) <sup>b</sup>
	Σ			<b>0</b>	<b>0</b>	<b>62,3</b>
<b>Compostos de enxofre</b>						
1 Sulfureto de dimetilo	553	S, MS (84/90)	63	6,6(0,7)	0,2(0,0) <sup>b</sup>	2,5(0,1) <sup>b</sup>
13 Trissulfureto de dimetilo	977	S, MS (83/88)	79	17,1(2,9)	36,1(0,7) <sup>b</sup>	13,0(0,5) <sup>a</sup>
	Σ			<b>23,7</b>	<b>36,3</b>	<b>15,5</b>
<b>Outros compostos</b>						
7 Tolueno	774	MS (92/92)	91	383,4(28,2)	311,2(18,4) <sup>b</sup>	189,0(14,3) <sup>b</sup>
26 2-sec-Butil-3-metoxipirazina	1171	MS (85/86)	124/138/151	424,6(14,5)	484,9(7,1) <sup>b</sup>	121,8(1,9) <sup>b</sup>
30 Eugenol	1283	S, MS (81/85)	77/131/164	nd	nd <sup>a</sup>	22,8(2,5) <sup>b</sup>
	Σ			<b>808,0</b>	<b>796,1</b>	<b>333,6</b>
	Σ			<b>6711,1</b>	<b>4201,8</b>	<b>10005,0</b>

<sup>1</sup> RI = Índice de retenção. <sup>2</sup> ID = Identificação; S = identificado por comparação com o padrão de referência; MS = Tentativamente identificado através da NIST05. <sup>3</sup> QI = Iões de quantificação. <sup>4</sup> Área expressa como unidade arbitrária; valores de média (desvio padrão) de três determinações; nd = Não detectado. <sup>a</sup> Em comparação com a amostra de *G. max* as diferenças não são significativas (p>0,05). <sup>b</sup> Em comparação com a amostra de *G. max* existem diferenças significativas (p<0,05).

Para analisar a variação dos compostos voláteis nos diferentes rebentos foi efectuada uma PCA. A Figura 25 apresenta a projecção de variáveis, agrupadas por classes químicas, obtidas para os 3 tipos de rebentos no plano composto pelos eixos principais F1 e F2, contendo 100% da variância total.



**Figura 25.** Análise de componentes principais que mostra a dispersão das diferentes classes de compostos voláteis pelos diferentes rebentos.

Os rebentos de *G. max* estão projectados no plano formado pelos eixos F1 positivo e F2 negativo devido à sua alta concentração em aldeídos, cetonas e monoterpenos (Figura 25), sendo os compostos maioritários de cada uma das classes o fenilacetaldéido, 6-metil-5-heptene-3-ona e eucaliptol, respectivamente.

O fenilacetaldéido apresenta potencial para atrair lepidópteros de ambos os sexos, sendo por isso utilizado em sistemas agrícolas, na monitorização (presença/ausência) ou na amostragem de lepidópteros. Este composto é incorporado em armadilhas, atraindo os lepidópteros, diminuindo assim o número de indivíduos que atacam os campos de cultivo. Os dispositivos que utilizam este composto mostraram ser mais eficazes do que as armadilhas com insecticida (Meagher, 2001).

O eucaliptol é um composto utilizado na indústria farmacêutica de variadas formas, designadamente como agente de aumento da penetração cutânea, descongestionante e antitússico. Além destas aplicações, ainda é benéfico no tratamento da sinusite, bronquite, reumatismo e em aromaterapia como estimulante da pele (Santos e Rao, 2000).

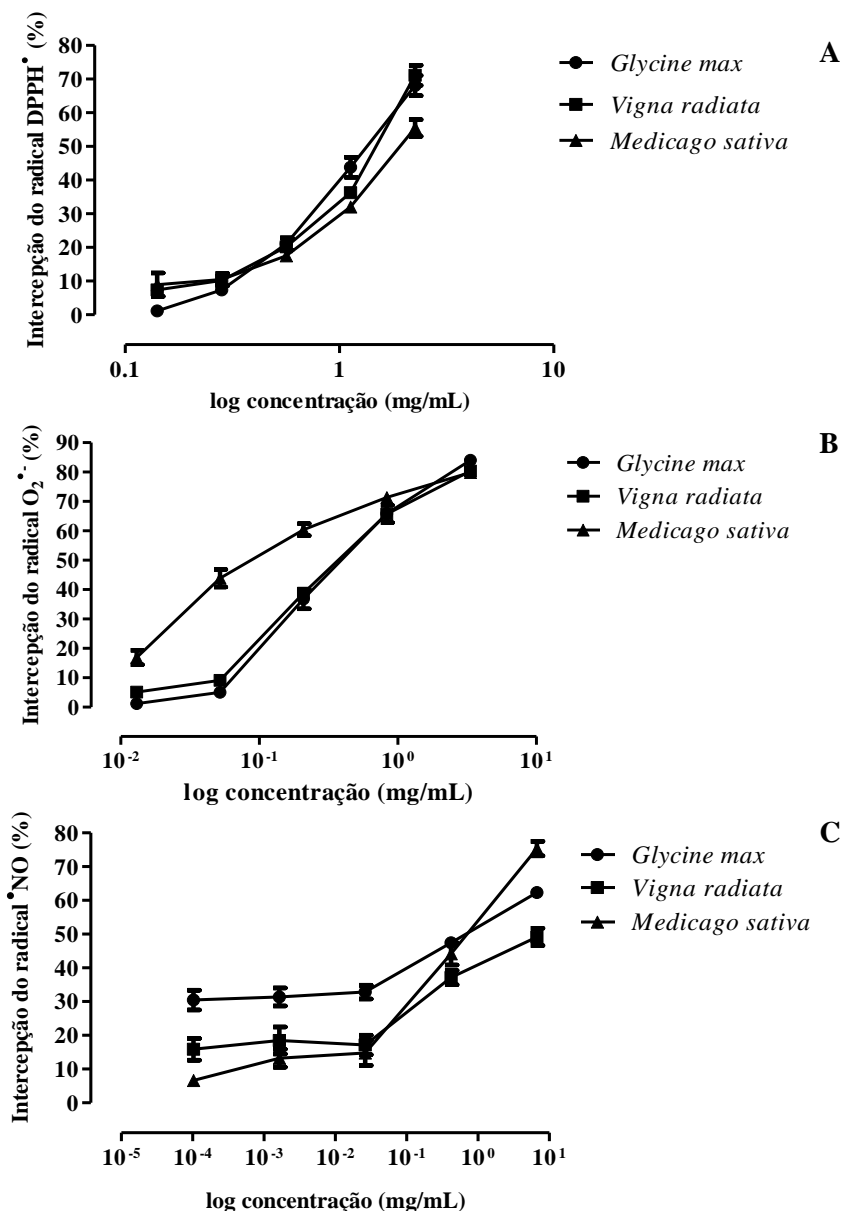
Os rebentos de *M. sativa* ocupam o plano formado pelos eixos F1 e F2 negativos por possuírem um maior conteúdo de álcoois e norisoprenóides (Figura 25), apresentando como compostos maioritários o 2-etil-1-hexanol e o  $\beta$ -ciclocitral, respectivamente.

Os rebentos de *V. radiata* estão projectados para o plano formado pelos eixos F1 e F2 positivos devido ao seu maior teor em ésteres e em compostos de enxofre (Figura 25), tendo como compostos maioritários o etil-octanoato e o trissulfureto de dimetilo, respectivamente. Este último é responsável pelo aroma de muitos produtos, tais como o conhaque, o uísque, o vinho e a cerveja (Gijs *et al.*, 2000), e possui ainda actividade antimicrobiana, por inibir o crescimento de leveduras (Kim *et al.*, 2004).

#### 4.1.2. Actividades biológicas

##### 4.1.2.1. Actividade Antioxidante

A actividade anti-radicalar dos extractos aquosos dos rebentos de *G. max*, *V. radiata* e *M. sativa* foi avaliada contra os radicais DPPH•, superóxido e óxido nítrico (Figura 26). No ensaio de intercepção do radical DPPH• todos os extractos mostraram potencial antioxidante dependente da concentração, sendo o extracto de *G. max* o mais activo ( $IC_{50} = 1,337$  mg/mL), seguido do extracto de *V. radiata* ( $IC_{50}=1,605$  mg/mL) e do extracto de *M. sativa* ( $IC_{50}=1,977$  mg/mL). Nos ensaios de intercepção dos radicais superóxido e óxido nítrico observou-se igualmente um efeito dependente da concentração. Relativamente ao primeiro, a actividade dos extractos seguiu a ordem *M. sativa* ( $IC_{50} = 0,067$  mg/mL) $\gg$  *V. radiata* ( $IC_{50} = 0,276$  mg/mL)  $\approx$  *G. max* ( $IC_{50} = 0,283$  mg/mL). No ensaio de intercepção do radical óxido nítrico os melhores resultados foram obtidos com os extractos de *M. sativa* ( $IC_{50} = 0,426$  mg/mL), seguido do extracto de *G. max* ( $IC_{50} = 0,438$  mg/mL), tendo o extracto de *V. radiata* uma actividade próxima ( $IC_{50} = 0,448$  mg/mL).



**Figura 26.** Efeito dos extractos aquosos de rebentos de *G. max*, *V. radiata* e *M. sativa* na intercepção dos radicais (A) DPPH•, (B) superóxido e (C) óxido nítrico. Os resultados são expressos em média ± desvio padrão de três ensaios, realizados em triplicado.

Os resultados obtidos nos três ensaios realizados revelaram que os rebentos possuem, no geral, um forte potencial antioxidante, tendo-se verificado uma melhor actividade relativamente ao superóxido. Comparando os resultados obtidos com as três amostras, verifica-se que o extracto de *M. sativa* é o mais interessante para a saúde.

Diferentes estudos concluíram que o potencial antioxidante das plantas está associado à ocorrência de compostos fenólicos. Estes compostos estão descritos como tendo uma boa actividade de intercepção de radicais livres, assim como uma boa capacidade como

quelante de metais envolvidos na geração de espécies oxidantes (Prakash *et al.*, 2007). Como se viu, os extractos de *G. max*, *V. radiata* e *M. sativa* contêm ácidos fenólicos com potencial antioxidante, nomeadamente os ácidos ferúlico, *p*-cumárico, cafeico e 5-*O*-cafeoilquínico (Kim *et al.*, 2006; Anwar *et al.*, 2007; Prakash *et al.*, 2007).

Adicionalmente, os extractos de rebentos estudados apresentaram derivados de flavonóides, reconhecidos pelo seu potencial antioxidante (Yu *et al.*, 2005; Pourmorad *et al.*, 2006). De facto, sabe-se que a actividade antioxidante dos derivados glicosilados da luteolina está associada à sua capacidade para interceptar ROS e RNS, para quelatar metais de transição e para induzir enzimas antioxidantes (López-Lázaro, 2009). O campferol-3-*O*-rutinósido e a quercetina-3-*O*-rutinósido têm potencial para interceptar radicais DPPH• e superóxido (Hou *et al.*, 2005; Fiorentino *et al.*, 2007); adicionalmente, o campferol-3-*O*-glucósido revelou actividade contra o peróxido de hidrogénio, além de inibir o processo de peroxidação lipídica (Fiorentino *et al.*, 2007).

Apesar dos extractos aquosos avaliados nos ensaios de actividade antioxidante apenas terem sido caracterizados relativamente a compostos fenólicos, não se pode ignorar a presença de metabolitos de outras classes, que poderão contribuir para essa actividade. De facto, compostos como o eugenol, álcool benzílico e 1-octen-3-ol e os ácidos oxálico, cítrico, málico e succínico, que embora não tenham sido determinados nos extractos avaliados se sabe estarem presentes nas amostras analisadas, têm actividade antioxidante descrita (Lee & Shibamoto, 2000; Seabra *et al.*, 2006). Além destes é ainda de considerar a contribuição de outros metabolitos, sendo a capacidade antioxidante manifestada resultante das interacções entre todos.

#### 4.1.2.2. Inibição da acetilcolinesterase

A procura de matrizes naturais, assim como de medicamentos naturais, com capacidade para inibir a AChE aumentou devido aos seus benefícios não só no tratamento da doença de Alzheimer, como em outras formas de demência (Mukherjee *et al.*, 2007). Os extractos aquosos dos rebentos de *G. max*, *V. radiata* e *M. sativa* analisados não apresentaram actividade inibitória da acetilcolinesterase nas concentrações testadas.

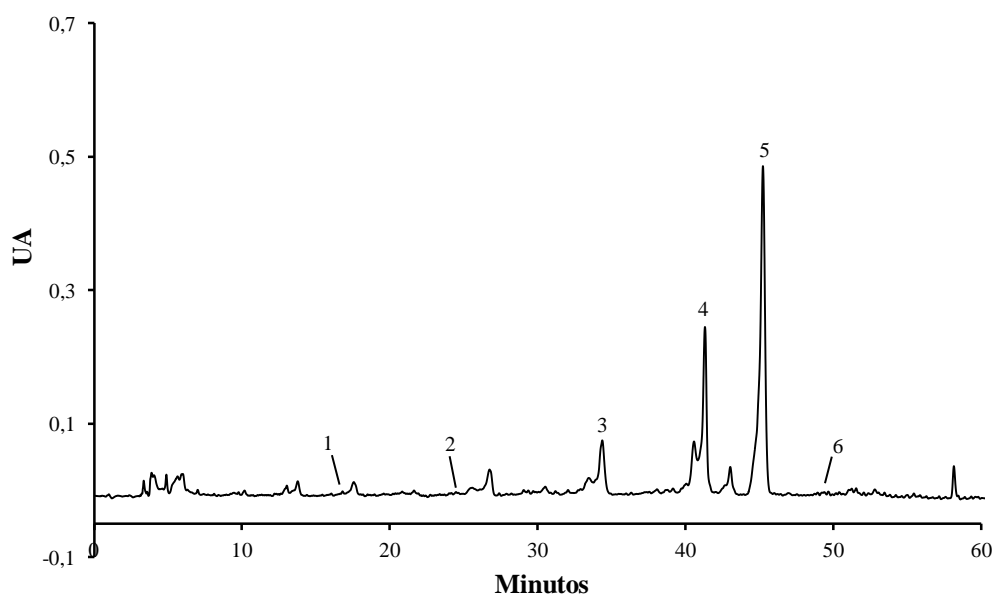
## 4.2. Influência da inoculação de *B. japonicum* nas sementes de *G. max*

### 4.2.1. Composição química

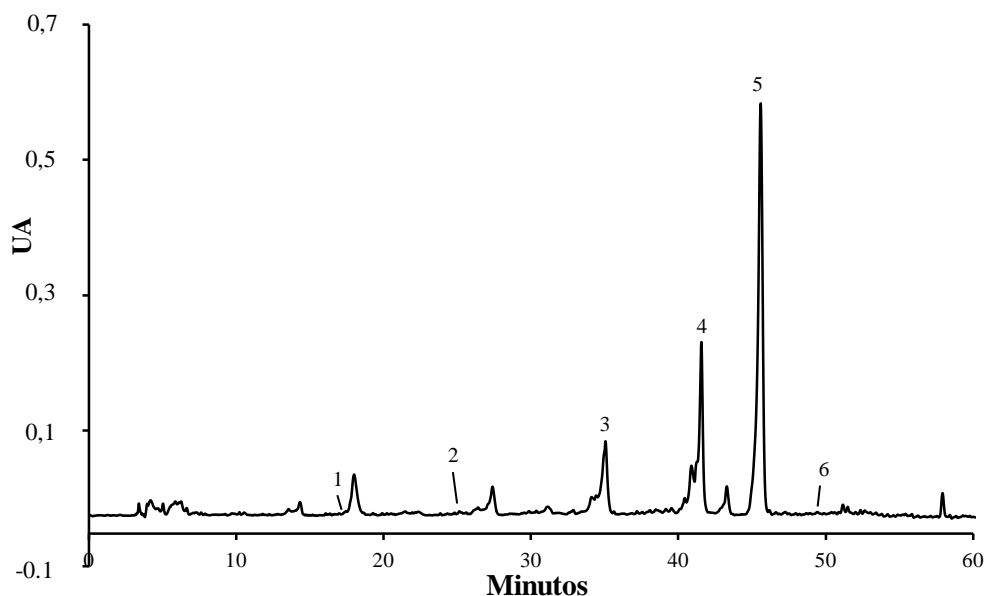
#### 4.2.1.1. Perfil de compostos fenólicos

A análise por HPLC/DAD permitiu identificar 6 compostos fenólicos nos extractos metanólicos de sementes de *G. max* (Figura 27 e 28).

Assim, foram encontrados os ácidos vanílico e *p*-cumárico e quatro isoflavonas: genistina, malonildaidzina, malonilgenistina e a genisteína (Figuras 27 e 28). Todas as isoflavonas identificadas já se encontravam descritas em sementes de *G. max* (Prakash *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2008; Correa *et al.*, 2010) e serão abordadas num item adiante. Os ácidos vanílico e *p*-cumárico foram também anteriormente descritos em diferentes variedades de semente de *G. max* (Kim *et al.*, 2006; Prakash *et al.*, 2007; Correa *et al.*, 2010).



**Figura 27.** Perfil cromatográfico dos compostos fenólicos de sementes *G. max* obtido por HPLC/DAD. Detecção a 280 nm. (1) ácido vanílico; (2) ácido *p*-cumárico; (3) genistina; (4) malonildaidzina; (5) malonilgenistina; (6) genisteína



**Figura 28.** Perfil cromatográfico dos compostos fenólicos de sementes *G. max* inoculadas com *B. japonicum* obtido por HPLC/DAD. Detecção a 280 nm. (1) ácido vanílico; (2) ácido *p*-cumárico; (3) genistina; (4) malonildaidzina; (5) malonilgenistina; (6) genisteína.

Para avaliar a recuperação dos compostos fenólicos, alíquotas de uma solução padrão de ácido *p*-cumárico foram tratadas e analisadas por HPLC/DAD da mesma forma que as amostras, tendo-se obtido uma recuperação de  $84 \pm 0,5\%$ .

A análise quantitativa do extracto metanólico de ambas as sementes demonstrou que a inoculação com *B. japonicum* levou à diminuição do conteúdo de ácidos fenólicos (Tabela 8). O ácido vanílico foi o ácido fenólico maioritário, correspondendo a 85 e 81% do teor total destes compostos nas sementes controlo e inoculadas, respectivamente.

O ácido vanílico é um metabolito frequentemente presente em frutas e vegetais e descrito como um dos principais compostos da baunilha, considerada como nutracêutica devido às diversas actividades biológicas que este ácido possui (Mattila & Hellstrom, 2007; Mol & Raja, 2010). As suas propriedades são reconhecidas no tratamento contra a filariose linfática e anemia falciforme, como inibidor da mutagénese induzida por agentes químicos e físicos e, ainda, mostrou efeitos quimiopreventivos na carcinogénese em ratos (Mol & Raja, 2010). Num estudo realizado por Delaquis *et al.* (2005) constatou-se que o ácido vanílico, em condições de pH baixo, apresenta um efeito inibitório contra *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. grayi* e *L. seeligeri*. Derivados deste ácido fenólico são aplicados na Europa como analépticos (Mol & Raja, 2010).

**Tabela 8.** Ácidos fenólicos em sementes de *G. max* (mg/kg).<sup>1</sup>

Compostos Fenólicos	Controlo	Inoculadas com <i>B. japonicum</i>
Ácido vanílico	489,1 ± 8,7	141,9 ± 13,1 <sup>a</sup>
Ácido <i>p</i> -cumárico	84,4 ± 5,0	32,6 ± 1,2 <sup>a</sup>
Σ		573,5
		174,5

<sup>1</sup> Os valores são expressos em média ± desvio padrão de três determinações; Σ soma dos ácidos fenólicos determinados. <sup>a</sup> Em comparação com a amostra controlo existem diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ).

Os compostos fenólicos desempenham um papel importante na defesa da planta, como precursores de uma variedade de compostos com actividades anti-microbianas e de moléculas de sinalização (Seneviratne & Jayasinghearachchi, 2003). Estes compostos estão igualmente envolvidos em diversos processos relacionados com a resistência a stress biótico e abiótico, reacções de oxidação-redução no solo e na rizogénese (Makoi & Ndakidemi, 2007).

No solo, estes compostos desempenham um papel nos elementos minerais da rizosfera e na dinâmica da matéria orgânica, afectando a sua degradação, na formação de húmus, na disponibilidade e mineralização de azoto e na alteração da actividade microbiana (Makoi & Ndakidemi, 2007). Os microrganismos presentes no solo decompõem rapidamente muitos destes compostos, razão do crescente número de estudos efectuados sobre a utilização dos compostos fenólicos como fonte de carbono para bactérias nodulantes (Stowers, 1985; van Rossum *et al.*, 1995; Seneviratne & Jayasinghearachchi, 2003).

O processo de nodulação tem influência no metabolismo secundário, através da regulação dos genes da via chiquimato: indução dos genes da fenilalanina amónia liase (PAL) e da chalcona sintetase (CHS), enzimas intervenientes nesta via metabólica, aumentando o conteúdo em compostos fenólicos durante a fase inicial do processo de nodulação da soja. Porém, no decurso dos últimos estágios de nodulação desta planta, muitos genes envolvidos nessa via são reprimidos (Brechenmacher *et al.*, 2008). Tais factos justificam que no presente estudo, ao contrário do que era expectável, não se tenha encontrado na amostra inoculada um maior conteúdo de compostos fenólicos do que no controlo, devido ao stress provocado pela inoculação. Como a amostra estudada constitui o produto final do ciclo de vida da planta inoculada, à imagem do que ocorreu

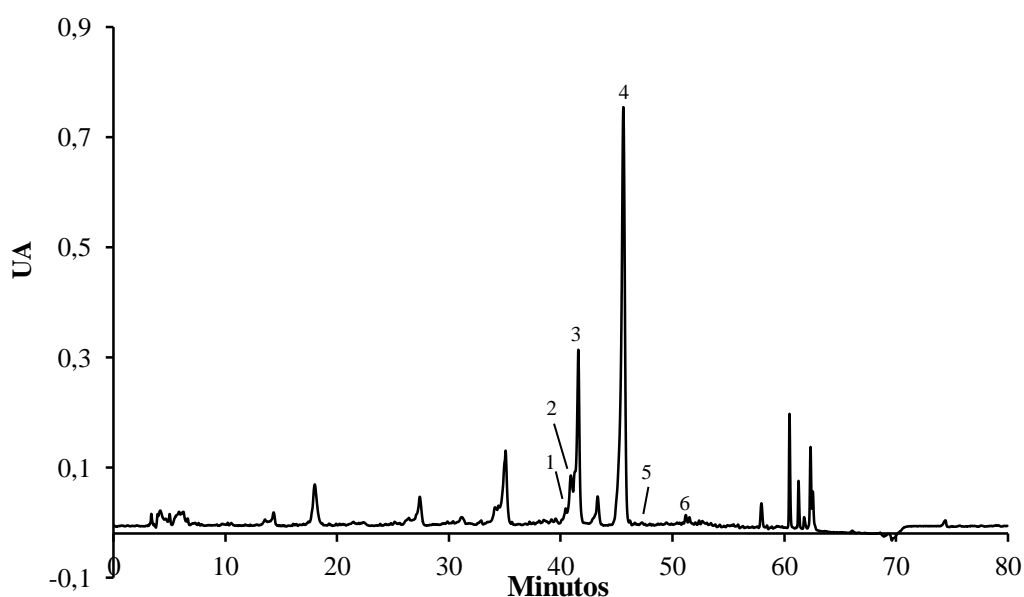


no estudo de Brechenmacher *et al.* (2008), presume-se que nos últimos estágios de nodulação da soja tenha havido repressão de genes envolvidos na via chiquimato.

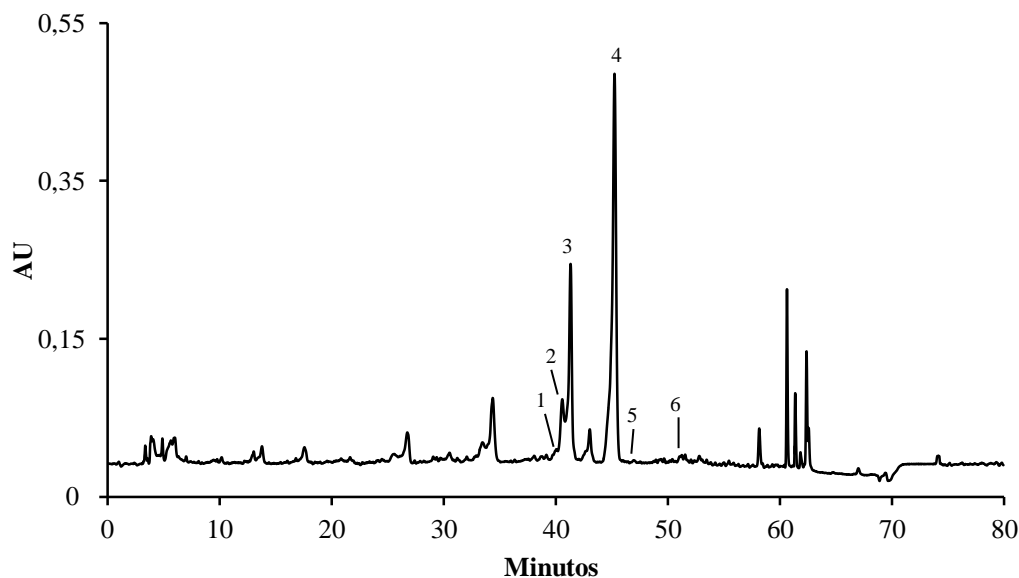
Um estudo realizado por Novikova (1994) demonstrou que, quando adicionadas como coadjuvante, concentrações elevadas de ácido vanílico provocam uma redução no crescimento de várias bactérias do género *Rhizobium* e que para concentrações mais baixas a formação de nódulos e a fixação de azoto eram estimuladas. Os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com Novikova (1994) e, nessa medida, sugerem que pode ter havido uma diminuição dos compostos fenólicos presentes nas amostras inoculadas, face à quantidade existente na amostra controlo, de modo a impedir a resposta defensiva destes compostos por parte da bactéria até atingir uma concentração que estimulasse a fixação de azoto.

#### 4.2.1.1.1. Perfil de isoflavonas

Em ambas as sementes foram identificadas duas agliconas (daidzeína e genisteína), dois derivados malonilglicosilados (malonildaidzina e malonilgenistina) e dois glicosilados (daidzina e genistina) (Figuras 29 e 30). Vários estudos confirmam a presença destes compostos em sementes de soja, nomeadamente o estudo de Shi *et al.* (2010), cujo método foi adaptado, e de Lee *et al.* (2007).



**Figura 29.** Perfil cromatográfico de isoflavonas de sementes *G. max* obtido por HPLC/DAD. Detecção a 260 nm. (1) daidzina; (2) genistina; (3) malonildaidzina; (4) malonilgenistina; (5) daidzeína; (6) genisteína.



**Figura 30.** Perfil cromatográfico de isoflavonas de sementes *G. max* inoculadas com *B. japonicum* obtido por HPLC/DAD. Detecção a 260 nm. Picos: (1) daidzina; (2) genistina; (3) malonildaidzina; (4) malonilgenistina; (5) daidzeína (6) genisteína.

Para avaliar a recuperação das isoflavonas por este método, alíquotas de uma solução padrão de genistina foram tratadas da mesma forma que a amostra, tendo-se obtido uma recuperação de  $94 \pm 4,0\%$ .

As duas amostras de sementes analisadas apresentaram grandes quantidades de isoflavonas (Tabela 9). Comparativamente com a amostra controlo, a amostra inoculada apresentou um teor de isoflavonas inferior. No entanto, ambas as amostras apresentaram quantidades muito semelhantes de agliconas, podendo-se inferir que a inoculação não teve qualquer influência na quantidade deste tipo de compostos. O efeito da inoculação foi mais evidente a nível das isoflavonas malonilglicosiladas, que sofreram um redução significativa na amostra inoculada com *B. japonicum* ( $p \leq 0,05$ ), e nas glicosiladas sem acilação (daidzina e genistina), que nessa amostra apresentaram valores significativamente superiores aos da amostra controlo ( $p \leq 0,05$ ). Contudo, os compostos maioritários em ambas as amostras foram as isoflavonas malonilglicosiladas, que representam, respectivamente 91 e 86% do conteúdo total de isoflavonas na amostra controlo e inoculada, sendo a malonildaidzina o principal composto.

O teor de cada isoflavona encontrado na amostra controlo está dentro do que seria expectável, uma vez que os seus valores são semelhantes aos obtidos por Sakthivelu *et al.* (2008) em diferentes génotipos de sementes de soja.

**Tabela 9.** Isoflavonas em sementes de *G. max* (mg/kg) <sup>1</sup>.

Isoflavonas	Controlo	Inoculadas com <i>B. japonicum</i>
Daidzina	24,1 ± 0,6	38,0 ± 0,9 <sup>b</sup>
Genistina	57,9 ± 2,7	74,5 ± 3,4 <sup>b</sup>
Malonildaidzina	536,3 ± 12,3	467,9 ± 10,8 <sup>b</sup>
Malonilgenistina	477,6 ± 22,0	316,2 ± 14,5 <sup>b</sup>
Daidzeína	10,1 ± 0,0	10,1 ± 0,0 <sup>a</sup>
Genisteína	4,4 ± 0,1	4,3 ± 0,1 <sup>a</sup>
Σ		1110,4
		911,0

<sup>1</sup> Os valores são expressos em média ± desvio padrão de três determinações; Σ soma das isoflavonas determinadas. <sup>a</sup> Em comparação com a amostra controlo não existem diferenças significativas ( $p>0,05$ ). <sup>b</sup> Em comparação com a amostra controlo existem diferenças significativas ( $p\leq 0,05$ ).

As isoflavonas constituem uma classe de compostos com papel relevante no desenvolvimento da infecção, sendo reconhecidas por induzirem os genes intervenientes no processo de nodulação por parte de *Bradyrhizobium* spp. (Dhaubhadel *et al.*, 2003). Assim, atendendo a que as agliconas, daidzeína e genisteína, são compostos indispensáveis no estabelecimento da simbiose com este tipo de bactérias (Brechenmacher *et al.*, 2010), neste estudo esperava-se obter um aumento significativo desta classe de isoflavonas, o que não se verificou. Este resultado corrobora os obtidos por Brechenmacher *et al.* (2010), que tendo efectuado a quantificação da daidzeína e genisteína nas raízes de *G. max* inoculada com *B. japonicum* não encontraram um aumento significativo neste tipo de compostos.

A maioria das isoflavonas presentes nas sementes de *G. max* é armazenada nas formas glicosilada e malonilglicosilada. Estas formas conferem maior estabilidade aos compostos do que a livre e permitem a sua compartimentação nos vacúolos ou o seu transporte para o local de armazenamento (Dhaubhadel *et al.*, 2008; Sakthivelu *et al.*, 2008). De um modo geral, as formas glicosiladas e malonilglicosiladas possuem maior solubilidade em água e menor reactividade química, o que possibilita uma melhoria da estabilidade e alteração da actividade biológica. A forma malonilglicosilada é termicamente instável, sendo por isso facilmente descarboxilada para a forma acetilglicosilada (Dhaubhadel *et al.*, 2008; Sakthivelu *et al.*, 2008). As enzimas que catalisam os processos de conjugação destas isoflavonas pertencem ao grupo das transferases: glicosiltransferase para a glicosilação e maloniltransferase para a malonilação (Dhaubhadel *et al.*, 2008).

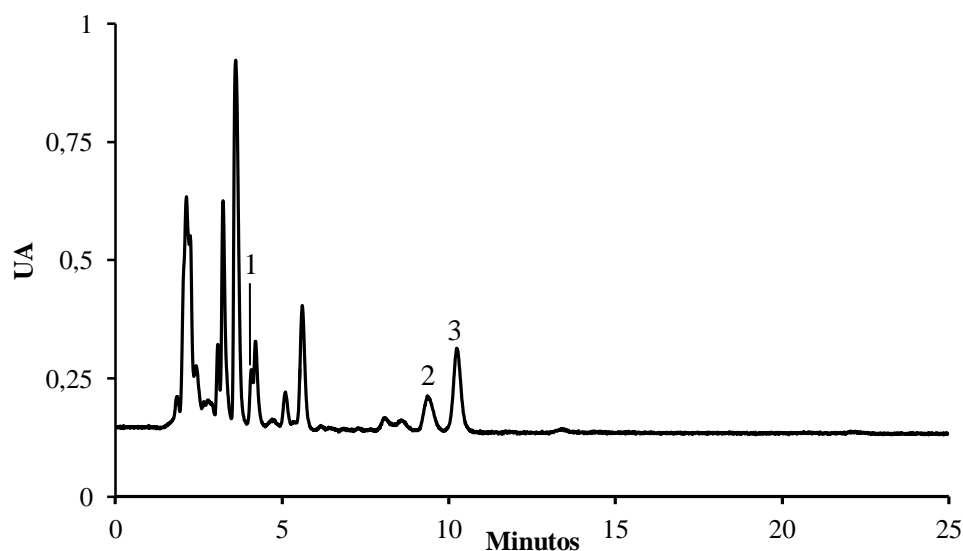
Na soja, o processo de glicosilação é seguido pela conversão dos compostos glicosilados nos respectivos derivados malonilglicosilados. O envolvimento da glicosiltransferase e maloniltransferase na biossíntese de isoflavonas foi demonstrado com enzimas purificadas a partir de raízes de grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.). Porém, apesar do grande interesse revelado pelo papel destas enzimas na biossíntese de isoflavonas, ainda não são conhecidos os genes responsáveis pela sua síntese (Dhaubhadel *et al.*, 2008).

Conforme referido acima, verificou-se uma diminuição dos compostos malonilglicosilados e um aumento dos glicosilados na amostra inoculada com *B. japonicum*, sem alteração do conteúdo de agliconas. Tendo em consideração que a síntese dos compostos malonilglicosilados ocorre a partir dos compostos glicosilados (Figura 6), pela acção da maloniltransferase, deduz-se que a inoculação com *B. japonicum* possa influenciar a actividade desta enzima, reduzindo a sua acção. Tanto quanto sabemos não existem referências bibliográficas sobre a influência da *B. japonicum* sobre a maloniltransferase, pelo que este resultado carece de confirmação futura.

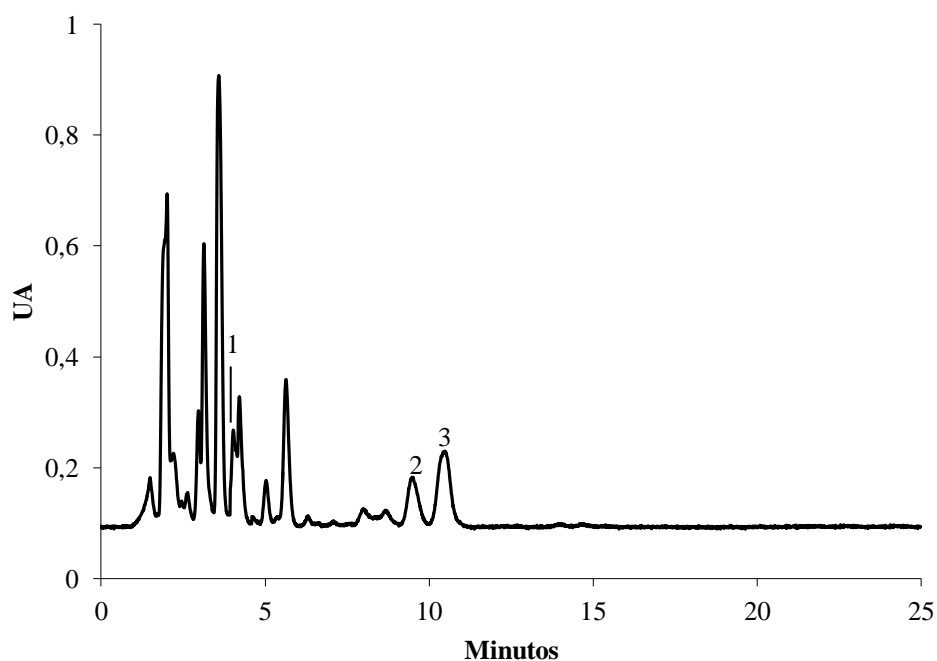
#### 4.2.1.2. Perfil de fitosteróis

O extracto dos fitosteróis das sementes de *G. max* foi preparado e analisado por HPLC/DAD de acordo com o método descrito por Lopes *et al.* (2011) com algumas alterações. Após análise dos dados obtidos com as hidrólises ácida e alcalina, verificou-se que a segunda originava melhores resultados, sendo este o extracto escolhido para a identificação e quantificação dos fitosteróis. Para avaliar a recuperação dos fitosteróis, alíquotas da solução padrão de betulina foram tratadas da mesma forma que a amostra, tendo-se obtido uma recuperação de  $97 \pm 0,6\%$ .

Nas sementes de *G. max* foram identificados três compostos: betulina, campesterol e  $\beta$ -sitosterol (Figura 31 e 32).



**Figura 31.** Perfil cromatográfico dos fitosteróis do extracto hidrolisado de sementes de *G. max* obtido por HPLC/DAD. Detecção a 205 nm. Picos: (1) betulina; (2) campesterol; (3)  $\beta$ -sitosterol.



**Figura 32.** Perfil cromatográfico dos fitosteróis do extracto hidrolisado de sementes de *G. max* inoculadas com *B. japonicum* obtido por HPLC/DAD. Detecção a 205 nm. Picos: (1) betulina; (2) campesterol; (3)  $\beta$ -sitosterol.

O campesterol e o  $\beta$ -sitosterol foram descritos em vários estudos como sendo dos principais fitosteróis das sementes de *G. max* (Mohamed *et al.*, 2001; Shi *et al.*, 2010). No entanto, de acordo com a bibliografia consultada, a betulina é pela primeira vez identificada nesta matriz.

Analisando em termos quantitativos (Tabela 10), verificou-se que a amostra controle apresentou um teor total em fitosteróis superior ao da amostra inoculada com *B. japonicum*. Em contrapartida, na amostra inoculada observou-se a presença de maior quantidade de campesterol, porém não significativa. O composto maioritário nas duas sementes foi a betulina, correspondendo a 77 e 71% dos fitosteróis totais das amostras controle e inoculada, respectivamente.

**Tabela 10.** Fitosteróis em sementes de *G. max* (mg/kg) <sup>1</sup>

Fitosteróis	Controle	Inoculada com <i>B. japonicum</i>
Betulina	123,7 ± 2,1	90,5 ± 0,2 <sup>b</sup>
Campesterol	18,3 ± 2,0	22,7 ± 2,0 <sup>a</sup>
$\beta$ -Sitosterol	19,3 ± 1,8	14,8 ± 0,4 <sup>b</sup>
<b>Total</b>		<b>161,4</b>
		<b>128,0</b>

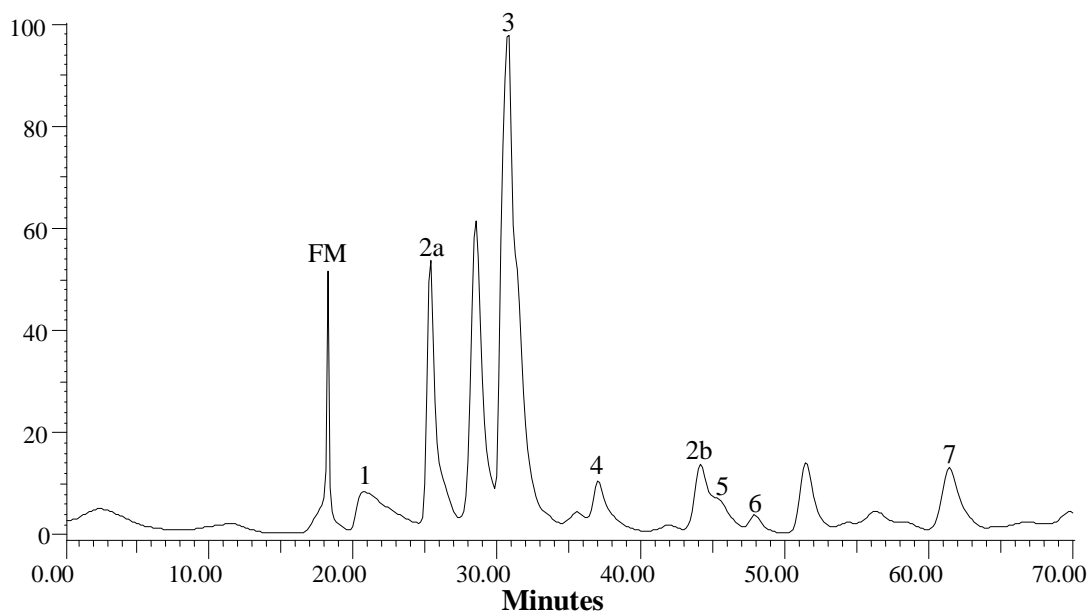
<sup>1</sup> Valores são expressos em média ± desvio padrão de três determinações. <sup>a</sup> Em comparação com a amostra controle não existem diferenças significativas ( $p > 0,05$ ). <sup>b</sup> Em comparação com a amostra controle existem diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ).

A inoculação com *B. japonicum* induziu uma diminuição do conteúdo deste tipo de compostos, que pode ser justificada pelo facto dos mesmos serem precursores de brassinosteróides, hormonas vegetais que estão envolvidas no desenvolvimento embrionário, na divisão celular e no crescimento da planta (Hounsoume *et al.*, 2008). A inoculação de plantas com bactérias nodulantes não só provoca um aumento da fixação de azoto, mas também um aumento do crescimento da planta (Catroux *et al.*, 2001). Este aumento pode ser devido a um acréscimo na síntese de hormonas de crescimento, nomeadamente os brassinosteróides, levando assim ao decréscimo do conteúdo de fitosteróis para produção destas hormonas.

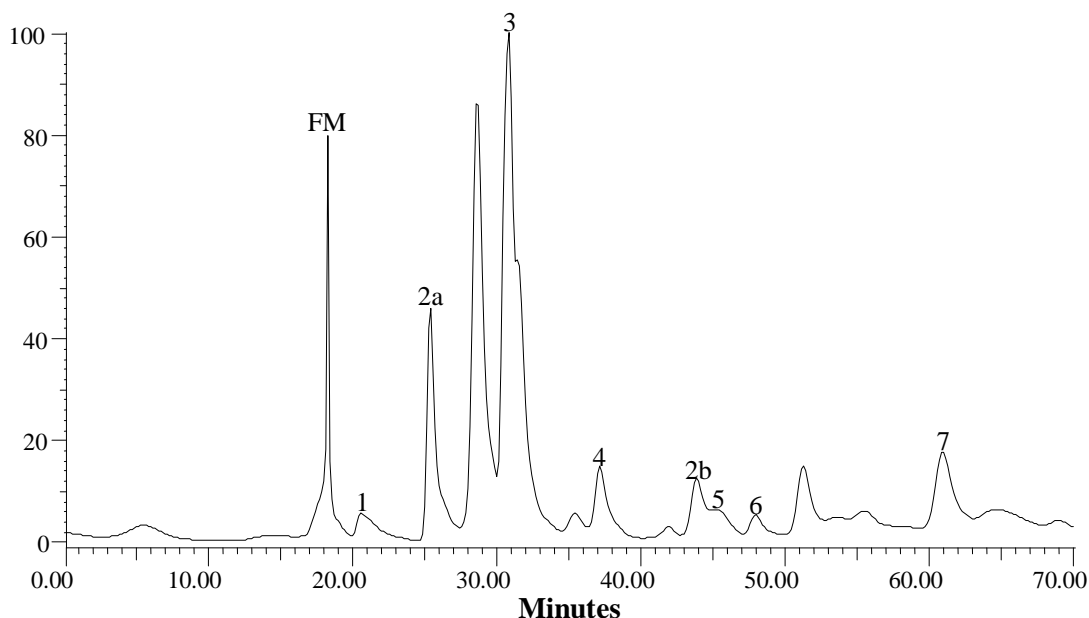
#### 4.2.1.3. Perfil de ácidos orgânicos

A análise por HPLC/UV mostrou um perfil composto por 7 ácidos orgânicos (Figuras 33 e 34): ácidos oxálico, málico, chiquímico, succínico, fumárico, cítrico e aconítico. O perfil de ambas as sementes foi semelhante, o que está de acordo com os resultados obtidos por Stumpf & Burris (1981). Com a excepção do ácido chiquímico, todos os ácidos orgânicos identificados tinham sido reportados na parte aérea de *G. max*

inoculada com *B. japonicum* (Couto *et al.*, 2011). No entanto, de acordo com a bibliografia consultada, os ácidos orgânicos acima mencionados foram identificados em sementes de *G. max* pela primeira vez neste estudo.



**Figura 33.** Perfil cromatográfico dos ácidos orgânicos de sementes de *G. max* obtido por HPLC/UV. Detecção a 214 nm. (FM) fase móvel; (1) ácido oxálico; (2a) ácido *cis*-aconítico; (2b) ácido *trans*-aconítico; (3) ácido cítrico; (4) ácido málico; (5) ácido chiquímico; (6) ácido succínico; (7) ácido fumárico.



**Figura 34.** Perfil cromatográfico dos ácidos orgânicos de sementes de *G. max* inoculadas com *B. japonicum* obtido por HPLC/UV. Detecção a 214 nm. (FM) fase móvel; (1) ácido oxálico; (2a) ácido *cis*-aconítico; (2b) ácido *trans*-aconítico; (3) ácido cítrico; (4) ácido málico; (5) ácido chiquímico; (6) ácido succínico; (7) ácido fumárico.

Para avaliar a recuperação de ácidos orgânicos por este método, alíquotas de uma solução padrão de ácido fumárico foram tratadas da mesma forma que a amostra, tendo-se obtido uma recuperação de  $86 \pm 3,3\%$ .

No presente estudo, as sementes inoculadas com *B. japonicum* apresentaram uma quantidade de ácidos orgânicos significativamente superior à existente nas sementes controle (Tabela 11). O aumento da quantidade de todos os compostos nas sementes inoculadas permitiu inferir a existência de um efeito positivo associado à inoculação.

O composto maioritário em ambas as amostras foi o ácido cítrico, representando 81 e 68% do total de ácidos orgânicos presentes nas sementes controle e inoculadas, respectivamente. O ácido cítrico, um composto muito comum tanto em plantas como em animais, tem a capacidade de quelatar iões metálicos, através da ligação destes a grupos carboxilo ou hidroxilo da molécula, o que o torna muito eficaz no retardamento da deterioração oxidativa de lípidos em alimentos e justifica a sua aplicação em óleos vegetais após a desodorização (Hras *et al.*, 2000).

**Tabela 11.** Ácidos orgânicos em sementes de *G. max* (mg/kg)<sup>1</sup>

Ácidos Orgânicos	Controlo	Inoculada com <i>B. japonicum</i>
Oxálico	2479,4 ± 12,0	3181,4 ± 15,3 <sup>a</sup>
Málico	9001,1 ± 88,9	29684,6 ± 293,0 <sup>a</sup>
Chiquímico	117,4 ± 0,1	154,8 ± 0,2 <sup>a</sup>
Fumárico	909,9 ± 10,7	1107,0 ± 13,0 <sup>a</sup>
Cítrico	57762,8 ± 2271,2	74246,7 ± 2919,3 <sup>a</sup>
Aconítico	231,9 ± 3,7	340,0 ± 5,4 <sup>a</sup>
Succínico	615,8 ± 1,3	825,4 ± 1,7 <sup>a</sup>
$\Sigma$		
	<b>71118,5</b>	<b>109539,9</b>

<sup>1</sup> Os valores são expressos em média ± desvio padrão de três determinações;  $\Sigma$  soma dos ácidos orgânicos determinados. <sup>a</sup> Em comparação com a amostra controle existem diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ).

O consumo destes compostos está associado a inúmeros benefícios para a saúde, pelo que as estratégias agrícolas que resultam num aumento do teor de ácidos orgânicos das plantas assumem um enorme interesse por parte dos consumidores (Crozier *et al.*, 2009).

Os ácidos orgânicos que em resultado da inoculação sofreram um maior aumento foram os ácidos oxálico, cítrico, málico, succínico e fumárico, ou seja, os ácidos intermediários do ciclo do ácido cítrico. Couto *et al.* (2011) sugerem que, quando se estabelece uma relação simbiótica entre *B. japonicum* e *G. max* o fluxo do ciclo do



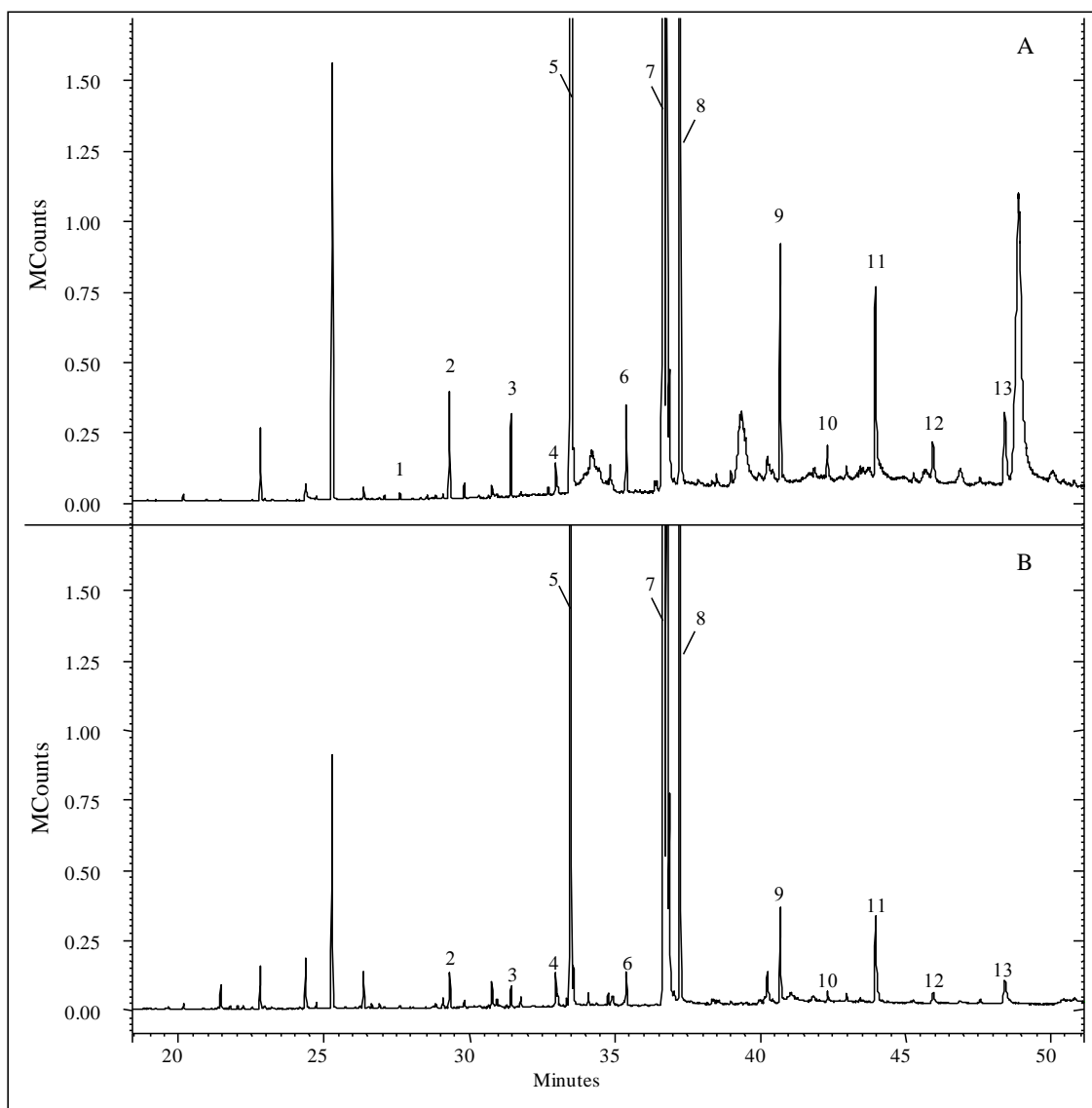
ácido cítrico é aumentado de modo a incrementar a produção de energia para a biossíntese de metabolitos.

Dos acima referidos o ácido málico foi aquele para o qual se verificou maior incremento, apresentando a semente inoculada cerca do triplo da quantidade existente na amostra controlo (Tabela 11). O aumento significativo da quantidade de ácido málico nas sementes inoculadas pode ficar a dever-se ao facto deste metabolito primário ter um papel importante na defesa da planta, o qual resulta em variações nos níveis deste composto, assim como em alterações na actividade de enzimas málicas, em resposta ao stress biótico e abiótico, como é o caso da inoculação em que ocorre uma infecção por parte da bactéria nodulante (Levitt, 1980). Adicionalmente, o ácido málico é um intermediário do ciclo do glioxilato, o qual pode ser iniciado como reacção de defesa de *G. max* ao ataque por agentes patogénicos, uma vez que o NADPH resultante é necessário para a biossíntese de compostos específicos de defesa ou como co-factor de enzimas antioxidantes (Cots *et al.*, 2002).

#### 4.2.1.4. Perfil de ácidos gordos

A análise do perfil de ácidos gordos por GC-MS permitiu a identificação de 16 ácidos gordos nas sementes de *G. max* (Figura 35): ácidos láurico (C12:0), tridecanóico (C13:0), mirístico (C14:0), pentadecanóico (C15:0), palmítico (C16:0), palmitoleico (C16:1), heptadecanóico (C17:0), esteárico (C18:0), oleico (C18:1c), elaídico (C18:1t), linoleico (C18:2), araquídico (C20:0), heneicosanóico (C21:0), beénico (C22:0), tricosanóico (C23:0), e lignocérico (C24:0). Na amostra inoculada foram identificados todos os ácidos gordos com a excepção do ácido tridecanóico.

Os ácidos mirístico, palmítico, esteárico, oleico, linoleico, araquídico e beénico foram descritos anteriormente em sementes de *G. max* (Grela & Gunter, 1995; Maestri *et al.*, 1998; Kumar *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2007; Orhan *et al.*, 2007; Dhakal *et al.*, 2009). Num estudo realizado por Ezeagu *et al.* (1998) foram identificados os ácidos mirístico, palmítico, palmitoleico, esteárico, oleico, linoleico, araquídico, beénico e lignocérico em óleo de sementes de *G. max*. Os restantes ácidos gordos identificados são descritos em sementes pela primeira vez no presente estudo.



**Figura 35.** Perfil cromatográfico dos ácidos gordos de sementes de *G. max* obtido por GC-MS. (A) controle e (B) inoculadas com *B. japonicum*. (1) ácido tridecanoico (13:0), (2) ácido mirístico (C14:0), (3) ácido pentadecanoico (C15:0), (4) ácido palmitoleico (C16:1), (5) ácido palmítico (C16:0), (7) ácido linoleico (C18:2), (8) ácido esteárico (C18:0), (9) ácido araquídico (C20:0), (10) ácido heneicosanoico (C21:0), (11) ácido beénico (C22:0), (12) ácido tricosanoico (C23:0), (13) ácido lignocérico (C24:0).

As curvas de calibração utilizadas para a quantificação de cada um dos compostos encontram-se na Tabela 6. Para avaliar a recuperação dos ácidos gordos por este método foram tratadas alíquotas de uma solução padrão de ácido oleico da mesma forma que a amostra, tendo-se obtido uma recuperação de  $88 \pm 0,7\%$ .

A amostra de sementes inoculadas com *B. japonicum* apresentou um teor de ácidos gordos significativamente maior do que o da amostra controle (Tabela 12).

Os compostos maioritários nas amostras são diferentes, sendo na amostra controlo o ácido esteárico, correspondendo a 41% do total de ácidos gordos. Na amostra inoculada os ácidos palmitoleico e esteárico são dominantes, correspondendo cada um a 22% do conteúdo total em ácidos gordos.

O ácido esteárico, apesar de ser um ácido gordo saturado geralmente associado ao aumento do colesterol no sangue, demonstrou não ter o efeito sobre os níveis de colesterol no sangue. Tal facto é devido à rápida desidrogenação do ácido esteárico que permite a sua fácil conversão em ácido oleico no fígado através das enzimas desaturases (Dubois *et al.*, 2007; Williams, 2000). Adicionalmente, ácidos gordos insaturados de cadeia longa, como é o caso do ácido esteárico apresentaram actividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Helicobacter pylori* (Zheng *et al.*, 2005).

O ácido palmitoleico é um ácido gordo monoinsaturado com um grande potencial antimicrobiano. Kabara *et al.* (1972) verificaram que este ácido apresentava concentrações mínimas inibitórias baixas relativamente ao crescimento de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *C. albicans*, *Nocardia asteroides*, *Corynebacterium* sp. e *Streptococcus pneumoniae*.

Os SFA representavam 73 e 65% do conteúdo total de ácidos gordos das sementes controlo e inoculada, respectivamente (Tabela 12). Dentro desta classe o composto maioritário nas duas amostras foi o ácido esteárico, correspondendo a 55 e 34% do teor total em SFA da amostra controlo e inoculada, respectivamente.

Verificou-se que a semente inoculada é mais rica em ácidos gordos polinsaturados, alguns dos quais essenciais (Tabela 12). Dentro desta classe o principal composto nas duas amostras foi o ácido linoleico (C18:2), representando 89 e 88% do conteúdo total de PUFA da amostra controlo e inoculada, respectivamente.

O ácido linoleico é um ácido gordo essencial Ómega-6. Estudos comprovaram que este ácido gordo pode melhorar a resistência à insulina e, por essa via, reduzir a incidência da diabetes, e que níveis séricos mais elevados deste ácido estão associados a pressões arteriais mais baixas (Harris *et al.*, 2009).

Adicionalmente, a inoculação com *B. japonicum* resultou no aumento significativo da produção de MUFA (Tabela 12). Com efeito, a quantidade destes nas sementes controlo corresponde a 13% do total de ácidos gordos, enquanto nas sementes inoculadas

representa 18%. Relativamente a esta classe de ácidos gordos, o composto maioritário nas duas amostras é o ácido oleico, correspondendo a 99 e 97% do total de MUFA na amostra controlo e inoculada, respectivamente.

**Tabela 12.** Linearidade e composição em ácidos gordos da semente de *G. max* (mg/kg)<sup>1</sup>.

Ácidos gordos <sup>2</sup>	Controlo	Inoculada com <i>B. japonicum</i>
C12:0	44,5 ± 4,6	53,0 ± 3,1 <sup>a</sup>
C13:0	51,1 ± 7,4	nd <sup>b</sup>
C14:0	1114,5 ± 86,9	3477,9 ± 104,3 <sup>b</sup>
C15:0	702,5 ± 42,8	169,5 ± 4,9 <sup>b</sup>
C16:0	136,9 ± 6,8	6812,6 ± 87,2 <sup>b</sup>
C16:1	51,4 ± 4,7	141,7 ± 5,3 <sup>b</sup>
C17:0	1052,5 ± 64,3	355,3 ± 21,2 <sup>b</sup>
C18:0	10938,6 ± 622,3	6709,4 ± 206,4 <sup>b</sup>
C18:1c	3432,1 ± 143,7	5426,6 ± 188,3 <sup>b</sup>
C18:1t	406,2 ± 6,3	629,6 ± 39,9 <sup>b</sup>
C18:2	3247,1 ± 182,3	4602,9 ± 184,9 <sup>b</sup>
C20:0	2209,2 ± 179,9	809,8 ± 39,8 <sup>b</sup>
C21:0	296,7 ± 25,8	93,3 ± 6,1 <sup>b</sup>
C22:0	2037,1 ± 277,2	988,1 ± 61,0 <sup>b</sup>
C23:0	496,1 ± 23,0	167,0 ± 6,3 <sup>b</sup>
C24:0	640,3 ± 6,1	217,3 ± 3,3 <sup>b</sup>
<b>Total</b>		<b>26856,8</b>
<b>SFA</b>		<b>19720,0</b>
<b>MUFA</b>		<b>3483,5</b>
<b>PUFA</b>		<b>3653,3</b>
		<b>30654,0</b>
		<b>19853,2</b>
		<b>5568,3</b>
		<b>5232,5</b>

<sup>1</sup> Resultados são expressos em média ± desvio padrão de três determinações. <sup>2</sup> C12:0, ácido láurico; C13:0, ácido tridecanóico; C14:0, ácido mirístico; C15:0, ácido pentadecanóico; C16:0, ácido palmítico; C16:1, ácido palmitoleico; C17:0, ácido heptadecanóico; C18:0, ácido esteárico; C18:1c, ácido oleico; C18:1t, ácido elaidico; C18:2, ácido linoleico; C20:0, ácido araquídico; C21:0, ácido heneicosanóico; C22:0, ácido behénico; C23:0, ácido tricosanóico; C24:0, ácido lignocérico; SFA, ácidos gordos saturados; MUFA, ácidos gordos monoinsaturados; PUFA, Ácidos gordos polinsaturados; nd = não detectado. <sup>a</sup> Em comparação com a amostra controlo não existem diferenças significativas (p>0,05). <sup>b</sup> Em comparação com a amostra controlo existem diferenças significativas (p≤0,05).

O aumento de ácidos gordos ao nível da membrana celular afecta a sua fluidez e está directamente relacionado com a tolerância das plantas ao stress biótico e abiótico (Brechenmacher *et al.*, 2010). A inoculação com *B. japonicum* pode estar envolvida na produção de ácidos gordos que aumentam a fluidez da membrana, necessária à colonização das células por parte da bactéria (Brechenmacher *et al.*, 2010). Neste estudo verificou-se uma maior quantidade de ácidos gordos nas sementes inoculadas relativamente às sementes controlo. Adicionalmente, verificou-se uma grande percentagem de ácido linoleico em ambas as amostras (12 e 15% nas amostras controlo

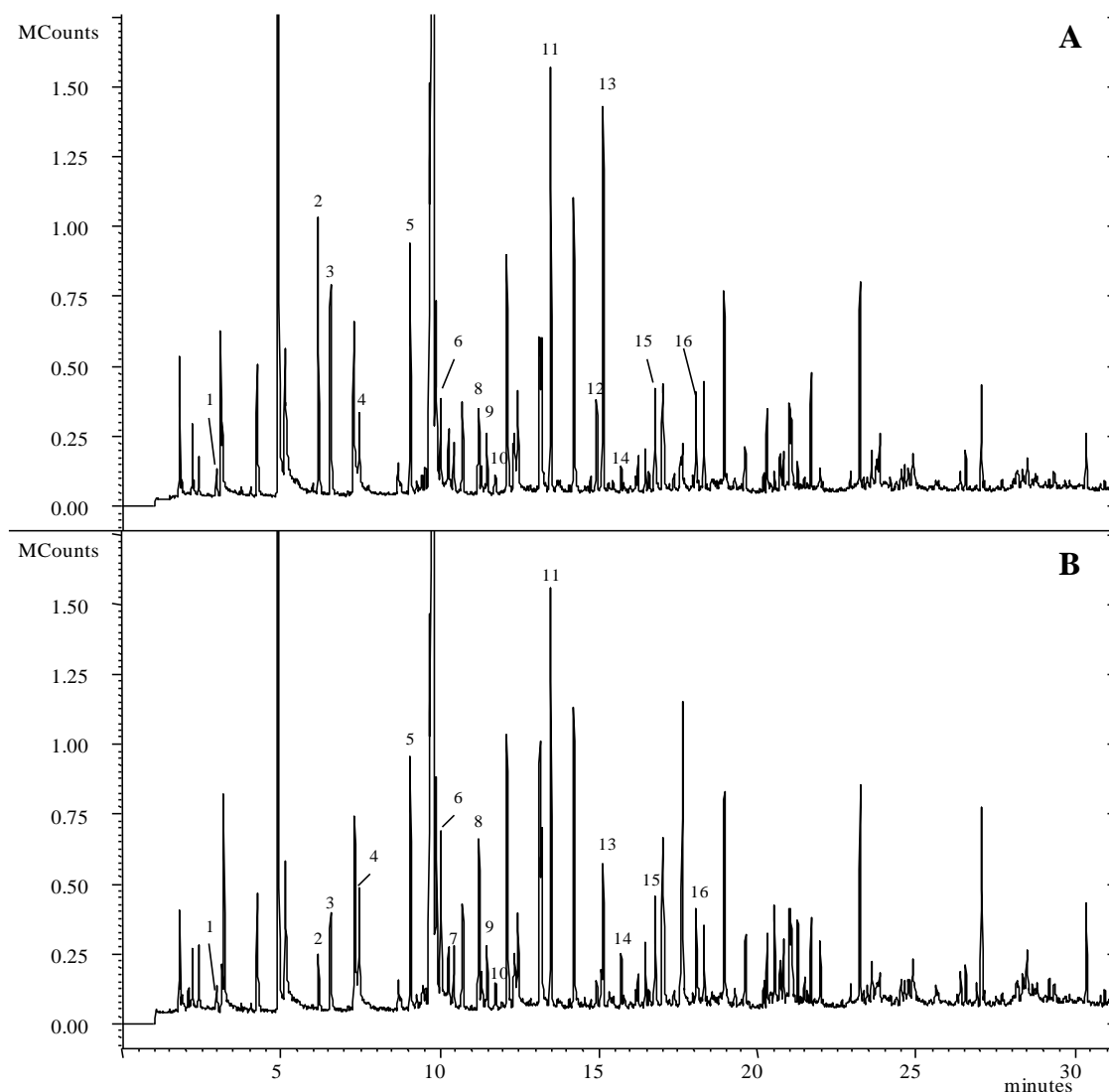
e inoculada), como era expectável devido ao facto deste ser um dos ácidos mais abundantes nas membranas celulares das plantas e pela sua acumulação em plantas inoculadas com *B. japonicum* (Brechenmacher *et al.*, 2010).

Os ácidos gordos possuem ainda actividade antimicrobiana que é utilizada pela planta contra agentes patogénicos: numa situação de ataque o conteúdo destes compostos aumenta. Os ácidos cáprico, láurico, mirístico, palmítico, oleico e linoleico possuem propriedades antimicrobianas (Kabara *et al.*, 1972; Walters *et al.*, 2003), afectando o crescimento bacteriano e fúngico. Os resultados obtidos estão de acordo com estes factos, pois além do total de ácidos gordos ser superior nas sementes inoculadas, os ácidos láurico, mirístico, palmítico, palmitoleico e oleico estão presentes em maior quantidade nestas.

#### 4.2.1.5. Perfil de compostos voláteis

A extracção por HS-SPME e análise por GC-MS permitiu a identificação de 16 compostos voláteis nas duas amostras de sementes de *G. max*. Os compostos identificados pertencem a diversas classes químicas: aldeídos, álcoois, cetonas, monoterpenos, entre outras (Figura 36).

O (*E*)-2-hexenal, 1-hexanol, heptanal, pentilfurano, octanal, limoneno, 3-octen-2-ona, (*E*)-2-octenal, (*E,Z*)-2,6-nonadienal, (*E*)-2-nonenal e o (*E,E*)-2,4-nonadienal já tinham sido descritos em sementes de *G. max* (Boué *et al.*, 2003; Ruth *et al.*, 2005). O (*Z*)-2-heptenal, (*E*)-2-nonenal, mentol e o (*Z*)-2-decenal, de acordo com a bibliografia consultada, são descritos pela primeira vez nesta matriz.



**Figura 36.** Perfil cromatográfico dos compostos voláteis de sementes de *G. max* (A) Controlo, (B) Inoculadas com *B. japonicum*. (1) 1-penten-3-ol (2) (*E*)-2-hexenal; (3) hexanol; (4) heptanal; (5) (*Z*)-2-heptenal; (6) 2-*n*-pentilfurano; (7) octanal; (8) limoneno (9) 3-octen-2-ona; (10) (*E*)-2-octenal; (11) (*E*)-2-nonen-1-ol; (13) (*E*)-2-nonenal; (14) mentol; (15) (*E,E*)-2,4-nonadienal; (16) (*Z*)-2-decenal.

A análise dos resultados apresentados na Tabela 13 permite concluir que a amostra controlo é mais rica nestes compostos. Na amostra inoculada verificou-se uma diminuição significativa de aldeídos e de álcoois, mas um aumento, também significativo, de monoterpenos. Ambas as amostras apresentaram níveis elevados de aldeídos e álcoois, sendo o (*E*)-2-nonen-1-ol o álcool principal nas sementes inoculadas e o 1-hexanol na amostra controlo. No que concerne aos aldeídos, o (*Z*)-2-heptenal foi o composto maioritário nas sementes inoculadas, sendo também importante na amostra controlo. No entanto, o composto maioritário nesta última foi o (*E*)-2-octenal.

**Tabela 13.** Compostos voláteis nas sementes de *G. max*.

Compostos	RI <sup>1</sup>	ID <sup>2</sup>	QI <sup>3</sup>	A <sup>4</sup> /1000		
				Controlo	Inoculada com <i>B. japonicum</i>	
<b>Aldeídos</b>						
2	(E)- 2-Hexenal	858	S, MS (84/92)	55/69/83/99	662,0 (29,4)	182,2 (3,1) <sup>b</sup>
4	Heptanal	902	S, MS (79/83)	55/70/81	178,4 (1,6)	247,2 (7,4) <sup>b</sup>
5	(Z)-2-Heptenal	965	MS (83/90)	55/83	619,1 (26,1)	672,5 (15,1) <sup>a</sup>
7	Octanal	1007	S, MS (85/91)	67/81/95	58,2 (4,9)	75,7 (6,3) <sup>a</sup>
10	(E)-2-Octenal	1049	S, MS (85/86)	55/70/83	698,9 (32,4)	87,1 (5,3) <sup>b</sup>
12	(E,Z)-2,6-Nonadienal	1160	S, MS (83/85)	55/70/83	153,0 (9,6)	39,5 (3,6) <sup>b</sup>
13	(E)-2-Nonenal	1166	MS (86/88)	55/70/83	691,0 (60,3)	248,5 (18,1) <sup>b</sup>
15	(E,E)-2,4-Nonadienal	1209	MS (84/87)	67/81/138	482,4 (42,5)	512,9 (43,1) <sup>a</sup>
16	(Z)-2-Decenal	1235	MS (82/86)	41/43/55	180,2 (7,5)	164,8 (5,4) <sup>a</sup>
		Σ			<b>3723,2</b>	<b>2230,4</b>
<b>Álcoois</b>						
1	1-Penten-3-ol	683	MS (80/90)	57/67	nd	119,6 (8,1) <sup>b</sup>
3	1-Hexanol	876	S, MS (80/83)	56/69	624,2 (24,0)	315,2 (12,4) <sup>b</sup>
11	(E)-2-Nonen-1-ol	1108	S, MS (83/86)	57/70/82	559,7 (4,2)	516,9 (36,4) <sup>a</sup>
		Σ			<b>1183,9</b>	<b>951,7</b>
<b>Cetonas</b>						
9	3-Octen-2-ona	1040	MS (85/85)	43/55/111	234,8 (22,8)	305,5 (22,8) <sup>a</sup>
		Σ			<b>234,8</b>	<b>305,5</b>
<b>Monoterpenos</b>						
8	Limoneno	1031	S, MS (88/92)	67/93	180,3 (1,9)	352,4 (29,4) <sup>b</sup>
14	Mentol	1184	S, MS (85/88)	81	34,9 (2,0)	74,0 (3,4) <sup>b</sup>
		Σ			<b>215,2</b>	<b>426,4</b>
<b>Outros compostos</b>						
6	2-n-Pentilfurano	987	MS (86/90)	81	372,3 (23,4)	344,4 (16,9) <sup>a</sup>
		Σ			<b>372,3</b>	<b>344,4</b>
Σ de todas as classes					<b>5729,4</b>	<b>4234,4</b>

<sup>1</sup> RT = Índice de retenção. <sup>2</sup> ID = Identificação; S = identificado por comparação com o padrão de referência; MS = Tentativamente identificado através da NIST05. <sup>3</sup> QI = índices de quantificação. <sup>4</sup> Área expressa como unidade arbitrária; valores expressos em média (desvio padrão) de três determinações; nd = não detectado. <sup>a</sup> Em comparação com a amostra de controlo as diferenças não são significativas (p>0,05). <sup>b</sup> Em comparação com a amostra de controlo existem diferenças significativas (p≤0,05).

Como referido anteriormente, os compostos voláteis têm um papel muito importante na defesa da planta, através da sua emissão tanto para a atmosfera, como para o solo. Estes compostos actuam na defesa subterrânea da planta como agente antimicrobiano, anti-herbivorismo ou atraindo inimigos naturais do agente patogénico (Dudareva *et al.*, 2006). Na soja, a emissão de alguns compostos voláteis é induzida pela inoculação com *B. japonicum*, uma vez que estes podem proteger a planta contra bactérias patogénicas e insectos (Couto *et al.*, 2011). Quando envolvidos na defesa directa ou indirecta, os indicadores mais comuns da síntese destes compostos incluem metabolitos resultantes de várias vias, entre os quais se destacam os monoterpenos (Dudareva *et al.*, 2006).

Os resultados obtidos corroboram o conhecimento existente, uma vez que os monoterpenos são a única classe que sofreu um aumento significativo na amostra inoculada com *B. japonicum*. O limoneno apresenta potencial antibacteriano (inibindo a actividade de *E. coli* e *B. subtilis*) e antifúngico contra *C. albicans* (Ibrahim, 2001). O mentol, ainda que pouco efectivo, também está reportado como possuindo actividade antimicrobiana (Paiva, 2000). Para além deste resultado, importa salientar que o 1-penten-3-ol só está presente na amostra inoculada. Efectivamente, está descrito que este composto é sintetizado por plantas expostas a ataques de agentes patogénicos (Fall *et al.*, 2001).

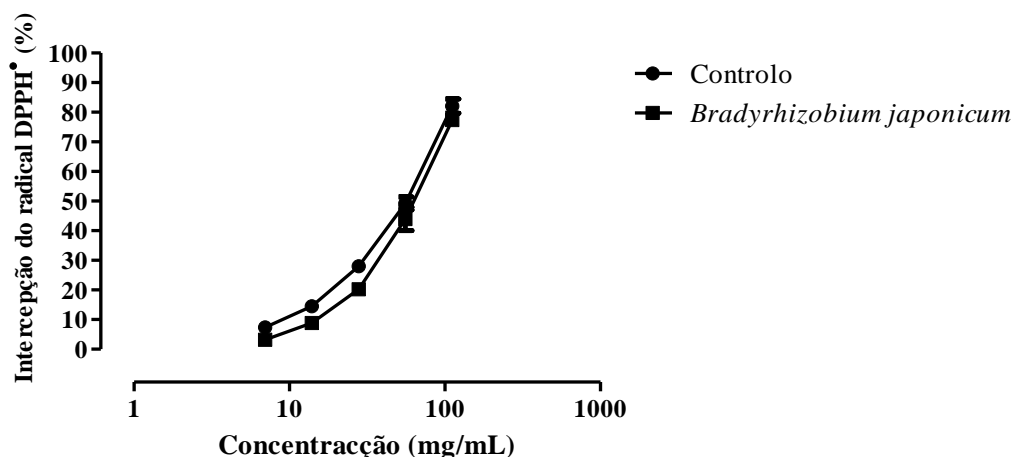
#### 4.2.2. Actividades biológicas

##### 4.2.2.1. Actividade antioxidante

A presença de espécies reactivas de oxigénio e de defesas antioxidantes nas etapas de nodulação – infecção, desenvolvimento e formação de nódulos – demonstram que o equilíbrio oxidação/redução é importante. Todavia, existem diversas estirpes de bactérias nodulantes que apresentam uma fraca defesa antioxidante, o que gera um ambiente de elevado stress no nódulo. Assim sendo, a alteração no potencial antioxidante das plantas resulta das alterações metabólicas provocadas pelo funcionamento dos nódulos (Chang *et al.*, 2009).

A actividade antioxidante das sementes inoculadas e controlo foi testada em três ensaios (contra os radicais DPPH•, superóxido e óxido nítrico). No entanto, o extracto aquoso das sementes de *G. max* revelou uma actividade muito reduzida (inferior a 10% para a concentração mais alta que foi possível testar). Assim, testou-se também um extracto metanólico, que não apresentou qualquer actividade relativamente aos radicais superóxido e óxido nítrico, pelo que são aqui apresentados apenas os resultados obtidos relativamente à captação do radical DPPH• (Figura 37).





**Figura 37.** Efeito dos extractos metanólicos de semente de *G. max* na intercepção do radical DPPH•. Os resultados são expressos na forma de média  $\pm$  desvio padrão de três ensaios, realizados em triplicado.

Neste ensaio ambas as amostras demonstraram um potencial antioxidante dependente da concentração, sendo o da amostra controlo ligeiramente superior ( $IC_{50} = 56,9$  e  $63,8$  mg/mL para as sementes controlo e inoculadas, respectivamente).

Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com vários estudos efectuados anteriormente, que descrevem o potencial de sementes de *G. max* para interceptar o radical DPPH• muito semelhante ao encontrado neste estudo (Kim *et al.*, 2006; Sakthivelu *et al.*, 2008).

O melhor resultado obtidos com as sementes controlo pode ser devido, em parte, ao seu maior conteúdo em compostos fenólicos, reconhecidos antioxidantes como foi referido anteriormente.

Para além disso, nos extractos de sementes estudados foram identificadas diversas isoflavonas, sabendo-se que as formas glicosiladas, comparativamente às agliconas, têm uma actividade antioxidante reduzida aproximadamente entre 50 a 100 vezes (Sakthivelu *et al.*, 2008); devido a este facto deduz-se que a intervenção destes compostos na actividade dos extractos deverá ser reduzida.

Por outro lado, a diferença ao nível da quantidade de compostos fenólicos existente nas sementes estudadas não se traduziu na actividade antioxidante, sugerindo que antagonismos e sinergismos resultantes da sua interacção com outras classes de compostos possam ter ocorrido. Apesar dos extractos avaliados nos ensaios de

actividade antioxidante apenas terem sido caracterizados relativamente aos compostos fenólicos, admite-se que as outras classes de compostos identificadas nas amostras, e/ou outras não determinadas nesta tese, possam estar presentes nesses extractos. Entre estas referem-se os ácidos orgânicos, uma vez que o aumento do teor destes compostos, para além da sua acção antioxidante, pode aumentar a biodisponibilidade de compostos fenólicos (Yamashita *et al.*, 2002).

#### 4.2.2.2. Inibição da acetilcolinesterase

Os extractos das sementes de *G. max* controlo e inoculadas com *B. japonicum* não mostraram capacidade para inibir a actividade da acetilcolinesterase nas concentrações testadas.

#### 4.3. Semente vs rebentos de *G. max*

Como anteriormente foi referido, a germinação é um processo biológico natural, no qual sempre que estão reunidas as condições necessárias ao seu desenvolvimento e crescimento (de humidade, temperatura e nutrientes) as sementes terminam o seu estado de latência. Durante este processo, dependendo da variedade da semente e das condições de germinação, podem ocorrer alterações benéficas ao nível da composição química da soja (Martinez *et al.*, 2011). Algumas das alterações já conhecidas consistem na redução do teor de factores antinutricionais presentes nas sementes, no aumento da biodisponibilidade de minerais e vitaminas e no aumento da digestibilidade do alto teor de proteínas que a soja possui (Ghavidel & Prakash, 2007). Assim, neste estudo considerou-se pertinente efectuar uma comparação entre os resultados obtidos com as sementes controlo e com os rebentos de soja analisados. No entanto, a possível influência de factores relacionados com as variedades estudadas não pode ser ignorada, uma vez que a classificação botânica foi feita apenas ao nível da espécie e que as sementes estudadas não foram as que deram origem aos rebentos analisados.

Atendendo a que os extractos utilizados na análise de compostos fenólicos das sementes e rebentos foram obtidos de modo diferente, esta comparação é limitada. De qualquer modo, destaca-se a variedade de compostos identificados. Nas sementes apenas foram identificados oito compostos (Figuras 27 e 29), maioritariamente isoflavonas. Nos rebentos foram identificados onze compostos, incluindo derivados de flavonóis (Figuras 11 e 14). Estes resultados estão de acordo com os dados obtidos por Kim *et al.* (2006): as sementes de soja têm menor variedade de compostos fenólicos do que os rebentos.

Analisando exclusivamente a classe das isoflavonas, verifica-se que os compostos malonil glicosilados apenas foram encontrados nas sementes (Figura 27). Estes resultados são concordantes com os de Shi *et al.* (2010), segundo os quais a malonildaidzina e a malonilgenistina são predominantes nas sementes e sofrem uma diminuição após a germinação, com consequentemente aumento dos derivados glicosilados – daidzina e genistina, respectivamente.

As sementes apresentaram um total de isoflavonas muito superior ao encontrado nos rebentos (Tabelas 3 e 9). Porém, a percentagem de agliconas é reduzida em ambas as matrizes.

Nakamura *et al.* (2001) compararam o perfil de isoflavonas de sementes e rebentos de soja, tendo verificado que a germinação leva ao aumento do conteúdo de agliconas e que os compostos glicosilados diminuem. No presente estudo o conteúdo de agliconas encontrado nos rebentos foi, efectivamente, um pouco superior ao observado nas sementes.

No que concerne ao teor de fitosteróis das duas matrizes, as sementes apresentaram um nível mais elevado deste tipo de compostos do que os rebentos (Tabelas 4 e 10). No entanto, verificou-se que a variedade de compostos existentes é maior nos rebentos, pois além da betulina,  $\beta$ -sitosterol e campesterol existentes nas sementes, foi ainda identificado o estigmasterol. Adicionalmente, nesta matriz verificou-se um aumento significativo de campesterol, passando a sua quantidade para o triplo da encontrada nas sementes.

As sementes de cereais e algumas leguminosas são reconhecidas como as principais fontes de fitosteróis. A soja, em particular, está reportada como rica neste tipo de compostos (Jong *et al.*, 2003). Os fitosteróis desempenham um papel indispensável na diferenciação e proliferação celular, razão pela qual são acumulados nas sementes. É esse reservatório que garante o crescimento de novas células e de rebentos. Apesar de após a germinação continuar a ocorrer a síntese destes compostos, ela vai diminuindo gradualmente (Pirronen *et al.*, 2000).

No que respeita ao conteúdo em ácidos orgânicos, em ambas as matrizes identificaram-se sete compostos (Figuras 20 e 33). Contudo, existem algumas diferenças: o ácido chiquímico apenas foi encontrado nas sementes e o ácido quínico nos rebentos. Quantitativamente, os rebentos revelaram ser mais ricos nestes compostos (Tabelas 5 e 11). A germinação teve ainda repercussão no composto maioritário, dado que, após este processo, a quantidade de ácido cítrico, o composto dominante nas sementes, passou a ser dez vezes menor, sendo o ácido succínico o composto principal nos rebentos.

Fait *et al.* (2006) analisaram o perfil metabólico de vários estados de desenvolvimento de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., desde as sementes até germinação, tendo verificado que durante o processo germinativo ocorre um aumento dos níveis de muitos metabolitos, nomeadamente de ácidos orgânicos. Este aumento deve-se à síntese de precursores necessários para a reactivação de vias metabólicas, bem como para a coordenação entre a disponibilidade energética e metabolismo.

Relativamente aos ácidos gordos, ambas as matrizes apresentaram os mesmos 16 compostos (Figuras 23 e 35), sendo as sementes muito mais ricas do que os rebentos (Tabelas 6 e 12). Este resultado foi, em certa medida, o esperado, dado que as sementes são uma boa fonte de energia para suprir as necessidades da planta durante o processo germinativo. Para além disso, o conteúdo em PUFA nas sementes foi muito superior ao dos rebentos. Assim, considera-se que as sementes são a melhor opção para o fornecimento destes compostos na alimentação humana. Adicionalmente, o ácido linoleico, um ácido gordo essencial Ómega-6, representa 14% do conteúdo de ácidos gordos das sementes e apenas de 6% nos rebentos.

Os resultados deste estudo corroboram os de Orhan *et al.* (2007), que comparou o conteúdo de ácidos gordos em sementes e rebentos de soja, tendo verificado que as sementes de soja possuíam um conteúdo total de ácidos gordos superior aos rebentos e, mais especificamente, que estas possuíam uma quantidade superior de PUFA.

Quanto aos compostos voláteis, verificou-se que com a germinação aumenta a diversidade de compostos: nas sementes apenas foram identificados 16 compostos e nos rebentos 31 (Figuras 24 e 36). Ambas as matrizes são ricas em aldeídos; contudo, apresentaram variações ao nível do segundo maior grupo, sendo este nas sementes constituído pelos álcoois e nos rebentos pelos outros compostos e, igualmente, pelos álcoois. Estes resultados reiteram os de outros estudos publicados. Com efeito, se durante o seu processo de crescimento e desenvolvimento, bem como na maturação das sementes, as plantas sintetizam sobretudo compostos voláteis mais simples (ácidos, aldeídos, cetonas e álcoois), após a germinação, em resposta as diversas alterações ambientais, como nos períodos de stress, as plantas passam a sintetizar outro tipo de compostos mais complexos (Seco *et al.*, 2007).

A maior variedade de compostos dos rebentos poderá traduzir-se numa maior diversidade de actividades biológicas. O aumento da emissão de compostos voláteis após a germinação justifica-se pelo facto da planta jovem emitir pela raiz compostos que impedem a germinação e o crescimento de plantas vizinhas, que poderiam competir no consumo de nutrientes necessários ao seu desenvolvimento (Dudareva *et al.*, 2006).

Por último, considera-se que os compostos fenólicos tiveram influência na actividade antioxidante das duas matrizes. No entanto, neste estudo foram identificados

metabolitos de outras classes em ambas as matrizes, tais como ácidos orgânicos e compostos voláteis, cujas actividades biológicas não podem ser ignoradas.

Os extractos aquosos de rebentos apresentaram potencial antioxidante dependente da concentração nos ensaios de intercepção dos radicais DPPH•, superóxido e óxido nítrico, sendo mais activos contra o radical superóxido. Apesar de terem sido realizados os mesmos três ensaios com extractos aquosos das sementes, esta matriz mostrou uma actividade muito reduzida.

Desta forma, constatou-se que os rebentos apresentam uma capacidade redutora superior à das sementes. Com efeito, no caso da soja, segundo o estudo de Fernandez-orocho *et al.* (2008), a capacidade antioxidante aumenta com o processo germinativo, observando-se melhor actividade quatro a cinco dias após a germinação.

## V. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no âmbito desta dissertação permitiram chegar às seguintes conclusões:

- Nos rebentos de *G. max*, *V. radiata* e *M. sativa* foram identificados onze compostos fenólicos, incluindo quatro isoflavonas, quatro fitosteróis, dezasseis ácidos gordos, sete ácidos orgânicos e trinta e um compostos voláteis, o que revela o potencial de cada um destes rebentos como fonte de compostos bioactivos na dieta alimentar.
- Os rebentos de *M. sativa* revelaram ser a mais vantajosa das amostras analisadas, uma vez que continham maior quantidade de compostos voláteis e de compostos fenólicos e a amostra mais activa nos ensaios contra os radicais óxido nítrico e superóxido, que são espécies oxidantes com impacto fisiológico. Os rebentos de *G. max* apenas mostraram ser mais vantajosos relativamente à quantidade de ácidos gordos e, no que concerne ao potencial antioxidante, foi a amostra mais activa contra o radical DPPH•. Os rebentos de *V. radiata* apresentaram a maior quantidade de fitosteróis e de ácidos orgânicos.
- Nas sementes de *G. max* foram identificados oito compostos fenólicos, incluindo seis isoflavonas, três fitosteróis, dezasseis ácidos gordos, sete ácidos orgânicos e dezasseis compostos voláteis.
- A nodulação induzida pela inoculação com *B. japonicum* provocou alterações ao nível do metabolismo primário e secundário de *G. max*. A amostra não inoculada continha maior quantidade de fitosteróis, de compostos voláteis e de compostos fenólicos, enquanto a amostra inoculada apresentava uma quantidade superior de ácidos orgânicos e de ácidos gordos.
- Relativamente à actividade antioxidante das amostras inoculadas com *B. japonicum* verificou-se que a diminuição da biossíntese de alguns compostos não influenciou a actividade biológica, uma vez que as sementes controlo apresentaram uma actividade muito semelhante à das sementes inoculadas.

- As sementes são melhor fonte de fitosteróis, de compostos fenólicos, incluindo as isoflavonas, e de ácidos gordos. Em contrapartida, a germinação provocou o aumento da biossíntese de ácidos orgânicos e de compostos voláteis.
- A germinação contribuiu para um aumento das classes de compostos com potencial antioxidante, traduzido na maior actividade antioxidante demonstrada pelos rebentos de soja.



## VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alonso, B.O.; Rovira, R.F.; Vegas, C.A.; Pedrosa, M.M. (2010). Papel de las leguminosas en la alimentación actual. *Actividad Dietética*, 14, 72-76.

American Soybean Association (2011). Soy Stats 2011, disponível online em <http://www.soystats.com/2011/Default-frames.htm> (consultado a 12 de Junho de 2011).

Andersen, J.K. (2004). Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence?. *Nature Reviews Neuroscience*, 5, S18–S25.

Anwar, F.; Latif, S.; Przybylski, R.; Sultana, B.; Ashraf, M. (2007). Chemical composition and antioxidant activity of seeds of different cultivars of mungbean. *Journal of food science*, 72, 503-510.

Aruoma, O.I. (1998). Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75, 199-212.

Assimopoulou, A.N.; Zlatanov, S.N.; Papageorgiou, V.P. (2005). Antioxidant activity of natural resins and bioactive triterpenes in oil substrates. *Food Chemistry*, 92, 721–72.

Badri, V.D.; Vivanco, J.M. (2009). Regulation and function of root exudates. *Plant, Cell and Environment*, 32, 666-681.

Balasundram, N.; Sundram, K.; Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99, 191 – 203.

Barbour, W.M.; Hattermann, D.R.; Stacey, G. (1991). Chemotaxis of *Bradyrhizobium japonicum* to soybean exudates. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 2635-2639.

Barreiros, A.L.B.S.; David, J.M.; David, J.P. (2006). Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, 29, 113-123.

- Bergersen, F.J. (1961). The growth of *Rhizobium* in synthetic media. Australian Journal of Biological Science, 14, 349-60.
- Berra, C.M.; Menck, C.F.M.; Mascio, P.D. (2006). Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. Química Nova, 29, 1340-1344.
- Bianchi, M.L.P.; Antunes, L.M.G. (1999). Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. Revista de Nutrição, Campinas, 12, 123-130.
- Blokhina, O; Virolainen, E.; Fagerstedt, K.V. (2003). Antioxidants, oxidative deprivation stress: a review. Annals of Botany, 91, 179-194.
- Boué, S.M.; Shih, B.Y.; Carter-Wientjes, C.H.; Cleveland, T.E. (2003). Identification of volatile compounds in soybean at various developmental stages using solid phase microextraction. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 4873-4876.
- Brechenmacher, L.; Kim, M.; Benitez, M.; Li, M.; Joshi, T.; Calla, B.; Lee, M.P.; Libault, M.; Vodkin, L.O.; Xu, D.; Lee, S.; Clough, S.; Stacey, G. (2008). Transcription profiling of soybean nodulation by *Bradyrhizobium japonicum*. Molecular Plant-Microbe Interactions, 21, 631-645.
- Brechenmacher, L.; Lei, Z.; Libault, M.; Findley, S.; Sugawara, M.; Sadowsky, M.J.; Summer, L.W.; Stacey, G. (2010). Soybean metabolites regulated in root hairs in response to the symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. Plant physiology, 153, 1808-1822.
- Burkart, A. (1952) Las leguminosas argentinas, silvestres y cultivadas. ACME agency, Buenos Aires, 569.
- Buttery, R.G., Kamm, J.A., Ling, L.C. (1982). Volatile components of alfalfa flowers and pods. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 30, 739-742.
- Cao, G.; Sofic, E.; Prior, R.L. (1996). Antioxidant capacity of tea and common vegetables. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44, 3426-3431.
- Catroux, G.; Hartmann, A.; Revellin, C. (2001). Trends in rhizobial inoculant production and use. Plant and soil, 230, 21-30.

- Cevallos-Casals, B.A.; Cisneros-Zevallos, L. (2010). Impact of germination on phenolic content and antioxidant activity of 13 edible seed species. *Food Chemistry*, 119, 1485-1490.
- Chang, C.; Damiani, I.; Puppo, A.; Frendo, P. (2009). Redox changes during the legume-*Rhizobium* symbiosis. *Molecular Plant*, 2, 370-377.
- Colletier, J-P.; Fournier, D.; Greenblatt, H.M.; Stojan, J.; Sussman, J.L.; Zaccari, G.; Silman, I.; Weik, M. (2006). Structural insights into substrate traffic and inhibition in acetylcholinesterase. *The EMBO journal*, 25, 2746-2756.
- Core, R. J., Henning, J.H., Torresdey, J. G. (1994). Volatile compounds from *Medicago* spp. as potential signals for alfalfa weevil response. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 2932-2936.
- Correa, C.R.; Li, L.; Aldini, G.; Carini, M.; Chen, C.O.; Chun, H.; Cho, S.; Park, K.; Russell, R. M.; Blumberg, J. B.; Yeum, K. (2010). Composition and stability of phytochemicals in five varieties of black soybean (*Glycine max*). *Food Chemistry*, 123, 1176-1184.
- Cots, J., Fargeix, C., Gindro, K., & Widmer, F. (2002). Pathogenic attack and carbon reallocation in soybean leaves (*Glycine max* L.): Reinitiation of the glyoxylate cycle as a defence reaction. *Journal of Plant Physiology*, 159, 91–96.
- Couto, C.; Silva, L.R.; Valentão, P.; Velázquez, E.; Peix, A.; Andrade, P.B. (2011). Effects induced by the nodulation with *Bradyrhizobium japonicum* on *Glycine max* (soybean) metabolism and antioxidant potential. *Food Chemistry*, 127, 1487-1495.
- Croteau, R; Kutchan, T.M.; Lewis, N.G (2000). Natural products (secondary metabolites), In *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiology, Rockville, MD, 1250-1319.
- Crozier, A.; Jaganath, I.B.; Clifford, M.N. (2009). Dietary phenolics: Chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports*, 26, 1001–1043.
- Deaker, R.; Roughley, R.J.; Kennedy, I.R. (2004). Legume seed inoculation technology— a review. *Soil Biology & Biochemistry*, 36, 1275–1288.

- Delaquis, P.; Stanich K.; Toivonen, P (2005). Effect of pH on the inhibition of *Listeria* spp. by vanillin and vanillic acid. *Journal of Food Protection*, 68, 1472-1476.
- Devi, M.K.A.; Gondi, M.; Sakthivelu, G.; Giridhar, P.; Rajasekaran, T.; Ravishankar, G.A. (2009). Functional attributes of soybean seeds and products, with reference to isoflavone content and antioxidant activity. *Food chemistry*, 114, 771-776.
- Dewick, P.M. (2002). *Secondary Metabolism: The building blocks and construction mechanisms*. Medicinal Natural Products, John Wiley & Sons, New York, 6-34.
- Dhakal, K.H.; Jeong, Y.; Lee, J.; Baek, I.; Ha, T.; Hwang, Y. (2009). Fatty acid composition in each structural part of soybean seed and sprout. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 12, 97-101.
- Dhaubhadel, S.; Farhangkhomeh, M.; Chapman, R. (2008). Identification and characterization of isoflavonoid specific glycosyltransferase and malonyltransferase from soybean seeds. *Journal of experimental botany*, 59, 981-994.
- Dhaubhadel, S.; McGarvey, B.D.; Williams, R.; Gijzen, M. (2003). Isoflavonoid biosynthesis and accumulation in developing soybean seeds. *Plant Molecular Biology*, 53, 733-743.
- Dilworth, M.J.; James, E.K.; Sprent, J.I.; Newton, W.E. (2008). *Nitrogen-fixing leguminous symbioses*. Edit. Springer, Netherlands.
- Dong, C.; Mei, Y.; Chen, L. (2006). Simultaneous determination of sorbic and benzoic acids in food dressing by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1117, 109-114.
- DSMZ - German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (2004). Disponível online em: <http://www.dsmz.de/microorganisms/html/bacteria.genus/bradyrhizobium.html> (consultado a 5 de Setembro de 2011).

- Dubois, V.; Breton, S.; Linder, M.; Fanni, J.; Parmentier, M. (2007). Fatty acids profiles of 80 vegetable oils with regard to their nutritional potential. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109, 710-732.
- Duchin, F. (2005). Sustainable consumption of food: a framework for analyzing scenarios about changes in diet. *Journal of Industrial Ecology*, 9, 99-114.
- Dudareva, N.; Negre, F.; Orlova, N; Orlova, I. (2006). Plant volatiles: Recent advances and future perspectives. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 25, 417-440.
- Dudareva, N.; Pichersky, E.; Gershenzon, J. (2004). Biochemistry of plant volatiles. *Plant Physiology*, 135, 1893-1902.
- Duh, P.D.; Du, P.C.; Yen, G.C. (1999). Action of methanolic extract of mung bean hulls as inhibitors of lipid peroxidation and nonlipid oxidative damage. *Food Chemistry and Toxicology*, 37, 1055-1061.
- Ezeagu, I.E.; Petzke, K.J.; Lange, E.; Metges, C.C. (1998) Fat content and fatty acid composition of oils extracted from selected wild-gathered tropical plant seeds from Nigeria. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 75, 1031-1036.
- Fait, A.; Angelovici, R.; Less, H.; Ohad, I.; Urbanczyk-Wochniak, E.; Fernie, A.R.; and Galili, G. (2006). *Arabidopsis* seed development and germination is associated with temporally distinct metabolic switches. *Plant Physiology*, 142, 839-854.
- Fall, R.; Karl, T.; Jordan, A.; Lindinger, W. (2001). Biogenic C5 VOC's: release from leaves after freeze-thaw wounding and occurrence in air at a high mountain observatory. *Atmospheric Environment*, 35, 3905-3916.
- Fernandes, P.; Cabral, J.M.S. (2007). Phytosterols: applications and recovery methods. *Bioresource Technology*, 98, 2335-2350.
- Fernandez-Orozco, R.; Frias, J.; Zielinski, H.; Piskula, M.K.; Kozłowska, H.; Vidal-Valverde, C. (2008). Kinetic study of the antioxidant compounds and antioxidant capacity during germination of *Vigna radiata* cv. *Emerald*, *Glycine max* cv. *Jutro* and *Glycine max* cv. *Merit*. *Food Chemistry*, 111, 622-630.

- Ferreira, A.L.A.; Matsubara, L.S. (1997). Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 43, 61-68.
- Fiorentino, A.; Abrosca, B.; Pacifico, S.; Golino, A.; Mastellone, C.; Oriano, P.; Monaco, P. (2007). Reactive oxygen species scavenging activity of flavone glycosides from *Melilotus neapolitana*. *Molecules*, 12, 263-270.
- Fogher, C.; Lorenzoni, C.; Bonardi, P.; De Ninno, M.; Lacertosa, G.; Pino, S. (1998). Inoculo con Azospirillo su mais. *Informatore Agrario*, 8, 53–56.
- Formigoni, A.; Biagi, G.; Piva, A.; Pezzi, P. (2003). The drying method affects the organic acid content of alfalfa forages. *Italian Journal of Animal Science*, 2, 243-245.
- Fukui, K.; Tachibana, N.; Wanezaki, S. Tsuzaki, S.; Takamatsu, K.; Yamamoto, T.; Hashimoto, Y.; Shimoda, T. (2002) Isoflavone-free soy protein prepared by column chromatography reduces plasma cholesterol in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5717-5721.
- Gao, G.; Li, D.; Keung, W.M. (2003). Synthesis of daidzin analogues as potential agents for alcohol abuse. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 11, 4069–4081.
- Gerloff, E.D.; Richardson, T.; Stahmann, M.A. (1966). Changes in fatty acids of alfalfa roots during cold hardening. *Plant Physiology*, 41, 1230-1284.
- Gershenzon, J.; McConkey, M.E.; Croteau, R.B. (2000). Regulation of monoterpenes accumulation in leaves of peppermint. *Plant Physiology*, 122, 205–213.
- Geuns, J.M.C. (1973). Variations in sterol composition in etiolated mung bean seedlings. *Phytochemistry*, 12, 103-106.
- Ghavidel, R.A.; Prakash, J. (2007). The impact of germination and dehulling on nutrients, antinutrients, in vitro iron and calcium bioavailability and *in vitro* starch and protein digestibility of some legume seeds. *LWT Food Science and Technology*, 40, 1292-1299.

- Gijs, L., Perpète, P., Timmermans, A., Collin, S (2000). 3-Methylthiopropionaldehyde as precursor of dimethyl trisulfide in aged beers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 6196-6199.
- Gil, M.I.; Tomás-Barberán, F.A.; Hess-Pierce, B.; Holcroft, D.M.; Kader, A.A. (2000). Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 4581-4589.
- Goff, S.A.; Klee, H.J. (2006). Plant volatile compounds: Sensory cues for health and nutritional value?. *Science*, 311, 815-819.
- Graham, P.H.; Vance, C.P. (2000). Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. *Field Crops Research*, 65, 93-106.
- Grela; E.R.; Gunter, K.D. (1995). Fatty acid composition and tocopherol content of some legume seeds. *Animal Feed Science and Technology*, 52, 325-331.
- Guedes de Pinho, P.; Gonçalves, R.F.; Valentão, P.; Pereira, D.M.; Seabra, R.M.; Andrade, P.B.; Sottomayor, M. (2009a). Volatile composition of *Catharantus roseus* (L.) G. Don using solid-phase microextraction and gas chromatography mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 49, 674-685.
- Guedes de Pinho, P.; Pereira, D.M.; Gonçalves, R.F.; Valentão, P.; Fernandes, F.; Taveira, M.; Andrade, P.B. (2009b). Headspace-solid phase microextraction and gas chromatography mass spectrometry applied to determination of volatiles in natural matrices. In *Functional Plant Science and Biotechnology*; Global Science Books, Japan, Vol. 3, 1-15.
- Harris, W.S.; Mozaffarian, D.; Rimm, E.; Kris-Etherton, P.; Rudel, L.L.; Appel, L.J.; Engler, M.M.; Engler, M.B.; Sacks, F. (2009). Omega-6 fatty acids and cardiovascular disease risk. *Circulation*, 119, 902-907.
- Ho, C. (1992). Phenolic compounds in food; phenolic compounds in food and their effects on health. ACS symposium series; American chemical society, 2-7.

- Ho, H.M. Chen, R.Y.; Leung, L.K.; Chan, F.L.; Huang, Y.; Chen, Z. (2002). Difference in flavonoid and isoflavone profile between soybean and soy leaf. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56, 289-295.
- Hou, W.; Lin, R.; Lee, T.; Huang, Y.; Hsu, F.; Lee, M. (2005). The phenolic constituents and free radical scavenging activities of *Gynura formosana* Kiamnra. *Journal of the Food and Agriculture*, 85, 615-621.
- Housome, N.; Housome, B.; Tomos, D.; Edwards-Jone, G. (2008). Plant metabolites and nutritional quality of vegetables. *Journal of Food Science*, 73, R48-R65.
- Hras, A.R.; Hadolin, M.; Knez, Z.K.; Bauman, D. (2000). Comparison of antioxidative and synergistic effects of rosemary extract with  $\alpha$ -tocopherol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil. *Food Chemistry*, 71, 229-233.
- Ibrahim, M.A. (2001). Insecticidal, repellent, antimicrobial activity and phytotoxicity of essential oils: With special reference to limonene and its suitability for control of insect pests. *Agricultural and Food Science in Finland*, 10, 243-259.
- Jom, K.N.; Frank, T.; Enzel, K. (2010). A metabolites profiling approach to follow the sprouting process of mung beans (*Vigna radiata*). *Metabolomics*, 7, 102-117.
- Jong, A.; Plat, J.; Mensink, R.P. (2003). Metabolic effects of plant sterols and stanols (review). *Journal of Nutritional Biochemistry*, 14, 362-369.
- Judicibus, M. (2011). Botanical notebook. Custom Book center, University of Melbourne, Australia, 103-116.
- Kabara, J.J.; Swieczkowski, D.M.; Conley, A.J.; Truant, J.P. (1972). Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2, 23-28.
- Kamalakkannan, N.; Stanely Mainzen Prince, P. (2006). Rutin improves the antioxidant status in streptozotocin-induced diabetic rat tissues. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 293, 211-219.
- Kaufman, P.B.; Duke, J.; Brielmann, H.; Boik, J.; Hoyt, J.E. (1997). A comparative survey of Leguminous plants as source of the isoflavones, genistein and daidzein:



implications for human nutrition and health. The journal of Alternative and Complementary Medicine, 3, 7-12.

Kaur, C.; Kapoor, H.C. (2002). Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. International Journal of Food Science and Technology, 37, 153-161.

Khaleel, A.E.; Gad, M.Z.; El-Maraghy, S.A.; Hifnawy, M.S.; Abdel-Sattar, E. (2005). Study of hypocholesterolemic and antiatherosclerotic properties of *Medicago sativa* L. cultivated in Egypt. Journal of Food and Drug Analysis, 13, 212-218.

Kim, J.A.; Jung, W.S.; Chun, S.C.; Yu, C.Y.; Ma, K.H.; Gwag, J.G.; Chung, I.M. (2006). A correlation between the level of phenolic compounds and the antioxidant capacity in cooked-with-rice and vegetable soybean (*Glycine max* L.) varieties. European Food Research and Technology, 224, 259-270.

Kim, J.W., Huh, J.E., Kyung, S.H., Kyung, K.H. (2004). Antimicrobial activity of alk(en)yl sulfides found in essential oils of garlic and onion. Food Science and Biotechnology, 13, 235-239.

Klejdus, B.; Mikelová, R.; Petrlová, J.; Potesil, D.; Adam, V.; Stiborova, M.; Hdek, P.; Vacek, J.; Kizek, R.; Kubán, V. (2005). Evaluation of isoflavone aglycon and glycoside distribution in soy plants and soybeans by fast column high-performance liquid chromatography coupled with a diode-array detector. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 5848-5852.

Kneip, C.; Lockhart, P.; Voß, C.; Maier, U. (2007). Nitrogen fixation in eukaryotes – New models symbiosis. BMC Evolutionary Biology, 7, 1-12.

Kris-Etherton, P.M. (1999). Monounsaturated fatty acids and risk of cardiovascular disease. Circulation, 100, 1253-1258.

Kumar, V.; Rani, A.; Solanki, S.; Hussain, S.M. (2006). Influence of growing environment on the biochemical composition and physical characteristics of soybean seed. Journal of Food Composition and Analysis, 19, 188-195.

- Lee, J.H.; Baek, I.; Ko, J.; Kang, N.S.; Kim, H.; Han, W.; Shin, S.; Park, K.; Oh, K.; Ha, T.J.; Park, K.H. (2007). Profiles of compositional components in vegetable soybeans (*Glycine max* (L.) Merr.). *Journal of Applied Biological Chemistry*, 50, 63-69.
- Lee, K., Shibamoto, T. (2000). Antioxidant properties of aroma compounds isolated from soybean and mung beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 4290-4293.
- Lee, S.; Kim, J.; Moon, H.; Ahn, J.; Chun, S.; Jung, W.; Lee, O.; Chung, I. (2008). Analysis of isoflavones and phenolic compounds in Korean soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] seeds of different seed weights. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 2751-2758.
- Levitt, J.L. (1980). Responses of plants to environmental stresses (2nd ed.). Academic Press, New York.
- Libault, M.; Farmer, A.; Brechenmacher, L.; Franck, W.L.; Drnevich, J.; Langley, R.J.; Bilgin, D.D.; Radman, O.; Clough, S.J.; May, G. (2010). Complete transcriptome of the soybean root hair cell, a single cell model, and its alteration in response to *Bradyrhizobium japonicum* infection. *Plant Physiology*, 52, 541-552.
- Limpens, E; Bisseling, T. (2003). Signaling in symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology*, 6, 343-350.
- Liu, K. (1997). Soybeans: Chemistry, technology and utilization. Chapman & Hall, New York, 1-10.
- Lopes, G.; Sousa, C.; Bernardo, J.; Andrade, P.B.; Valentão, P.; Ferreres, F.; Mouga, T. (2011). Sterol profile in 18 macro algae of the portuguese coast. *Journal of Phycology*, 47, 1210-1218.
- López-Bucio, J.; Nieto-Jacobo, M.F.; Ramírez-Rodríguez, V.; Herrera-Estrella, L. (2000). Organic acid metabolism in plants: from adaptive physiology to transgenic varieties for cultivation in extreme soils. *Plant Science*, 160, 1-13.
- López-Lázaro, M. (2009). Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin. *Mini-reviews in Medicinal Chemistry*, 9, 31-59.

- Machado, A.L.L.; Barcelos, M.F.P.; Teixeira, A.H.R.; Nogueira, D.A. (2009). Avaliação de componentes químicos em brotos de *Fabaceae* para o consumo humano. *Ciência e Agrotecnologia*, 33, 1071-1078.
- Madar, Z.; Stark, A.H. (2002). New legume source as therapeutic agents. *British Journal of Nutrition*, 88, S287-S292.
- Maestri, D.M.; Labuckas, D.O.; Meriles, J.M.; Lamarque, A.L.; Zygadlo, J.A.; Guzman, C.A. (1998). Seed composition of soybean cultivars evaluated in different environmental regions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77, 494-498.
- Maffei, M.E. (2010). Sites of synthesis, biochemistry and functional role of plant volatiles. *South African Journal of Botany*, 76, 612-631.
- Makoi, J.H.J.R.; Ndakidemi, P.A. (2007). Biological, ecological and agronomic significance of plant phenolic compounds in rhizosphere of the symbiotic legumes. *African Journal of Biotechnology*, 6, 1358-1368.
- Malencic, D.; Popovic, M.; Miladinovic, J. (2007). Phenolic content and antioxidant properties of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) Seeds. *Molecules*, 12, 576-581.
- Martin, C.A.; Almeida, V.V.; Ruiz, M.R.; Visentainer, J.E.L.; Matshushita, M.; Souza, N.E.; Visentainer, J.V. (2006) Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: importance and occurrence in foods. *Revista de Nutrição, Campinas*, 19, 761-770.
- Martinez, A.P.C.; Martinez, P.C.C.; Souza, M.C.; Brazaca, S.G.C. (2011). Alterações químicas em grãos de soja com a germinação. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 31, 23-30.
- Martins, J.M.; Bento, O.P. (2007). As leguminosas como alimentos funcionais: o caso das dislipidémias e das doenças cardiovasculares. *Revista de Ciências Agrárias*, 30, 384-399.
- Márton, M., Mandoki, Z., Csapso-Kiss, Z., Csapó, J. (2010). The role of sprouts in human nutrition. A review. *Acta Universitatis Sapientiae, Alimentaria*, 3, 81-117.
- Maskarinec, S., (2003). The effect of phytoestrogens on hot flashes. *Nutrition Bytes*, 9, 1-9.

- Mattila, P.; Hellstrom, J. (2007) Phenolic acids in potatoes, vegetables, and some of their products. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 152-160.
- Mazur, W.M.; Duke, J. A.; Wahala, K.; Rasku, S.; Adlercreutz, H. (1998). Isoflavonoids and lignans in legumes: Nutricional and health aspects in humans. *Nutritional Biochemistry*, 9, 193-200.
- Meagher, R. L. (2001). Collection of soybean looper and other noctuids in phenylacetaldehyde-baited field traps. *Florida Entomologist*, 84, 154-155.
- Millar, A.A.; Smith, M.A.; Kunst, L. (2000). All fatty acids are not equal: discrimination in plant membrane lipids. *Trends in Plant Science Reviews*, 5, 95-101.
- Miranda, G.V.; Coelho, A.D.F.; Shimoya, A.; Coimbra, R.R.; Santos, I.C. (1999). Divergência genética de linhagens de feijão-mungo (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). *Revista Ceres*, 46, 309-319.
- Mohamed, A.; Rao, M.S.S.; Mebrahtu, T. (2001). Nutritional and health benefits of vegetable soybean: beyond protein and oil. p. 131–134. In: T.A. Lumpkin and S. Shanmugasundaram (Compilers), 2nd Int. Vegetable Soybean Conference, Washington State Univ., Pullman, WA.
- Mol, S.D.; Raja, B. (2010). Therapeutic effects of vanillic acid on acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *International Journal of Pharmaceutics & Biological Archives*, 1, 144-149.
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH<sup>•</sup>) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26, 211-219.
- Moraes, F.P.; Colla, L.M. (2006) Alimentos funcionais e nutraceuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. *Revista Electrónica de Farmácia*, 3, 109-122.
- Mrowietz, U.; Christophers, E.; Altmeyer, P. (1999). Treatment of severe psoriasis with fumaric acid esters: scientific background and guidelines for therapeutic use. *British Journal of Dermatology*, 141, 424-429.

- Mukherjee, P. K.; Kumar, V.; Mal, M.; Houghton, P. J. (2007). Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine*, 14, 289-300.
- Muller, J.; Wiemken, A.; Boller, T. (2001). Redifferentiation of bacteria isolated from *Lotus japonicus* root nodules colonized by *Rhizobium* sp. NGR234. *Journal of Experimental Botany*, 52, 2181-2186.
- Murphy, P.A.; Song, T.; Buseman, G.; Barua, K.; Beecher, G.R.; Trainer, D.; Holden, J. (1999). Isoflavones in retail and institutional soy foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 2697-2704.
- Nakamura, Y.; Kaihara, A.; Yoshii, K.; Tsumura, Y.; Ishimitsu, S.; Tonogai, Y. (2001). Content and composition of isoflavonoids in mature or immature beans and bean sprouts consumed in Japan. *Journal of Health Science*, 47, 394-406.
- Nascimento, G.G.F.; Locatelli, J.; Freitas, P.C.; Silva, G.L. (2000). Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31, 247-256.
- Novikova, T.L. (1994). Influence of natural phenols on *Trifolium pratense-Rhizobium trifoli* symbiosis. *Acta Horticulturae*, 381, 421-424.
- Oh, M.; Rajashekar, C.B. (2009). Antioxidant content of edible sprout: effects of environmental shocks. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89, 2221-2227.
- Ohlrogge, J. B. (1997). Regulation of fatty acids synthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48, 109-136.
- Oliveira, A.C.; Valentim, I.B.; Goulart, M.O.F.; Silva, C.A.; Bechara, E.J.H.; Trevisan, M.T.S. (2009b). Fontes vegetais naturais de antioxidantes. *Química Nova*, 32, 689-702.
- Oliveira, A.P.; Valentão, P.; Pereira, J.A.; Silva, B.M.; Tavares, F.; Andrade, P.B. (2009a). *Ficus carica* L.: Metabolic and biological screening. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 2841-2846.
- Olthof, M.R.; Hollman, P.C.H.; Katan, M.B. (2001). Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *Journal of Nutrition*, 131, 66-71.

- Omoni, A.O.; Aluko, R.E. (2005). Soybean foods and their benefits: Potential mechanisms of action. *Nutrition Reviews*, 63, 272-283.
- Orhan, I.; Özçelik, B.; Kartal, M.; Aslan, S.; Sener, B.; Ozguven; M. (2007). Quantification of daidzein, genistein and fatty acids in soybean and soy sprouts, and some bioactivity studies. *Acta Biologica Cracoviensia Série Botanica*, 49, 61-68.
- Ortega, C; López, R.; Cacho, J.; Ferreira, V. (2001). Fast analysis of important wine volatile compounds development and validation of a new method based on gas chromatographic–flame ionisation detection analysis of dichloromethane microextracts. *Journal of Chromatography A*, 923, 205 –214.
- Paiva, L.N. (2000). An introduction to the biosynthesis of chemicals used in plant-microbe communication. *Journal of Plant Growth Regulation*, 19, 131-143.
- Panzieri, M.; Marchettini, N.; Hallam, T.G. (2000). Importance of the *Bradyrhizobium japonicum* symbiosis for the sustainability of a soybean cultivation. *Ecological Modeling*, 135, 301-310.
- Piironen, V.; Lindsay, D.G.; Miettinen, T.A.; Toivo, J.; Lampi, A. (2000). Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 939-966.
- Piironen, V.; Toivo, J.; Puupponen-Pimiä, R.; Lampi, A. (2003). Plant sterols in vegetables, fruits and berries. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 330-337.
- Pourmorad, F.; Hosseinimehr, S.J.; Shahabimajd, N. (2006). Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*, 5, 1142-1145.
- Prakash, D.; Upadhyay, G.; Singh, B.N.; Singh, H.B. (2007). Antioxidant and free radical-scavenging activities of seeds and agri-wastes of some varieties of soybean (*Glycine max*). *Food chemistry*, 104, 783-790.
- Prell, J.; Poole, P. (2006). Metabolic changes of rhizobial in legume nodules. *Trends in Microbiology*, 14, 161-168.

- Randhir, R.; Lin, Y.; Shetty, K. (2004). Stimulation of phenolics, antioxidant and antimicrobial activities in dark germinated mung bean sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors. *Process Biochemistry*, 39, 637-646.
- Rassini, J.B.; Ferreira, R.P.; Moreira, A.; Vilela, D. (2007). Avaliação de cultivares de alfafa na região de São Carlos, São Paulo. *Boletim de Indústria Animal*, 4, 289-293.
- Raybaudi-Massilia, R. M.; Jonathan Mosqueda-Melgar, J.; Martín-Belloso, O. (2009). Antimicrobial activity of malic acid against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* O157:H7 in apple, pear and melon juices. *Food Control*, 20, 105–112.
- Rees, T.A.P. (1990). Carbon metabolism in mitochondria, in: D.T. Dennis, D.H. Turpin (Eds.), *Plant Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*, Longman, 106–143.
- Ribeiro, B.; Guedes de Pinho, P.; Andrade, P.B.; Baptista, P.; Valentão, P. (2009). Fatty acid composition of wild edible mushrooms species: a comparative study. *Microchemical Journal*, 93, 29-35.
- Rodríguez-Navarro, D.N.; Oliver, I.M.; Contreras, M.A.; Ruiz-Sainz, J.E. (2011). Soybean interactions with soil microbes, agronomical and molecular aspects. *Agronomy for Sustainable Development*, 31, 173-190.
- Ros, E. (2003). Dietary *cis*-monounsaturated fatty acids and metabolic control in type 2 diabetes. *American Journal of Clinical Nutrition*, 78, 617S-625S.
- Roth, L.E.; Stacey, G. (1989). Bacterium release into host cells of nitrogen fixing soybean nodules: the symbiosome membrane comes from three sources. *European Journal of Cell Biology*, 49, 13-23.
- Ruth, S.M., Dings, L., Aprea, E., Odake, S. (2005). Comparison of volatile flavour profiles of kidney beans and soybean by GC-MS and PTR-MS. *Food Science and Technology Research*, 11, 63-70.
- Saharan, B.S.; Nehra, V. (2011). Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Sciences and Medicine Research*, 21; 1-30.

- Sakthivelu, G.; Devi, M.K.A.; Giridhar, P.; Rajasekaran, T.; Ravishankar, G.A.; Nikolova, M.T.; Angelov, G.B.; Todorova, R.M.; Kosturkova, G.P. (2008). Isoflavone composition, phenol content and antioxidant activity of soybean seeds from India and Bulgaria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 2090-2095.
- Sami, A.; Taru, M.; Salme, K.; Jari, Y., (2006). Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin. *European Journal of Pharmacology Sciences*, 29, 1-13.
- Sánchez-Machado, D.I.; López-Hernández, J.; Paseiro-Losada, P.; López-Cervantes, J. (2004). An HPLC method for the quantification of sterols in edible seaweeds. *Biomedical Chromatography*, 18, 183-190.
- Santos, F.A., Rao, V.S.N. (2000). Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. *Phytotherapy Research*, 14, 240–244.
- Seabra, R. M., Andrade, P. B., Valentão, P., Fernandes, E., Carvalho, F., & Bastos, M. L. (2006). Anti-oxidant compounds extracted from several plant materials. In *Biomaterials from aquatic and terrestrial organisms*. New Hampshire: Science Publishers – Enfield (NH) Jersey Plymouth.
- Seco, R.; Peñuelas, J.; Filella, I. (2007) Short-chain oxygenated VOCs: emission and uptake by plants and atmospheric source, sinks and concentrations, *Atmospheric Environment*, 41, 2477-2499.
- Seneviratne, G.; Jayasinghearachchi, H.S. (2003). Phenolic acids: possible agents of modifying N<sub>2</sub>-fixing symbiosis through rhizobial alteration?. *Plant and Soil*, 252, 385–395.
- Serraj, R.; Sinclair, T.R.; Purcell, L.C. (1999). Symbiotic N<sub>2</sub> fixation response to drought. *Journal of Experimental Botany*, 50, 143-155;
- Shi, H.; Nam, P.K.; Ma, Y. (2010). Comprehensive Profiling of isoflavones, phytosterols, tocopherols, minerals, crude protein, lipid and sugar during soybean



(*Glycine max*) germination. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58, 4970-4976.

Shi, J.; Yu, J.; Pohorly, J.E.; Kakuda, Y. (2003). Polyphenolics in grape seeds - biochemistry and functionality. Journal of Medicinal Food, 6, 291-299.

Singh, B.; Sharma, R.A.; Vyas, G.K.; Sharma, P. (2011). Estimation of phytoconstituents from *Cryptostegia grandiflora* (Roxb.) R. Br. *in vivo* and *in vitro*. II. Antimicrobial screening. Journal of Medicinal Plants Research, 5, 1598-1605.

Soreq, H.; Seidman, S. (2001). Acetylcholinesterase - new roles for an old actor. Nature Reviews Neuroscience, 2, 294-302.

Stacey, G.; Libault, M.; Brechenmacher, L.; Wan, J.; May, G.D. (2006). Genetics and functional genomics of legume nodulation. Current Opinion in Plant Biology, 9, 110-121.

Staudt, M.; Bertin, N. (1998). Light and temperature dependence of the emission of cyclic and acyclic monoterpenes from holm oak (*Quercus ilex* L.) leaves. Plant Cell Environment, 21, 385-395.

Stowers, M.D. (1985). Carbon metabolism in *Rhizobium* spp. Annual Review of Microbiology, 39, 89-108.

Stumpf, D. K.; Burris, R.H. (1981). Organic acid contents of soybean: age and source of nitrogen. Plant Physiology, 68, 989-991.

Subramanian, S.; Stacey, G.; Yu, O. (2007). Distinct, crucial roles of flavonoids during legume nodulation. Trends Plant Science, 12, 282-285.

Tarpey, M.M.; Fridovich, I. (2001). Methods of detection of vascular reactive species: nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. Circulation Research, 89, 224-236.

Taveira, M.; Silva, L.R.; Vale-Silva, L.A.; Pinto, E.; Valentão, P.; Ferreres, F.; Guedes de Pinho, P., Andrade, P.B. (2010). *Lycopersicon esculentum* seeds: an industrial byproduct as an antimicrobial agent. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58, 9529-9536.

Toivo, J.; Phillips, K.; Lampi, A.M.; Piironen, V. (2001). Determination of sterols in foods: recovery of free, esterified, and glycosidic sterols. *Journal of Food Composition and Analysis*, 14, 631-643.

Trevisan, M.T.S.; Macedo, F.V.V. (2003). Selecco de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da doena de Alzheimer. *Quimica Nova*, 26, 301-304.

Valento, P.; Lopes, G.; Valente, M.; Barbosa, P.; Andrade, P.B.; Silva, B.S.; Baptista, P.; Seabra, R.M. (2005). Quantification of nine organic acids in wild mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3626–3630.

Valko, M.; Thodes, C.J.; Moncol, J.; Izakovix, M.; Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160, 1–40.

Van Heerden, P.D.R.; De Beer, M.; Mellet, D.J.; Maphike, H.J.; Foit, W. (2007) Growth media effects on shoot physiology, nodule numbers and symbiotic nitrogen fixation in soybean. *South Africa Journal of Botany*, 73, 600-605.

van Rossum, D.; Schuuramns, F.B.; Gillis, M.; Muyotcha, A.; van Versveld, H.W.; Stouthamer, A.H.; Boogerd, F.C. (1995). Genetic and phenetic analyses of *Bradyrhizobium* strains nodulating peanut (*Arachis hypogaea* L.) roots. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 1599–1609.

Venter, C.S.; Eyssen, E. (2001). More legumes for better overall health. *South African Journal of Clinical Nutrition*, 14, S32-S37.

Vieira, R.F (2007). Diversidade e taxonomia de rizbio; microbiota do solo e qualidade ambiental. Instituto Agronmico Campinas (SP), 165-171.

Vincent, J.M. (1970). The cultivation, isolation and maintenance of rhizobia. A manual for the practical study of root nodule. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1-13.

Walters, D.R.; Walker, R.L.; Walker, K.C. (2003). Lauric acid exhibits antifungal activity against plant pathogenic fungi. *Journal of Phytopathology*, 151, 228-230.

WHO-FAO-Codex Standard for Certain Pulses CODEX STAN 171-1989 (Rev. 1-1995). (2007). Cereals, pulses, legumes and vegetable proteins. First edition World Health Organization Food and Agriculture Organization of The United Nations Rome.

Willems, A.; Doignon-Bourcier, F.; Goris, J.; Coopman, R.; Lajudie, P.; Vos, P.; Gillis, M. (2001). DNA–DNA hybridization study of *Bradyrhizobium* strains. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 1315–1322.

Williams, C.M. (2000). Dietary fatty acids and human health. *Annales de Zootechnie*, 49, 165-180.

Yalpani, N.; Léon, J.; Lawton, M.A.; Raskin, I. (1993). Pathway of salicylic acid biosynthesis in healthy and virus-inoculated tobacco. *Plant Physiology*, 103, 315-321.

Yamashita, S., Sakane, T., Harada, M., Sugiura, N., Koda, H., Kiso, Y., Sezaki, H. (2002). Absorption and metabolism of antioxidative polyphenolic compounds in red wine. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 957, 325–328.

Yinbo, G.; Peoples, M.B.; Rerkasem, B. (1997). The effect of N fertilizer strategy on N<sub>2</sub> fixation, growth and yield of vegetable soybean. *Field Crops Research*, 51, 221-229.

Yu, J.; Wang, L.; Walzem, R.L.; Miller, E.G.; Pike, L.M.; Patil, B.S. (2005). Antioxidant activity of citrus limonoids, flavonoids, and coumarins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2009-2014.

Zeikus, J.G.; Jain, M.K.; Elankovan, P. (1999). Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51, 545-552.

Zheng, C.J.; Yoo, J.; Lee, T.; Cho H.; Kim, Y.; Kim, W. (2005). Fatty acids synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids. *FEBS Letters*, 579, 5157-5162.