

AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DAS ISOFLAVONAS EM EXTRATO DE SOJA

EVALUATION OF THE STABILITY OF ISOFLAVONES IN SOYMILK

CUNHA, C.P.¹; FELBERG, I.²; GODOY, R.L.O.²; PEREIRA, J.N.³; OLIVEIRA, D.R.²; PACHECO, S.²; BRAZ FILHO, R.⁴.

¹Bolsista de pós-graduação CAPES programa PPGQ, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ; e-mail: *carolpassos_c@hotmail.com*

²Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ;

³Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.

⁴Pesquisador Emérito –FAPERJ/UENF/UFRRJ;

Resumo

A soja e seus produtos vêm sendo amplamente estudados devido ao seu alto valor nutricional e presença de compostos bioativos, como as isoflavonas. Estas podem funcionar como moduladores hormonais naturais, além de possuírem atividade antioxidante. No entanto, a estabilidade destes compostos é importante para sua função biológica e alterações nas suas estruturas químicas podem ocorrer tanto no processamento quanto no armazenamento. Desta forma, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a estabilidade de isoflavonas em extrato de soja congelado durante 120 dias. O extrato de soja foi submetido à análise de isoflavonas por cromatografia líquida de alta eficiência, conforme método oficial da AOAC. As análises foram realizadas com 0, 7, 15, 30, 60, 90 e 120 dias de armazenamento. As estruturas das isoflavonas foram confirmadas por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN¹H) e carbono-13 (RMN¹³C). Verificou-se que até 120 dias não houve variação no teor de isoflavonas totais e individuais em agliconas no produto armazenado.

Introdução

O consumo de soja vem crescendo mundialmente, o Brasil é o segundo maior produtor mundial, ficando apenas atrás dos Estados Unidos, na safra 2009/2010 produziu 68,7 milhões de toneladas (EMBRAPA, 2011). A soja (*Glycine Max* L. Merrill) é uma leguminosa considerada um alimento funcional, além de ser um alimento rico em proteína e possuir outros componentes benéficos à saúde humana. Seu consumo está associado à redução de risco de várias doenças, como câncer de mama, próstata e outras formas de câncer hormônio dependentes, osteoporose e doenças cardíacas (MESSINA *et al.* 2009).

Dentre os vários componentes da soja, as isoflavonas têm recebido atenção especial, pois além de possuir atividade antioxidante (LIANG *et al.*, 2010, BARBOSA *et al.* 2011) podem funcionar como moduladores hormonais naturais (LIU *et al.*, 2010, SANCHES *et al.* 2010) por possuírem similaridades funcionais ao estrogênio humano 17- β -estradiol (GENOVESE & LAJOLO, 2002; MESSINA *et al.*, 2006). Ambos possuem uma hidroxila ligada ao anel aromático e outra hidroxila a uma distância idêntica da primeira (WUTTKE *et al.*, 2007).

Extrato de soja é o produto obtido a partir da emulsão aquosa resultante da hidratação dos grãos de soja, convenientemente limpos, seguido de processamento tecnológico adequado, adicionado ou não de ingredientes opcionais permitidos, podendo ser submetido à desidratação, total ou parcial (BRASIL, 1978), sendo que o extrato líquido deve apresentar no mínimo 3% de proteína e o extrato em pó no mínimo 40% (BRASIL, 2005). É importante levar em consideração que a composição química do extrato de soja, incluindo os teores de isoflavonas, varia de acordo com a matéria-prima e o processamento dos grãos (CIABOTTI *et al.*, 2006).

Tendo demonstrado a importância das isoflavonas em soja e em produtos derivados, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a estabilidade de isoflavonas em extrato de soja líquido congelado a -18°C durante 120 dias.

Material e Métodos

Extração de isoflavonas

A extração e quantificação das isoflavonas foi baseada no método da AOAC (2005). A separação cromatográfica foi realizada em coluna C₁₈, YMC (250x4,6mm com partícula de 5µm), à 45°C, com fluxo de 1,3mL/min em modo de eluição gradiente (Tabela 1) de Fase A (metanol:ácido acético 98:2) e Fase B (água:metanol:ácido acético 88:10:2), e volume de injeção igual a 25µL. A faixa de comprimento de onda utilizada foi de 200 à 400nm, o espectro foi extraído à 260nm. O teor de isoflavonas totais foi expresso em mg de aglicona por 100g, multiplicando-se o teor do derivado glicosídico pela razão entre o peso molecular da aglicona equivalente e do derivado glicosídico (KLUMP *et al*, 2001).

Tabela 1. Gradiente de eluição da fase móvel

Tempo	Fase A	Fase B
---- min ----	---- % ----	---- % ----
0,00	90	10
30,00	40	60
30,05	0	100
35,00	0	100
35,05	90	10
45,00	90	10

Estudo de estabilidade

O extrato de soja foi obtido por processamento dos grãos. Deste extrato, foi retirada uma alíquota para extração e análise de isoflavonas (dia 0). O restante do extrato de soja foi dividido em alíquotas que foram acondicionadas em congelador. Periodicamente, duas amostras foram retiradas do congelador e submetidas à análise em duplicata quanto ao teor de isoflavonas (Tabela 2).

Tabela 2. Periodicidade da análise

Alíquota do extrato	Tempo
	-----dias-----
1	0
2	7
3	15
4	30
5	60
6	90
7	120

Espectros de ressonância magnética nuclear (RMN)

Todos os espectros de RMN foram adquiridos em um espectrômetro Bruker DRX-500 (operando a 499,80 e 125.69MHz para ¹H e ¹³C, respectivamente) existente no Programa de Pós-graduação em Química da UFRRJ. Os deslocamentos químicos (δ_H e δ_C) em p.p.m foram referenciados com base nos correspondentes valores residuais do solvente MeOD (δ_H 3.31 e δ_C 49.15) usado. As constantes de acoplamento (J) foram registradas em Hz. Os espectros heteronucleares 2D HSQC (¹H-¹³C-COSY-¹J_{CH}) e HMBC (¹H-¹³C-COSY-ⁿJ_{CH}, n=2 e n=3) foram adquiridos com 8 transições/128 incrementos e 4 transições/128 incrementos, respectivamente. Para os espectros homonucleares 2D COSY-¹H-1H foram usadas larguras espectrais de 5000Hz em ambas as dimensões e o número normal de transições.

Resultados e Discussão

No extrato de soja foram detectadas as isoflavonas daidzina, daidzeína, genistina e genisteína (Figura 1).

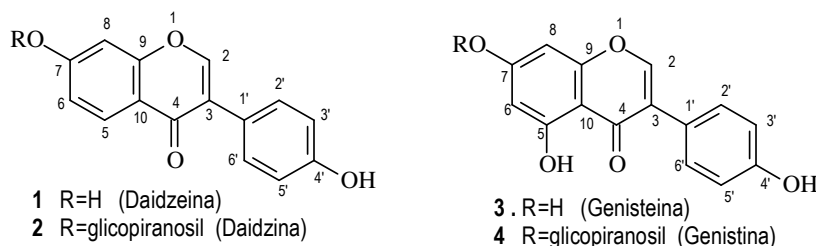


Figura 1. Estruturas das isoflavonas (daidzina, genistina, daidzeína e genisteína) detectadas no extrato de soja

Estas estruturas foram confirmadas definitivamente através da interpretação de dados espectrais de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN¹H) e carbono-13 (RMN¹³C), envolvendo experiências uni- (1D) e bidimensionais (2D).

A Tabela 3 apresenta o teor das isoflavonas individuais em equivalente em agliconas para as isoflavonas glicosídicas e isoflavonas totais.

Tabela 3. Média da concentração de cada isoflavona em equivalente em agliconas para as isoflavonas glicosídicas, isoflavonas totais (± desvio padrão)

Dia	Média da concentração (mg/100g) em equivalente em aglicona (± desvio padrão)						
	Daidzeína	Gliciteína	Genisteína	Daidzina	Glicitina	Genistina	Totais
0	0,28±0,01	ND	0,34±0,02	7,36±0,39	ND	10,52±0,22	18,49±0,43
7	0,25±0,02	ND	0,34±0,03	8,63±0,62	ND	11,41±0,70	20,02±2,12
15	0,26±0,01	ND	0,31±0,01	8,21±0,13	ND	11,11±0,24	19,89±0,37
30	0,24±0,01	ND	0,32±0,01	7,86±0,07	ND	10,78±0,09	19,20±0,15
60	0,28±0,05	ND	0,37±0,10	8,57±0,11	ND	11,17±0,10	20,39±0,22
90	0,27±0,03	ND	0,36±0,01	8,12±0,27	ND	10,84±0,32	19,58±0,61
120	0,25±0,01	ND	0,33±0,02	8,37±0,22	ND	10,83±0,28	19,78±0,52

ND= Não detectado

A Figura 2 sumariza o teor relativo de cada isoflavona (daidzina, genistina, daidzeína e genisteína) e isoflavonas totais por dia de ensaio.

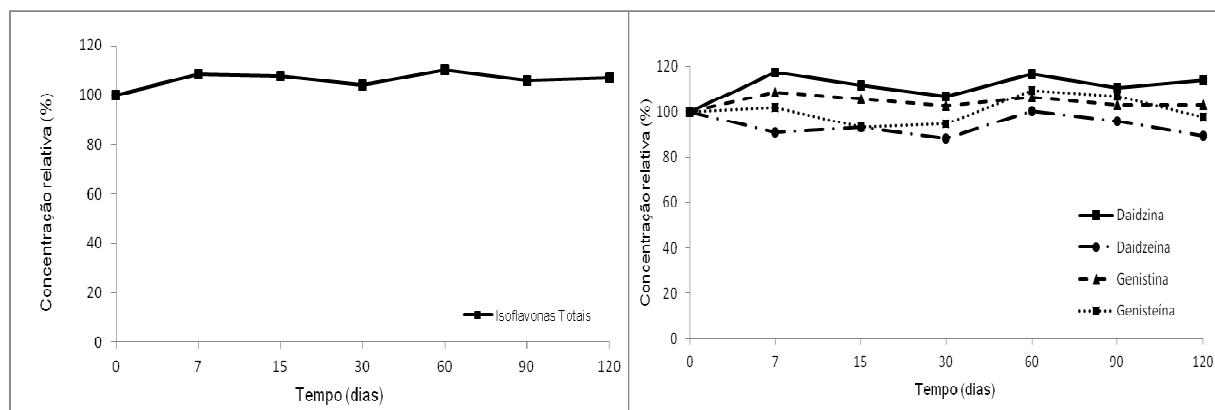


Figura 2. Concentração de isoflavonas totais e individuais (daidzina, genistina, daidzeína e genisteína) em porcentagem relativa por dia de ensaio.

Não foi observada tendência de alteração na concentração de isoflavonas durante o período avaliado. A pequena variação observada é devido à análise ter sido realizada em dias diferentes. Portanto as isoflavonas mantiveram-se estáveis durante o período avaliado, tanto individualmente quanto o teor de isoflavonas totais.

Conclusão

O teor de isoflavonas totais e individuais em equivalente em agliconas permaneceu estável durante o período estudado. Períodos maiores serão avaliados.

Referências

AOAC. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**; 18th ed. AOAC: Gaithersburg, Maryland, 2005.

BARBOSA, A.C.; LAJOLO, F.M.; GENOVESE, M.I. Effect of free or protein-associated soy isoflavones on the antioxidant status in rats. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 91, p. 721–731, 2011.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução - ANVISA n°268/2005, de 22/09/2005. Regulamento técnico para produtos protéicos de origem vegetal. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 23 de set. 2005.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução - ANVISA n°14/1978, de 28/06/1978. Padrão de identidade e qualidade para farinha desengordurada de soja, proteína texturizada de soja, proteína concentrada de soja, proteína isolada de soja e extrato de soja. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 28 de jun. 1978.

CIABOTTI, S.; BARCELLOS, M. F. P.; MANDARINO, J. M. G.; TARONE, A. G. Avaliações químicas e bioquímicas dos grãos, extratos e tofus de soja comum e de soja livre de lipoxigenase. **Ciência agrotecnologia, Lavras**, v. 30, n. 5, p. 920-929, 2006.

EMBRAPA. A Soja. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=22&cod_pai=16>. Acesso em: 10 de dezembro de 2011.

GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Isoflavones in soy-based foods consumed in Brazil: levels, distribution, and estimated intake. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 20, p. 5987-5993, 2002.

KLUMP, P.S.; ALLRED, M.C.; MACDONALD, J.L.; BALLAM, J.M. Determination of isoflavone in soy and selected foods containing by extraction, saponification, and liquid chromatography: collaborative study. **Journal of AOAC International**. v. 84, n. 6, p. 1865-1883, 2001.

LIANG, X.; WANG, X.; LI, Z.; HAO, Q.; WANG, S.. Improved in Vitro Assays of Superoxide Anion and 1,1-Diphenyl- 2-picrylhydrazyl (DPPH) Radical-Scavenging Activity of Isoflavones and Isoflavone Metabolites. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 58, p.11548–11552, 2010

LIU, Z.; HO, S.; CHEN, Y.; HO, Y. A mild favorable effect of soy protein with isoflavones on body composition - a 6-month double-blind randomized placebo-controlled trial among Chinese postmenopausal women. **International Journal of Obesity**. v. 34, p. 309–318, 2010.

MESSINA, M.; MCCASKILL-STEVENSON, W.; LAMPE, J. W. Addressing the Soy and Breast Cancer Relationship: Review, Commentary, and Workshop Proceedings. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 98, n. 18, p. 1275-1284, 2006

MESSINA, M., WATANABE, S.; SETCHELL, K.D.R. Report on the 8th international symposium on the role of soy in health promotion and chronic disease prevention and treatment. **Journal of Nutrition**, v. 139, n. 4, p. 796S-802S, 2009.

SANCHES, T. R.; GOMES, A. B.; LOPES, V. A.; COSTA, L. R. L. G.; MOSCA, L. M. Avaliação dos sintomas climatéricos na mulher em menopausa e pós-menopausa em uso de proteína isolada de soja. **Journal Health Sciences Institute**. v. 28, n. 2, p. 169-73, 2010.

WUTTKE, W.; JARRY, H.; SEIDLOVÁ-WUTTKE, D. Isoflavones-Safe food additives or dangerous drugs? **Ageing Research Reviews**, Amsterdam, v. 6, n. 2, p. 150-188, 2007.