

Determinação de Isoflavonas e Inibidor de Tripsina de Kunitz em Grãos e Extratos Solúveis de Soja, obtidos de Cultivares Especiais para Alimentação Humana

OLIVEIRA, E.F.¹; SILVA, S.O.¹; SILVA, J.B.¹; OLIVEIRA, G.B.A.², CAMPOS-FILHO, P.J.²; MANDARINO, J.M.G.³; CARRÃO-PANIZZI, M.C.³; ¹Universidade Estadual de Londrina – UEL, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445 Km 380, Caixa Postal 6001, CEP 86051-990, Londrina PR; ²Universidade Norte do Paraná – UNOPAR; ³Embrapa Soja.

A produção de soja no Brasil está voltada para exportação de grãos, alimentação animal e para consumo humano. Apesar de seu elevado valor nutricional, os grãos de soja apresentam fatores antinutricionais como os inibidores de protease (inibidor de tripsina de Kunitz-KSTI), que são reduzidos no processamento. O inibidor de tripsina liga-se à enzima tripsina, responsável pela digestão de proteínas, impedindo assim a absorção dessas proteínas, causando redução no crescimento e desenvolvimento de humanos e de animais (Rackis, 1981). Os inibidores de proteases são termolábeis, sendo, portanto, parcialmente destruídos pelo processamento térmico como a torra ou cozimento dos grãos (Nelson *et. al.*, 1979). Esses compostos possuem ação antioxidante complexando radicais livres e podem atuar na redução dos riscos de alguns tipos de câncer, bem como no aumento da imunocompetência do organismo (Messina *et. al.*, 1994). As isoflavonas têm sido estudadas quanto aos seus efeitos biológicos benéficos à saúde humana, tais como: atividade estrogênica, antiestrogênica (sintomas da síndrome de climatério e da osteoporose) (Dalais *et. al.*, 1998; Molteni *et. al.*, 1995), hipocolesterêmica (Anthony *et. al.*, 1996) e anticarcinogênica (Coward *et. al.*, 1993). A soja pode conter até doze tipos de isoflavonas, as formas agliconas daidzeína, gliciteína e genisteína, os â-glicosídeos conjugados: daidzina, glicitina, genistina, acetil-daidzina, acetil-glicitina, acetil-genistina,

malonil-daidzina, malonil-glicitina, malonil-genistina (Kudou et. al., 1991). Este estudo teve como objetivo avaliar os teores de inibidor de tripsina de Kunitz e isoflavonas nos grãos de soja e nos respectivos extratos hidrossolúveis.

Para a determinação dos teores das isoflavonas e o inibidor de tripsina (KSTI), foram utilizadas as cultivares: BRS 257, BRS 213, BRS 258, BRS 267 e Embrapa 48. O extrato hidrossolúvel ou "leite" de soja foi produzido no equipamento SOJAMAC, modelo MJ720. No processo de extração, os grãos de soja selecionados foram macerados por duas horas a 50 °C. Logo após, a água de maceração foi descartada e os grãos foram moídos com 2 L de água. Os grãos de soja foram moídos em moído analítico refrigerado e desengordurados a frio com n-hexano. A atividade do inibidor de tripsina de Kunitz nas cultivares de soja e em seus respectivos extratos foi determinada por ensaio enzimático (Kakade et. al., 1974) modificado por Hamerstrand et. al., 1981), utilizando como substrato o benzoyl-DL-arginina p-nitroanilida (BAPA), conforme descrito pela AOAC (1976). O método se baseia na quantificação de unidades de tripsina inibidas (UTI) quando o inibidor (amostra) é adicionado ao sistema enzima-substrato (tripsina-BAPA). Uma unidade de tripsina (UT) é arbitrariamente definida como um aumento de 0,01 unidade de absorbância a 410 nm das condições do teste. A separação e a quantificação das isoflavonas nos grãos e nos respectivos extratos foram realizadas em coluna de fase reversa do tipo ODS C18 (YMC Pack ODS-AM Column), utilizando um cromatógrafo líquido da marca Waters, modelo 2690, com injetor automático de amostras. Para separação das isoflavonas foi utilizado o sistema de gradiente linear binário tendo-se como fases móveis metanol contendo 0,025 % de ácido TFA (ácido trifluoroacético) (solvente A) e de H₂O destilada deionizada ultrapura contendo 0,025 % ácido TFA (solvente B). A condição inicial do gradiente foi de 20 % para o solvente A, atingindo-se 100 % em 40 min e retornando à 20 % novamente em 41 min. O tempo total de corrida foi de 60 min. O fluxo da fase móvel foi de 1mL/min e a temperatura durante a corrida foi de 25 °C. Para a detecção das isoflavonas foi utilizado o detector de arranjo de fotodiodo da marca WATERS, modelo 996, ajustado para o comprimento de onda de 260 nm. Para a identificação das isoflavonas

foram utilizados padrões de daidzina, glicitina, genistina, malonil-daidzina, malonil-glicitina, malonil-genistina, acetil-daidzina, acetil-glicitina, acetil-genistina, daidzeína, gliciteína e genisteína todas da marca SIGMA. A solução para curva de calibração de cada isoflavona foi preparada em metanol nas seguintes concentrações: 0,00625 mg/mL; 0,0125 mg/mL; 0,0250 mg/mL; 0,0500 mg/mL e 0,1000 mg/mL. A quantificação das isoflavonas por padronização externa (área dos picos) foi realizada utilizando os padrões como referência de acordo com a metodologia preconizada por (Berhow, 2002).

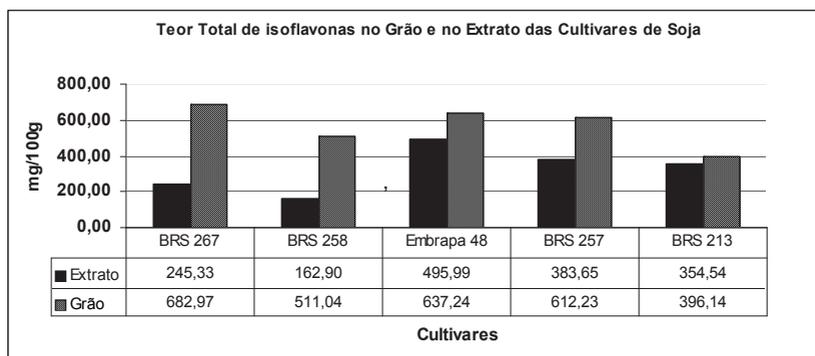


Fig. 1 - Valores médios totais das isoflavonas do grão de soja e de seus respectivos extratos hidrossolúveis. Média obtida de três repetições.

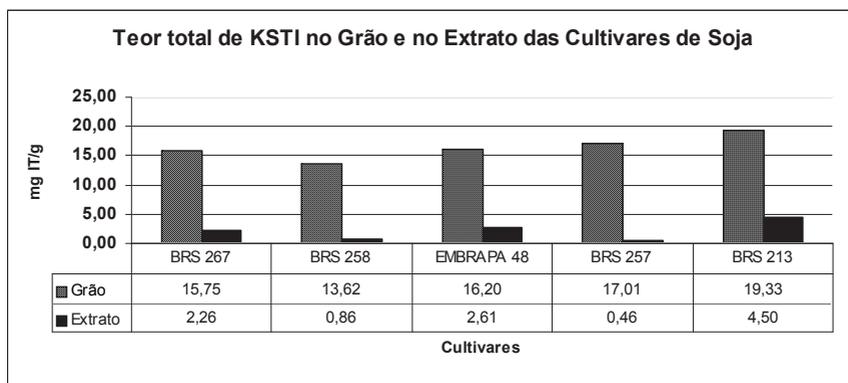


Fig. 2 - Teores médios de inibidor de tripsina Kunitz (KSTI) nos grãos de soja e nos seus respectivos extratos hidrossolúveis, Embrapa Soja, 2007.

Tabela 1 - Valores médios de Isoflavonas do grão de soja e de seus respectivos extratos hidrossolúveis. (E) Extrato e (G) Grão. Média obtida de três repetições.

Isoflavonas	Quantidade de Isoflavonas (mg/100g)														
	BRS 267			BRS 258			Embrapa 48			BRS 257			BRS 213		
	E	G		E	G		E	G		E	G		E	G	
G-Dai	40,96	81,69		22,25	75,12		30,62	69,01		48,90	42,34		60,59	53,07	
G-Gly	8,00	13,60		6,41	7,16		9,04	19,90		13,41	11,07		11,31	12,81	
G-Gen	61,80	115,12		30,21	89,69		31,44	85,70		59,47	46,20		58,32	52,32	
Total Glicosídeos	110,76	210,41		58,87	171,97		71,10	174,61		121,78	99,61		130,22	118,20	
M-Dai	28,48	112,74		16,64	106,11		134,57	132,06		75,86	158,97		67,08	66,05	
M-Gly	9,73	22,12		6,21	18,19		37,35	44,15		25,94	50,87		19,42	20,53	
M-Gen	64,57	231,5		44,85	194,4		237,55	257,34		144,00	280,97		105,94	122,56	
Total Malonils	102,78	366,36		67,70	318,70		409,47	433,55		245,80	490,81		192,44	209,14	
Dai	4,55	36,57		10,86	5,60		2,44	10,63		5,56	3,46		4,73	25,81	
Gly	22,48	14,88		2,32	11,13		11,63	4,14		3,18	15,64		24,00	5,59	
Gen	4,76	54,76		23,14	3,64		1,34	14,29		7,33	2,71		3,16	37,40	
Total Agliconas	31,79	106,21		36,32	20,37		15,41	29,06		16,07	21,81		31,89	68,80	
TOTAL	245,33	682,97		162,90	511,04		495,99	637,24		383,65	612,23		354,54	396,14	

O teor total de isoflavonas no extrato hidrossolúvel sofreu redução, quando comparado com os obtidos nos grãos. Com relação aos grupos de isoflavonas, verifica-se redução acentuada nos grupos Malonil (daidzina, glicitina e genistina), os quais são compostos termolábeis. Com relação aos teores de KSTI, houve uma redução de cerca de 88 % do teor original, conforme esperado, devido ao processamento térmico durante a extração do "leite".

Referências

ANTHONY, M. S. ; CLARKSON, T. B. ; BULLOCK, B. C. Soy protein versus soy phytoestrogens (isoflavones) in the prevention of coronary artery arteriosclerosis of cynomolus monkeys. *Circulation*, 94: abstract, 1996.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. Official methods of analysis. Washington DC, 1975. 1094p.

BERHOW, M. A. Modern analytical techniques for flavonoid determination. In: BUSLIG, B. S.; MANTHEY, J. A. (Ed). *Flavonoids in the living cell*. New York: Klusher Academic, 2002. p. 61-76. (Adv. Exp. Méd Biol. v. 505).

COWARD, L.; BARNES, N.C.; SETCHELL, K.D.R.; BARNES, S. Genistein, Daidzein, and their glucoside conjugates: Antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, n.41, p.1961-1967, 1993.

DALAIS, F. S. ; RICE, G. E. ; BELL, R. J. Dietary soy supplementation increases vaginal cytology maturation index and bone mineral content in postmenopausal women. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 68 (suppl.), p. 15188, 1998.

HAMERSTRAND, G.E.; BLACK, L. T.; GLOVER, J. D. Trypsin inhibitors in soy products: modification of the standard analytical procedure. *Cereal Chemistry*, Saint Paul, v. 51, n. 1, p. 42-45, 1981.

KAKADE, M. L.; RACKIS, J.J.; McGHEE, J. E.; PUSKI, G. Determination of trypsin inhibitor analysis of an improved procedure. *Cereal Chemistry*, Saint Paul, v. 51, n. 3 p. 376-382, 1974

KUDOU, S.; FLEURY, Y.; WELTI, D.; MAGNOLATO, D.; UCHIDA, T.; KITAMURA, K.;

OKUBO, K. Malonil isoflavone glycosides in soybeans seeds (*Glycine max* (L.) Merrill). *Agricultural and Biological Chemistry*, v.55, p.2227-2233, 1991.

MESSINA, M.; MESSINA, V.; SETCHELL, K. *The simple soybean and your health*. New York: Avery, 1994. 260 p.

MOLTENI, A. ; BRISIO-MOLTENE, L.; PERSKY, V. In vitro hormonal effects of soybean isoflavones. *Journal of Nutrition*, v. 125, p. 751S-756S. 1995.

RACKIS, J. J. Significance of soy trypsin inhibitors in nutrition. *Journal of the American Oil Chemists Society*, Champaign, v. 58, n. 3 p. 495-501 , 1981.