

Comparação entre dois métodos para a extração de isoflavonas em cultivares de soja

Wladimir S. Crancianinov¹; Adriana M. Freitas¹; Andreia C. Santana¹; José Marcos Gontijo Mandarino²; Mercedes Concórdia Carrão-Panizzi². ¹UEL; ²Embrapa Soja.

Introdução

As isoflavonas são compostos de baixo peso molecular, metabólitos secundários de plantas, pertencentes ao grupo do flavonóides e que possuem três anéis benzeno ligados (RHODES, 1996). Os diferentes radicais ligados a estes anéis dão origem a doze formas de isoflavonas, divididas em quatro grupos: as formas malonil, as formas acetil, os glicosídeos e as agliconas. As diferentes conformações desses radicais em cada grupo, originam as diversas formas das isoflavonas daidzina, genistina, glicitina e ainda as agliconas daidzeína, genisteína e gliciteína (PARK et al., 2001).

As formas malonil são as mais abundantes na soja *in natura*, quando os grãos são submetidos a processamentos com alta temperatura e pressão, estas formas são convertidas nas formas acetil, e estas, nas formas glicosídicas (PARK et al., 2001). Os processos fermentativos podem converter os glicosídeos as formas agliconas, devido ao aumento na atividade da enzima β -glicosidases (CARRÃO-PANIZZI, M.C.; BORDIGNON, J.R., 2000). As características genéticas da semente bem como as condições climáticas (temperatura), influenciam no teor de isoflavonas nos grãos. Sua síntese ocorre por volta de 35 dias após o florescimento e, aos 50 dias, ocorre um aumento na síntese de genistina e malonil-genistina. Entretanto, as formas daidzina e malonil-daidzina estão presentes em altas concentrações durante todo o período de maturação das sementes (CARRÃO-PANIZZI, et al. 1999). As isoflavonas concentram-se no hipocótilo da semente e não são encontradas no tegumento. As isoflavonas têm estrutura química semelhante à do hormônio estrógeno sendo, por-

tanto, eficazes no alívio dos sintomas do climatério (menopausa) e na redução dos riscos de câncer hormônio dependentes, como os cânceres de mama, colo de útero e próstata (MESSINA *et. al.*, 1994) O objetivo deste trabalho foi comparar dois métodos para a extração das isoflavonas presentes nas sementes de soja e sua subsequente quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Materiais e Métodos

Para tanto foi utilizada a cultivar BRS 213 produzida nos campos experimentais da Embrapa Soja em Londrina, PR. Foram comparados os métodos de extração com Metanol:DMSO (8:2) e Etanol com 0,1% de ácido acético. No procedimento de extração das isoflavonas foram realizadas as seguintes variações: tempo de extração (uma hora e 17 horas), natureza da amostra (integral e desengordurada). A separação e quantificação das isoflavonas foram realizadas em coluna de fase reversa do tipo ODS C18 (YMC Pack ODS-AM Column) utilizando-se um cromatógrafo líquido da marca Waters, modelo 2690, com injetor automático de amostras. Para a 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 a 41 min. O tempo total de corrida foi de 60 min. O fluxo da fase móvel foi de 1 mL/min e a temperatura durante a corrida foi de 25 °C. Para a detecção das isoflavonas foi utilizado o detector de arranjo de foto diodo da marca Waters, modelo 996, ajustado para o comprimento de onda de 260 nm. Para a identificação das isoflavonas foi utilizada uma mistura dos padrões de daidzina, daidzeína, genistina e genisteína da marca Sigma. Esta solução foi preparada em metanol contendo um mix dos glicosídeos 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.

Resultados e Discussão

Na comparação entre os métodos, a modificação no tempo de extração de uma hora para 17 horas com o extrator de etanol 0,1% de ácido acético não mostrou diferença na extração das isoflavonas. Portanto, não se faz necessário aumentar o tempo de extração, quando este método é utilizado. Também não houve diferenças significativas quando foram utilizadas amostras desengordurada ou integral.

Entretanto, durante a análise cromatográfica, o ruído de fundo foi menor quando se utilizou amostra desengordurada, causando portanto menos danos à coluna. Portanto o método mais eficiente para extração das isoflavonas foi de Góes-Favoni et al., 2001 com 1 hora de extração e amostra desengordurada. Entretanto, para que a análises seja realizada de maneira mais rápida e sem prejuízo na extração das isoflavonas pode ser utilizada amostra integral, com a ressalva de que este procedimento pode diminuir a vida útil da coluna.

Referências Bibliográficas

- 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).
- CARRÃO-PANIZZI, M.C.; BELÉIA, A. D. P.; KITAMURA, K.; OLIVEIRA, M.C.N. Effects of genetics and environment on isoflavone content of soybean from different regions of Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 10, p. 1787-1795, 1999.
- CARRÃO-PANIZZI, M.C.; BORDIGNON, J.R. Activity of beta-glucosidase and levels of isoflavone glucosides in soybean cultivars affected by the environment. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n.5, p. 873-878, 2000.
- GÓES-FAVONI, S.P.; CARRÃO-PANIZZI, M.C.; KIKUCHI, A. Isoflavonas da soja: extração e determinação. In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 4., 2001, Campinas. **Resumos...** Campinas: SBCTA, 2001. p. 66.

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

RHODES, M.J.C. Physiologically-active compounds in plant foods: an overview. **Proceedings of The Nutrition Society**, Cambridge, v.55, n. 1B, p.371-384, 1996.

PARK, Y.K.; AGUIAR, L.C.; ALENCAR, S.M.; MASCARENHAS, H.A.A.; SCAMPARINI, A.R.P. Avaliação do teor de isoflavonas em soja brasileira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.3, n.3, p. 156-160, 2001.