



**QUANTIFICAÇÃO DE ISOFLAVONAS AGLICONAS EM LEGUMINOSAS DO BANCO DE GERMOPLASMA DO IZ POR IMUNOENSAIO – AVALIAÇÃO DO POTENCIAL COMERCIAL E BIODIVERSIDADE**

Flávia Hansen **Rosolen**<sup>1</sup>; Luiz Humberto **Gomes**<sup>2</sup>; Simone Possedente de **Lira**<sup>3</sup>; Keila Maria Roncato **Duarte**<sup>4</sup>

Nº 15701

**RESUMO** - As isoflavonas são compostos fenólicos encontradas nas leguminosas e sua extração é feita principalmente pela soja (*Glycine max*). As isoflavonas possuem ação estrogênica, sendo muito utilizada em medicamentos para a menopausa, assim como ação anticancerígena e antioxidante. O Banco de Germoplasma do Instituto de Zootecnia de Nova Odessa possui cerca de 276 espécies de leguminosas, sendo que estas não possuem estudos mais aprofundados quanto sua composição proteica e compostos secundários, como as isoflavonas. O objetivo deste projeto busca alternativas para a soja, descobrindo outras leguminosas que possuem altos teores de isoflavonas ou proteínas, conhecendo melhor a biodiversidade e favorecendo a sustentabilidade. Para a seleção das leguminosas imunoensaios foram realizados com anticorpos anti-isoflavonas, testadas por PTA-ELISA. Foram escolhidas cerca de 50 amostras de leguminosas para os testes e dez delas obtiveram teores de isoflavonas iguais ou superiores comparadas com a soja comercial. De forma sustentável este trabalho mostra oportunidade de pesquisa com o Banco de Germoplasma do Instituto, já que as leguminosas possuem alto teor de proteínas, podendo ser utilizadas para alimentação animal e para fins farmacêuticos.

**Palavras-chaves:** biodiversidade, isoflavonas, soja.

<sup>1</sup> Autora, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Engenharia Ambiental e Sanitária, UNISAL, Americana-SP; flaviarosolen@yahoo.com.

<sup>2</sup> Especialista em Laboratório: Dr. em Microbiologia Agrícola, Lab. Química Ambiental, ESALQ/USP, Piracicaba-SP.

<sup>3</sup> Professora: Dra. em Química, Lab. Química Ambiental, ESALQ/USP, Piracicaba-SP.

<sup>4</sup> Orientadora: Pesquisadora do Instituto de Zootecnia, Nova Odessa-SP; keila@iz.sp.gov.br.



**ABSTRACT-** *Isoflavones are phenolic compounds found in leguminous species and its extraction is done mainly from soybeans (*Glycine max*). Isoflavones have estrogenic action and is used for menopause treatments and it shows some anticancer and antioxidant properties. The Forage Gene Bank, at the Institute of Animal Science, Nova Odessa – SP has 276 leguminous forage species with no deeply studies about secondary compounds and pharmaceutical properties done, neither about its protein compounds or isoflavones presence and/or absence. This work aimed to search alternatives other than soybean for isoflavones sources, knowing better our biodiversity and favoring our sustainability. For the leguminous species selection, immunoassays were done using antibodies raised against isoflavones, tittered by PTA-ELISA. From 50 species, ten were chosen having isoflavones rates higher than commercial soybean. In a sustainable way, this work shows an opportunity to know better our Forage Gene Bank and study it for animal feed and pharmaceutical uses, due to its high protein content and the presence of secondary compounds.*

**Key-words:** biodiversity, isoflavones, soybean.

## **1 INTRODUÇÃO**

Hoje em dia fala-se muito em biodiversidade, novos métodos, novas matérias-primas, novos produtos sendo realizados mais conscientemente para preservar cada vez mais o meio ambiente. Há um composto orgânico chamado isoflavona, presente na soja (*Glycine max*), e seu uso tem como finalidade a produção de cosméticos, medicamentos e consumo na alimentação humana e animal, por sua fonte de óleo, proteínas e minerais (Justen, 2007).

Este composto também é conhecido como fitoestrogênio, utilizado em medicamentos, pois repõe os hormônios estrógenos faltantes nas mulheres em menopausa (Callou, 2009). O Ministério da Saúde aprova as isoflavonas da soja como fitoterápico, um medicamento de origem vegetal e que devido ao seu baixo índice de efeitos colaterais é utilizado como redutor de sintomas da menopausa (Oliveira, 2010).

As isoflavonas por serem compostos fenólicos possuem ação antioxidante, ou seja, a molécula consegue inibir a oxidação de outras moléculas (WIKIPEDIA, 2014). Além desta ação, possui outras como a antifúngica e anti-cancerígena (Park et al., 2001).



Nas leguminosas estes compostos orgânicos exercem várias funções, possuem ação antibacteriana, proteção contra patógenos e resistência a nematoides e antrópodes. Durante o enchimento do grão da soja as isoflavonas desenvolvem-se e seu teor é associado com a viscosidade das sementes (Justen, 2007).

Portanto, a extração de isoflavonas nos dias de hoje para a maioria dos fins citados acima é realizado nas sementes de soja. O objetivo deste projeto foi analisar a presença deste composto em outras espécies de leguminosas presentes no Banco de Germoplasma do Instituto de Zootecnia de Nova Odessa/SP. Com isso, podemos encontrar alternativas sustentáveis com novas fontes de extração de isoflavonas, gerando assim, a biodiversidade.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Leguminosas Seleccionadas**

Foram coletadas no banco de germoplasma cerca de 50 diferentes espécies de leguminosas para a verificação e quantificação de isoflavonas presentes nas mesmas. Foram colhidas sementes das vagens de leguminosas in vivo, no “Campo de Introdução” do IZ, sendo elas: *Canavalia ensiformis*, *Cratylia mollis*, *Bauhinia sp*, *Galactia híbrida*, *Dipteryx alata*, *Desmanthus sp* e *Centrosema arenarium*. A espécie *Macroptilium atropurpureum* foi colhida na vegetação próxima ao laboratório. Sementes retiradas do banco de germoplasma: *Alysicarpus vaginalis*, *Canavalia ensiformis*, *Centrosema pubescens*, *Stylozobrium aterrimum*, *Leucaena leucocephala*, *Cajanus cajan*, *Cratylia sp*, *Leucaena pallida*, *Leucaena diversifolia*, *Cratylia floribunda*, *Clitoria ternatea*, *Phaseolus sp*, *Tephrosia cândida*, *Centrosema plumiere*, *Sesbania exasperata*, *Sesbania sesban subs. Sesbania var. bicolor*, *Glycine javanica*, *Sesbania sesban*, *Sesbania tetráptera*, *Macrotyloma axillare cv. Guatá*, *Eriosema sp*, *Sesbania punicea*, *Stylosanthes sp*, *Calopogonium sp*, *Indigofera sp*, e *Desmanthus sp*. 10 (dez) amostras prontas com melhores resultados em isoflavonas foram coletadas de uma dissertação de mestrado realizado no IZ, da aluna Jozilene Fernandes Farias dos Santos (2013): *Mucuna deeringiana*, *Crotalaria juncea*, *Calopogonium mucunoides*, *Bauhinia sp*, *Galactia glaucensces*, *Tephrosia candida*, *Galactia sp*, *Galactia martii*, *Neonotonia wightii* e *Stizolobium aterrimum*. Dentre todas as espécies foram selecionadas 52 amostras de sementes, algumas delas eram de mesma espécie, o que diferenciava de uma amostra para outra era seu local de coleta ou ano que foi colhida.



## **2.2 Testes de Germinação**

Para saber se as sementes utilizadas no experimento não estavam mortas, por causa dos anos de armazenamento, o teste de germinação foi realizado da seguinte forma: 400 sementes de cada espécie selecionada foram dispostas em gerbox, com papel filtro e foram para o germinador, cada espécie com sua temperatura específica. Após a contagem de dias em espera específicos de cada espécie, observou-se se houve crescimento do caule e de folíolos e se eles eram classificados como normais, anormais ou mortos. Em algumas espécies que apresentaram muitos fungos foi feita a quebra de dormência, ou seja, uma limpeza na semente com água quente, álcool 70% e cândida.

## **2.3 Maceração e Trituração**

A trituração das sementes foi realizada com um mix. As sementes menores que não foram possíveis realizar a trituração pelo mix, foi realizado a maceração com nitrogênio líquido e todas as sementes foram armazenadas no freezer -80°C.

Posteriormente, as amostras maceradas foram colocadas em banho maria e em seguida na estufa à 50°C. Após a retirada das sementes da estufa foi medido 0,1g de cada amostra, colocada em tubos de ensaio e acrescentado solução de metanol e ácido acético até completar 4 ml, agitando de 15 em 15 minutos durante um período de 5 horas.

## **2.4 Produção de Anticorpos**

A produção dos anticorpos foi realizada segundo metodologia descrita por Santos (2013). Para a produção dos anticorpos policlonais foi utilizado capsulas de extrato seco de soja com 40% de isoflavonas totais, sendo Daidzeína (37,15%), Genisteína (0,21%), Gliciteína (0,42%), Daidzina (1,13%), Glicitina (1,11%), Genistina (0,78%). Em capsulas de extratos secos de soja, as isoflavonas são encontrados em quantidades máximas de 40%, segundo Cesar et al (2007) existe uma grande variação na quantidade de isoflavonas, por isso foi solicitado um laudo fornecido pelo fabricante, as quantidades de isoflavonas foram confirmadas por CLAE, atestando a qualidade e procedência do extrato seco de soja rico em isoflavonas.

A conjugação foi feita pelo método das carbodiimidas, permitindo que houvesse resposta imunológica e conseqüentemente produção de anticorpos anti-isoflavonas, foram usadas 25mg de isoflavona em 2,25 mL de dimetilformamida, adicionou-se 25 mg de 1-etil-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide HCL (EDC) e 50mg de BSA (Bovine Serum Albumin- fração V) dissolvidos em 2,5 mL Tampão fosfato 0,5M (PH 7.0), agitou-se por 3 dias a 4°C. Em seguida foi dialisado contra NaHCO<sub>3</sub> 0,05M por 24 horas (Hemanson, 1996).



Foram usadas duas coelhas da raça Nova Zelândia, com 45 dias de idade para obtenção de anticorpos policlonais anti-isoflavona. As imunizações foram feitas por via intramuscular no dorso. Cada animal recebeu cinco imunizações intercaladas quinzenalmente. Antes de cada imunização foram coletadas amostras sanguíneas para titulação dos anticorpos, através de pequenas punções na orelha.

## 2.5 Testes de ELISA

As titulações foram realizadas por ELISA que foram otimizados conforme protocolos segundo Crowther (2009). Nestes ensaios foram avaliados: diluição dos anti-soros, sistema de bloqueio do ensaio (BSA), concentração dos reagentes de coloração e melhor tipo de ELISA. Os tempos para cada passo do ensaio também foram otimizados, de modo a permitir uma melhor visualização dos resultados (Santos, 2013). Durante todo o experimento 3 (três) testes foram realizados.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Gráfico do Primeiro Teste ELISA

A Figura 1 mostra os teores de isoflavonas comparadas com a isoflavona pura.

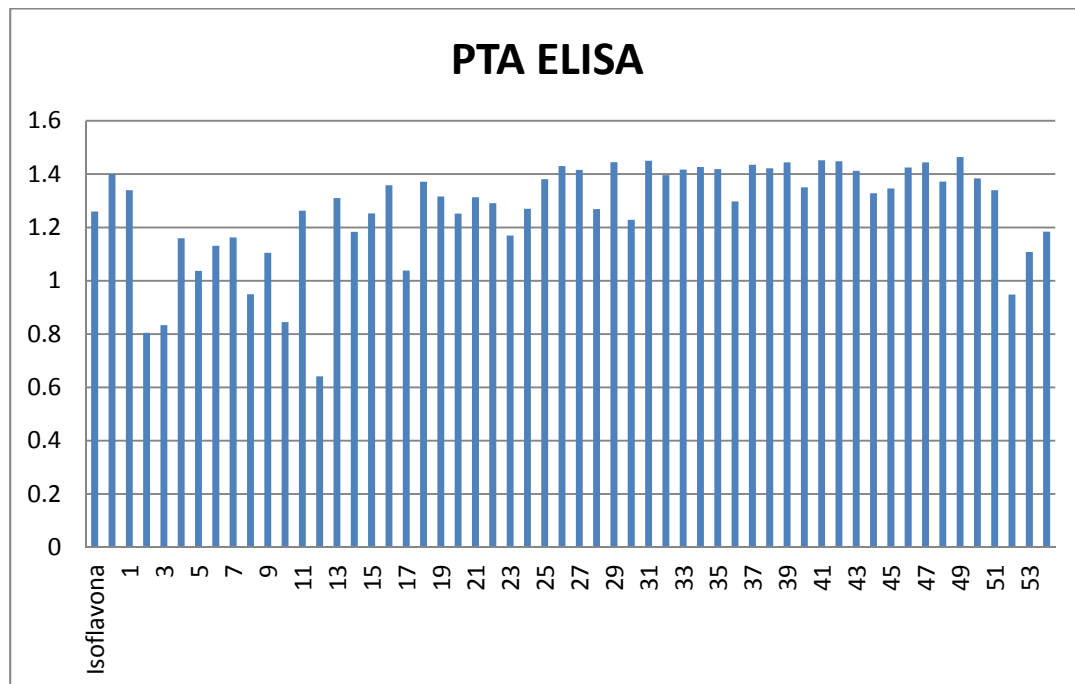


Figura 1: Amostras demonstrando os teores de isoflavonas comparadas com a isoflavona pura.

### 3.2 Gráfico do Segundo Teste de ELISA

Na Figura 2, as barras em vermelho representam o soro e as barras azuis representam Imunoglobulinas tipo G purificadas produzidas contra isoflavonas. Estão demonstradas no gráfico as dez melhores amostras comparadas com a isoflavona comercial e a soja comercial (*Glycine max*).

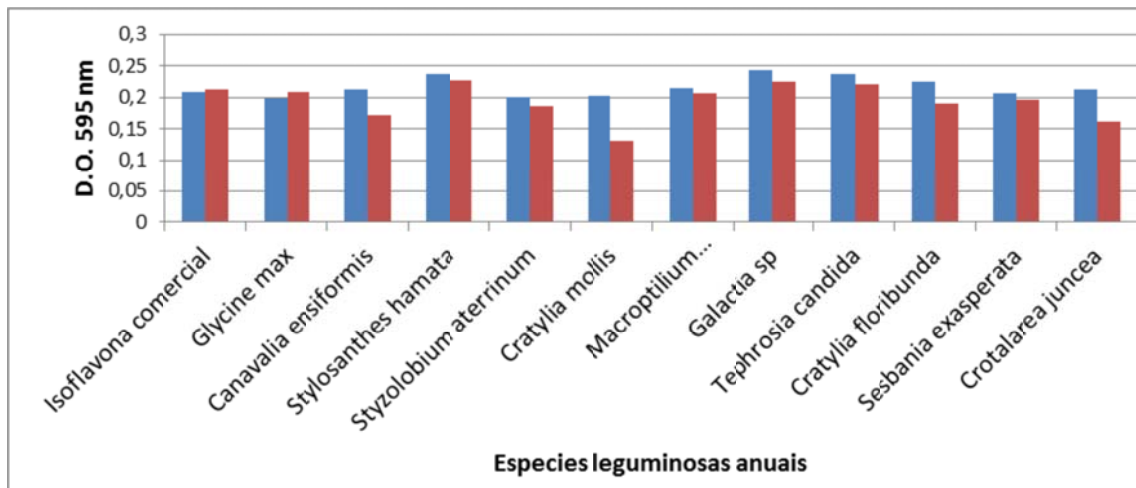


Figura 2: Dez melhores amostras comparadas com a isoflavona comercial e a soja comercial.

### 3.3 Gráfico do Terceiro Teste ELISA

Na figura 3, o imunoensaio mostra a diferença entre os conjugados utilizados. O ELISA pode ser feito com vários sistemas enzimáticos e sua sensibilidade pode variar dependendo da enzima utilizada, pois a amostra ou matriz biológica usada interfere nos resultados obtidos. Nesta figura (3) dois sistemas foram utilizados com o mesmo protocolo e o HRP (Peroxidase) apresentou melhores resultados que a fosfatase alcalina (AP).

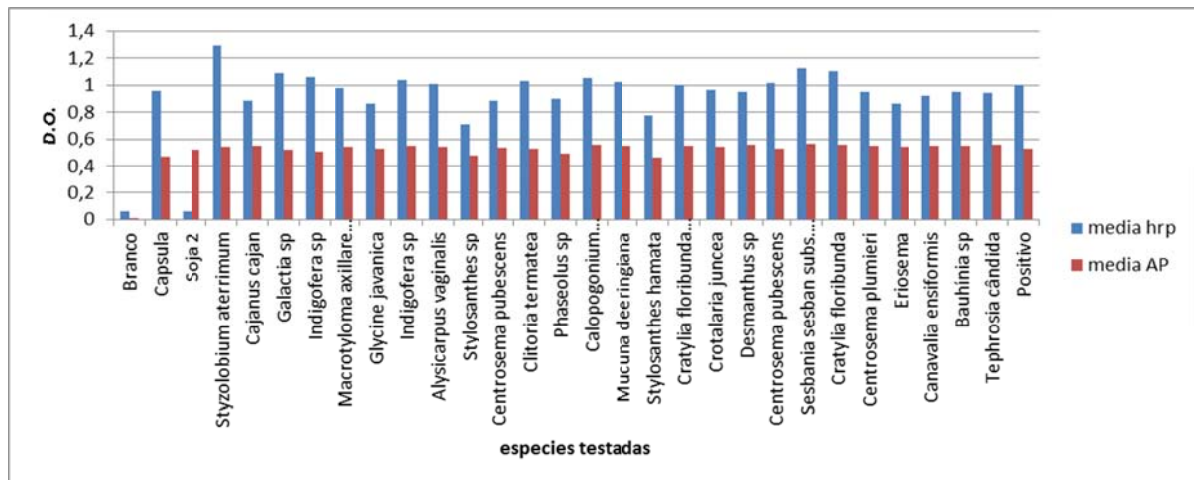


Figura 3: Resultados comparando dois diferentes sistemas enzimáticos (AP e HRP).

Dentre todas as espécies testadas, as que obtiveram melhores resultados em relação a maior quantidade de isoflavonas foram: *Phaseolus spp*, *Calopogonium mucunoides*, *Mucuna deeringiana*, *Centrosema plumieri* e *Galactia spp*. Algumas espécies, como por exemplo o *Stylobium aterrimum*, possuem peroxidase natural em suas sementes, acusando alta média de HRP, porém não quer dizer que a espécie possui altos teores de isoflavonas.

#### 4 CONCLUSÃO

Dentre todas as amostras analisadas todas apresentaram teores de isoflavonas totais favoráveis, sendo que *Phaseolus spp*, *Calopogonium mucunoides*, *Mucuna deeringiana*, *Centrosema plumieri* e *Galactia spp* apresentaram melhores resultados. As isoflavonas são extraídas normalmente da soja, com este projeto é possível apresentar novas alternativas para a extração das isoflavonas, investindo na biodiversidade vegetal existente, aumentando alternativas sustentáveis para extração de compostos de interesse, de forma a manter o meio ambiente estável e garantir o uso mais nobre da soja, que é destinada a alimentação humana e animal, como principal fonte vegetal de proteínas.

#### 5 AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ter me concedido esta oportunidade de conhecimento e por toda força que recebi Dele nesta caminhada. Em segundo agradeço à minha orientadora



Keila, que sempre me motivou a ser determinada, esforçada, e que com essas qualidades podemos chegar onde queremos. Agradeço também aos funcionários do IZ e ao CNPq que me concedeu esta bolsa.

## **6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

CALLOU, K.R.A. **Teor de isoflavonas e capacidade antioxidante de bebidas a base de soja.** Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

CROWTHER, J.R. **The ELISA Guidebook 2nd Ed. Series Springer Protocols. Methods in Molecular Biology**, New Jersey, vol. 516, Humana Press, 566 p., 2009.

GAZZETTA, S.L.G.G.; NERI, A.M.; ROSOLEN, F.H.; MACHADO, D.C.; DUARTE, K.M.R. Avaliação da biodiversidade em leguminosas forrageiras do banco de germoplasma do IZ quanto ao conteúdo de isoflavonas. **In: SIMPÓSIO CIENTÍFICO DE GESTÃO AMBIENTAL**, 3, Piracicaba/SP, v.1, 2014.

HEMANSON, G. T. **Bioconjugate Techniques.2 Ed.** Rockford: Academic Press, p. 785, 1996.

JUSTEN, G.C. **Composição química da soja (*Glicine max (L.) Merril*) em conversão para a agricultura orgânica considerando as condições climáticas do oeste do Paraná.** Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2007.

OLIVEIRA, S.R. **Desenvolvimento analítico e farmacotécnico de formas farmacêuticas sólidas de isoflavona de soja.** Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2010.

PARK, Y.K.; AGUIAR, C,L.; ALENCAR, S.M.; SCAMPARINI, A.R.P. Biotransformações de isoflavonas de soja. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n.20, p.12-14, 2001.

SANTOS, J.F.F. **Anticorpos policlonais para determinação de isoflavonas em leguminosas.** Dissertação (Mestrado) – Produção Animal Sustentável, Instituto de Zootecnia, Nova Odessa/SP, 65 f., 2013.

WIKIPEDIA. **Isoflavonas.** Disponível em: <<http://pt.wikipedia.org/wiki/Isoflavona>>. Acesso em: 9 out. 2014.