

## Avaliação das concentrações plasmática e urinária de isoflavonas purificadas de soja

Isabela Rosier Olimpio Pereira<sup>1</sup>, Nágila Raquel Teixeira Damasceno<sup>1</sup>, Edimar Cristiano Pereira<sup>3</sup>,  
Leoberto Costa Tavares<sup>2</sup>, Dulcineia Saes Parra Abdalla<sup>\*3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, <sup>2</sup>Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica,  
<sup>3</sup>Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas,  
Universidade de São Paulo

*Com atividade antioxidante e estrogênica, isoflavonas de soja têm sido associadas à diminuição do risco de câncer e doenças cardiovasculares. Assim, buscou-se nesse trabalho a padronização de um método de extração de isoflavonas a partir do melaço de soja e avaliar a respectiva concentração plasmática e urinária após o consumo deste extrato, em coelhos. As isoflavonas foram extraídas em etanol 90% e purificadas em uma coluna de extração em fase sólida C18, obtendo-se rendimento de 81%. O extrato purificado foi adicionado à dieta dos animais (5 mg de isoflavonas/kg de peso corporal/dia), que foram observados por período experimental de 6 meses. A concentração das isoflavonas (genisteína e daidzeína) dos extratos, da ração, do plasma e da urina foi determinada por CLAE. A concentração média de isoflavonas no plasma foi de 4 mM e a excreção urinária foi de 22 mmoles/24 horas. A purificação das isoflavonas a partir do melaço de soja resultou em preparação adequada para estudos experimentais.*

### Unitermos:

- Isoflavonas
- Fitoestrógenos
- Melaço de soja
- Genisteína
- Equol

### \* Correspondência:

D. S. P. Abdalla  
Depto. Análises Clínicas e  
Toxicológicas  
Av. Profº. Lineu Prestes, 580 Bloco 17  
superior, Cidade Universitária  
05508-900, São Paulo, SP, Brasil.  
E-mail: dspa@usp.br

## INTRODUÇÃO

As lavouras de soja ocupam 15 milhões de hectares de terra no Brasil, que produzem, em média, 40 milhões de toneladas de soja anualmente (Conab, 2002). Em termos mundiais, o Brasil é o segundo produtor de soja, estando atrás do EUA e à frente da Argentina. (Conab, 2002). Os orientais, no entanto, são os maiores consumidores de produtos derivados de soja, observando-se relação inversa entre o consumo das isoflavonas e a incidência de doenças cardiovasculares na população japonesa (Fukutake *et al.*, 1996). Vários estudos têm demonstrado que o consumo de

soja reduz o risco de várias doenças, como câncer de mama e próstata, osteoporose, doenças cardiovasculares e os sintomas da menopausa (Messina, 1999; Tikkanen, Adlercreutz, 2000). Os estudos dos efeitos benéficos da soja culminaram com a recomendação do FDA (Food and Drug Administration-USA, 1999) do uso de 25 g/dia de proteína da soja para a prevenção de doenças cardiovasculares. Porém, ainda não está elucidado quais componentes da soja são responsáveis pelos seus efeitos antiaterogênicos. A proteína da soja, as saponinas e as isoflavonas têm sido considerados como os componentes mais eficientes, porém, atenção especial tem sido dada às isoflavonas.

As isoflavonas genisteína, daidzeína e gliciteína, assim como suas formas glicosiladas (genistina, daidzina e glicetina), formonnetina e biocianina A são consideradas substâncias potencialmente antioxidantes (Ruiz-Larrea *et al.*, 1997), com ação estrogênica (Murphy, 1982; Santell *et al.*, 1997), inibidoras de crescimento tumoral (Wei *et al.*, 1993) e da agregação plaquetária (Furman *et al.*, 1994). As isoflavonas derivadas da soja apresentam propriedades antiproliferativas *in vitro* (Akiyama *et al.*, 1987). A genisteína, em particular, altera a atividade de fatores de crescimento e inibe as tirosina quinases (Akiyama *et al.*, 1987), a adesividade celular e a migração e proliferação de células musculares lisas envolvidas na formação da lesão aterosclerótica (Mäkela *et al.*, 1999; Raines, Ross, 1995). O consumo de isoflavonas da soja também tem efeitos benéficos sobre a reatividade vascular, em macacas e mulheres na peri e pós-menopausa (Nestel *et al.*, 1997; Honoré *et al.*, 1997). Por exercerem atividade estrogênica e aliviar alguns sintomas da menopausa, as isoflavonas são também chamadas de fitoestrogênicos e têm sido utilizadas como alternativa para a terapia de reposição hormonal (Tikkanen, Adlercreutz, 2000).

Considerando-se a importância das isoflavonas da soja e sua potencial utilização como fitoterápico, avaliaram-se diversas condições de extração destes compostos a partir do melaço, um subproduto da soja obtido durante a preparação industrial da proteína isolada da soja e, atualmente, sem valor comercial. O melaço derivado da soja apresenta aproximadamente 34,6% de carboidratos, 3,2% de proteína, 3,1% de gordura, 4,2% de minerais (Barnes *et al.*, 1994) e aproximadamente 2 g/L de isoflavonas, representando uma das principais fontes de isoflavonas derivadas da soja. A utilização deste subproduto apresenta vantagens econômicas devido à possibilidade de comercialização das isoflavonas pela indústria alimentícia e/ou farmacêutica. Neste trabalho, avaliou-se a concentração plasmática e urinária de genistina, daidzina, genisteína, daidzeína e equol no plasma e na urina de coelhos suplementados com o extrato de isoflavonas purificadas a partir do melaço de soja.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Extração de Isoflavonas do melaço da soja

O melaço utilizado foi fornecido pela Ceval Alimentos S.A. (Esteio, RS). Para determinar qual o método mais adequado para a extração e purificação das isoflavonas, a partir do melaço da soja, foram testados três sistemas de solventes: acetonitrila em meio ácido (ACN-HCl) 1:5 (mostra/solvente, v/v) (Wang *et al.*, 1996), etanol 90%

1:20 (mostra/solvente, v/v) (King *et al.*, 1996) e metanol 80% 1:10 (mostra/solvente, v/v) (Fukutake *et al.*, 1996). Após agitação por 2 horas, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos. Parte do sobrenadante coletado foi submetido à extração lipídica, utilizando-se hexano (1:4) (v/v), com agitação em vórtex por 1 minuto. As amostras foram novamente centrifugadas, coletando-se a fase polar, que foi evaporada sob corrente de nitrogênio em temperatura ambiente. O resíduo foi ressuscitado em 1 mL da fase móvel B. A solução resultante foi filtrada em filtro 0,22 µm e uma alíquota de 20 µL foi analisada por CLAE. Foram analisadas amostras com e sem extração lipídica para se avaliar a necessidade da mesma. Todas as extrações foram feitas em duplicata.

Após estas análises, elegeu-se o protocolo com etanol 90%, devido ao maior rendimento obtido para as isoflavonas. A extração das isoflavonas em escala semi-industrial foi feita em etanol 90% com proporções amostra:solvente iguais a 1:20, 1:10, 1:5, 1:3 e 1:2 (v/v) (volume final de 1 L), com e sem aquecimento (40 °C), sob agitação constante por 2 horas. A extração na proporção de 1:5, sem aquecimento, demonstrou ser a mais adequada, tendo sido posteriormente utilizada para a extração das isoflavonas a partir de 25 L de melaço (volume final de 125 L). Em seguida, a mistura foi decantada, sendo o sobrenadante concentrado num sistema de destilação a vácuo com capacidade de 10 L, a 40 °C. O resíduo rico em carboidratos foi descartado.

O produto concentrado, isento de etanol, foi purificado através de coluna para extração em fase sólida C18 (Bondesil Sorbents, Varian) com volume de 1,2 L, massa adsorvente de 1 kg e capacidade de retenção de aproximadamente 10 g de substâncias apolares. Em cada extração, aplicou-se volume correspondente a aproximadamente 1 g de isoflavonas. A coluna foi lavada com água gelada (5 L) e as isoflavonas foram eluídas em etanol 90% (5 L). O extrato purificado foi concentrado em rotaevaporador a 40 °C.

### Determinação de Saponinas

Para se detectar possível contaminação do extrato purificado por saponinas, avaliou-se a presença de saponinas no extrato aplicado na coluna, na água de lavagem e no extrato purificado, utilizando-se cromatografia em camada delgada (Oleszek *et al.*, 1988, com modificações). A análise foi feita em placas de sílica-gel de 500 mm de espessura e eluída com clorofórmio/metanol/água (65:50:10, v/v). A placa foi pulverizada com metanol/anidrido acético/ácido sulfúrico (50:5:5, v/v) e aquecida a 120 °C. Observou-se o desenvolvimento de cor, após irradiação com luz visível e UV.

## Animais

Os animais utilizados nesse estudo (n=6) foram coelhos machos da raça *New Zealand*, adquiridos da Procria S/A., Suzano, São Paulo. Foram utilizados animais recém-desmamados com idade de 45 dias e peso variando de 1,2 a 1,5 kg, que passaram por período de adaptação alimentar, compreendendo 3 dias com ração comercial comum para coelho (Nuvital Nutrientes Ltda, Colombo-Paraná), 2 dias com mistura de 25% da ração experimental e 75% da ração comercial, 2 dias com mistura de 50% de cada ração e 2 dias com mistura de 75% da ração experimental e 25% da ração comercial. Após este período, os animais foram alimentados com a ração suplementada com isoflavonas até o final do período experimental de 6 meses. Os animais foram mantidos em gaiolas separadas, sob ciclo de luz de 12 horas e temperatura de 25 °C.

## Ração Suplementada

A composição da dieta experimental foi feita de acordo com Roberts *et al.* (1981). O extrato purificado concentrado foi adicionado na formulação da ração de forma que os animais consumissem aproximadamente 5 mg de isoflavonas/kg de peso corporal/dia. O resíduo de etanol presente nesse extrato foi evaporado durante a secagem da ração à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A ração e a água foram fornecidas *ad libitum*. Todos os ingredientes, após serem preparados de acordo com suas características de solubilidade, foram homogeneizados em misturador industrial. Em seguida, o produto resultante foi hidratado, peletizado e seco em estufa com ventilação, a 40 °C, por 12 horas. A ração foi estocada a -20 °C por, no máximo, 30 dias.

## Coleta de Sangue

Nos períodos basal, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 meses foram coletadas amostras de sangue da veia central da orelha dos animais. O sangue foi coletado em tubos contendo EDTA (1 mg/mL) como anticoagulante e antioxidante, mantido em gelo e protegido da luz até a obtenção do plasma. Amostras de plasma contendo BHT 20 mM foram congeladas a -20 °C, por, no máximo, 2 semanas, antes da realização das análises.

## Extração de Isoflavonas da Ração

Para confirmação do conteúdo de isoflavonas da ração preparada, adicionaram-se 5 mL de etanol 90 % em 0,5 g da ração pulverizada. A mistura foi submetida a

banho de ultra-som por 10 minutos e agitada por 2 horas e, posteriormente, centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi reservado e o precipitado submetido a nova extração com 2 mL de etanol 90%. A mistura dos sobrenadantes foi seca sob corrente de nitrogênio e o resíduo ressuspensionado em 500 mL de etanol 90%. A solução resultante foi filtrada em filtro 0,22 mm e analisou-se uma alíquota de 20 µL por CLAE. A média de consumo mensal de isoflavonas foi calculada utilizando-se a concentração de isoflavonas da ração multiplicada pelo consumo médio mensal de ração dos animais.

## Extração das Isoflavonas do Plasma e da Urina

Incubaram-se 2 mL de plasma, 4 mL de acetato de amônio 0,2 M, pH 4,6 e 100 µL de glicuronidase-sulfatase (4,2 unidades/mL, Sigma S-9751), ou, 1 mL de urina, 2 mL de acetato de amônio 0,2 M pH 4,6 e 50 mL de glicuronidase-sulfatase (4,2 unidades/mL) a 37 °C, *overnight*. Após este tempo, solução resultante foi aplicada a minicoluna para extração em fase sólida C18 (Varian-Bond Elut-3 mL). A coluna foi lavada com água gelada (5 mL) e as isoflavonas foram eluídas em etanol 90% (1,5 mL). O extrato purificado foi seco em corrente de nitrogênio e o resíduo foi ressuspensionado em 250 µL de etanol 90%. A solução resultante foi filtrada em filtro 0,22 mm e uma alíquota de 50 µL foi analisada por CLAE.

## Análise das Isoflavonas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Todas as análises de isoflavonas foram realizadas por CLAE, utilizando-se cromatógrafo Shimadzu CBM-10A, operando com 2 bombas LC-10AD, injetor automático SIL-10A, detector fotodiodo SPD-M10A e o Software Class LC10. Utilizou-se coluna de fase reversa Hypersil ODS 5 µm (250 x 4,6 mm; Supelco Co) com fluxo da fase móvel de 0,8 mL/min. Utilizou-se gradiente linear composto por: A, ácido acético em água (10:90, v/v); B, metanol-acetonitrila-diclorometano (10:5:1, v/v); B em A (em volume) a 5% por 5 min, de 5% a 45% em 5 min, de 45% a 70% em 6 min e de 70% a 5% em 3 min (Franke *et al.*, 1998). Os padrões de genisteína, genistina, daidzeína, daidzina e equol foram adquiridos da Indofine Chemical Co., USA. As curvas de calibração, realizadas com estes padrões, foram utilizadas para a quantificação das diferentes isoflavonas presentes no melaço da soja, na ração, no plasma e na urina. A absorção das isoflavonas foi monitorada em 262 nm e a do equol, em 280 nm. As isoflavonas foram identificadas pelo tempo de retenção e pelo espectro.

## RESULTADOS

### Validação do Método de Quantificação por CLAE

O método de análise desenvolvido foi testado em relação à linearidade de resposta do detector em 6 diferentes concentrações para cada padrão de isoflavonas e realizado em triplicata. Os testes dos valores médios de tempo de migração, área, altura e coeficientes de variação foram satisfatórios. As curvas foram feitas na faixa de concentração dos padrões de isoflavonas normalmente encontrada após a ingestão dos mesmos, com ajustes de diluição e concentração do método de extração. Os coeficientes de correlação das curvas de calibração foram satisfatórios e a equação da reta foi utilizada para o cálculo da concentração das

amostras. O maior limite de detecção dentre as isoflavonas analisadas foi determinado como  $2,0 \mu\text{M}$ , considerando relação sinal ruído 3:1 e o limite de quantificação determinado foi de  $5,0 \mu\text{M}$  considerando relação sinal ruído 10:1.

### Padronização da Extração das Isoflavonas do melaço da soja

#### Extração Laboratorial

As figuras 1 e 2 mostram a concentração das principais isoflavonas extraídas do melaço obtida pelos três métodos utilizados, em escala laboratorial. Dentre os métodos testados para a extração das isoflavonas do melaço, o que proporcionou maior rendimento total, assim como

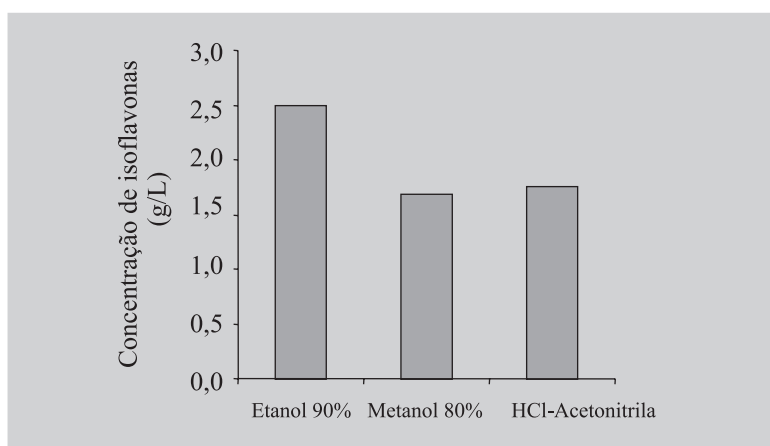


FIGURA 1 - Concentração de isoflavonas totais obtida pelos três métodos de extração.

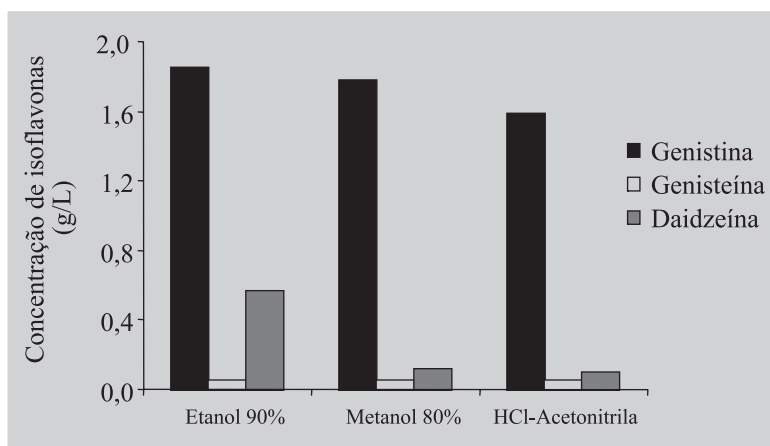


FIGURA 2 - Concentração das principais isoflavonas detectadas no melaço da soja pelos 3 diferentes métodos de extração.

para a daidzeína, foi aquele que utilizou o etanol 90%. A extração lipídica não influenciou a eficiência da extração de isoflavonas. A figura 3 mostra a concentração total de isoflavonas extraídas com etanol 90% e agitação mecânica, em diferentes proporções amostra/solvente, à temperatura ambiente e a 40 °C.

De acordo com a figura 3, a extração das isoflavonas com etanol 90%, utilizando-se agitação mecânica vigorosa, foi mais eficiente na proporção amostra/solvente igual a 1:5 (melaço/etanol, v/v). Não houve alteração do rendimento da extração das isoflavonas, quando a temperatura foi elevada até 40 °C, não havendo perda específica de nenhuma das isoflavonas analisadas com o aquecimento, tanto na fase de extração como na de concentração do extrato.

#### Extração Semi-Industrial

A partir dos 25 litros de melaço, obtiveram-se 57 g de isoflavonas, que foram purificados através da coluna

para extração em fase sólida C18, da qual foram obtidos 47 g de isoflavonas purificadas, demonstrando rendimento de 81% para o método utilizado. Na figura 4, observa-se que houve perda maior de daidzina (5 %), justificada por sua maior polaridade, sendo arrastada na água de lavagem em maior proporção que as outras isoflavonas. Este método foi eficiente para a remoção de interferentes do extrato, que poderiam influenciar o resultado final para uso experimental, tais como, saponinas e carboidratos. A cromatografia em camada delgada mostrou que o extrato bruto e a água de lavagem continham saponinas, mas que o extrato purificado pela coluna de fase sólida estava isento de saponinas (dados não mostrados).

#### Consumo de Isoflavonas pelos Animais

Não foi possível manter exatamente a dose de 5 mg/kg/dia devido a perdas ocorridas durante a secagem da ração e à rápida variação de peso dos animais. Portanto, o

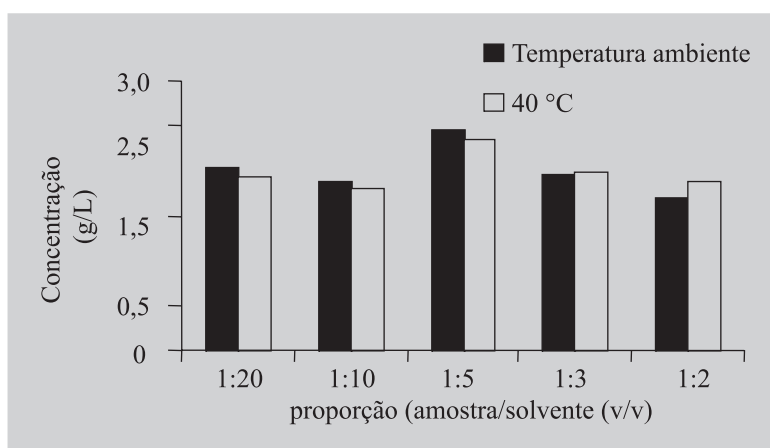


FIGURA 3 - Relação amostra/solvente utilizada na extração das isoflavonas com etanol 90%.

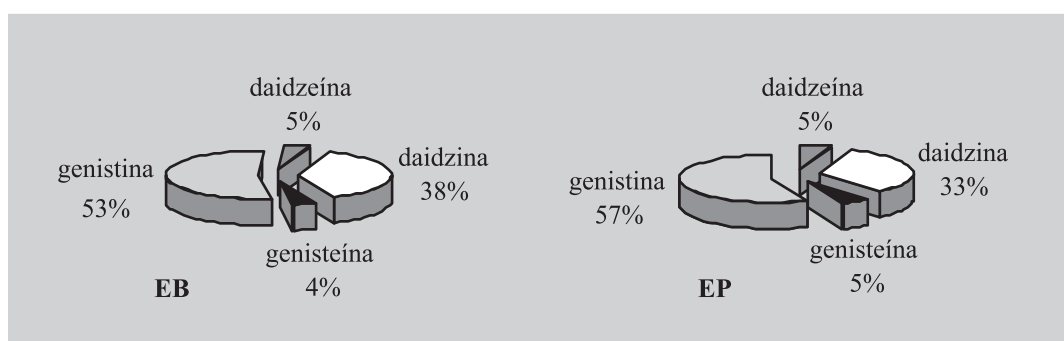


FIGURA 4 - Percentual de cada isoflavona no extrato bruto antes de ser aplicado na coluna (EB) e no extrato purificado pela coluna C 18 (EP).

consumo de isoflavonas pelos animais foi de  $5,1 \pm 1,3$  mg/dia/kg de peso (Figura 5). Os valores obtidos no tempo basal são explicados pelo fato de os animais estarem consumindo ração comercial (Nuvital Nutrientes Ltda, Colombo-Paraná) contendo soja, antes do início do consumo da ração experimental enriquecida com isoflavonas.

### Concentrações de Isoflavonas no Plasma e na Urina

A Figura 6 mostra as concentrações de daidzeína, genisteína e equol (principal metabólito intestinal da daidzeína) no plasma. No período basal, a concentração plasmática das isoflavonas foi maior que em todos os

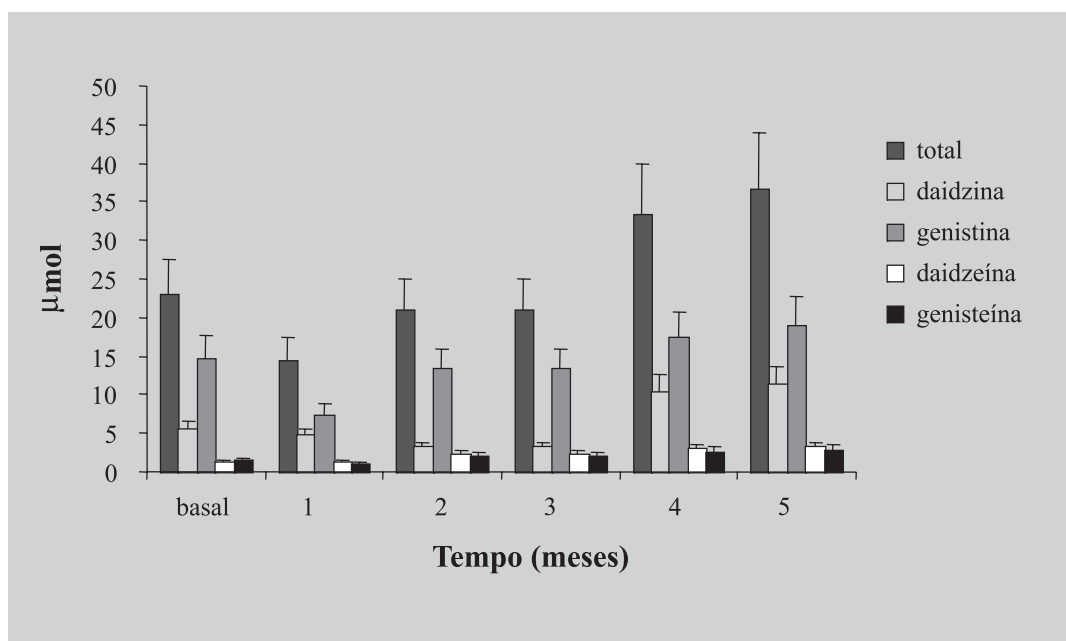


FIGURA 5 - Consumo de isoflavonas em  $\mu\text{mol}/\text{dia}/\text{coelho}$ .

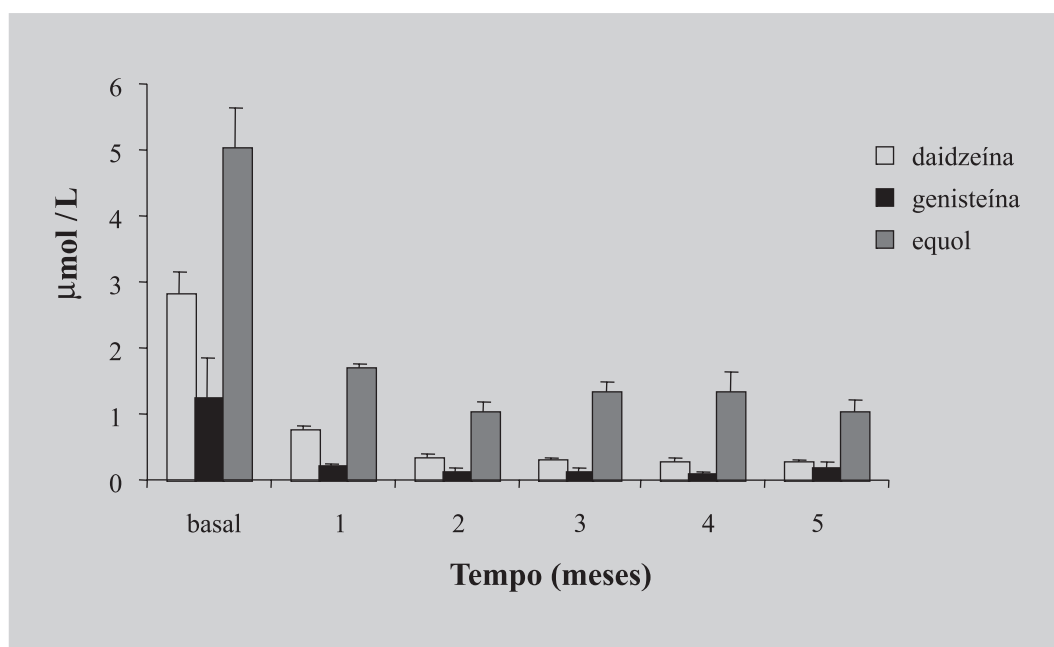


FIGURA 6 - Concentração plasmática das isoflavonas no período experimental.

outros períodos porque os animais se alimentavam de ração comercial contendo proteína de soja, o que demonstra maior biodisponibilidade das isoflavonas associadas à proteína da soja. Porém, as concentrações encontradas no plasma, no decorrer do período experimental, mostram que mesmo em menor proporção, as isoflavonas não asso-

ciadas à proteína da soja são absorvidas e biodisponíveis para exercerem suas atividades biológicas. A Figura 7 mostra a excreção urinária das isoflavonas em 24 horas. A Figura 8 mostra o consumo e a excreção das isoflavonas, expressos em  $\mu\text{mol}$ , em cada período analisado.

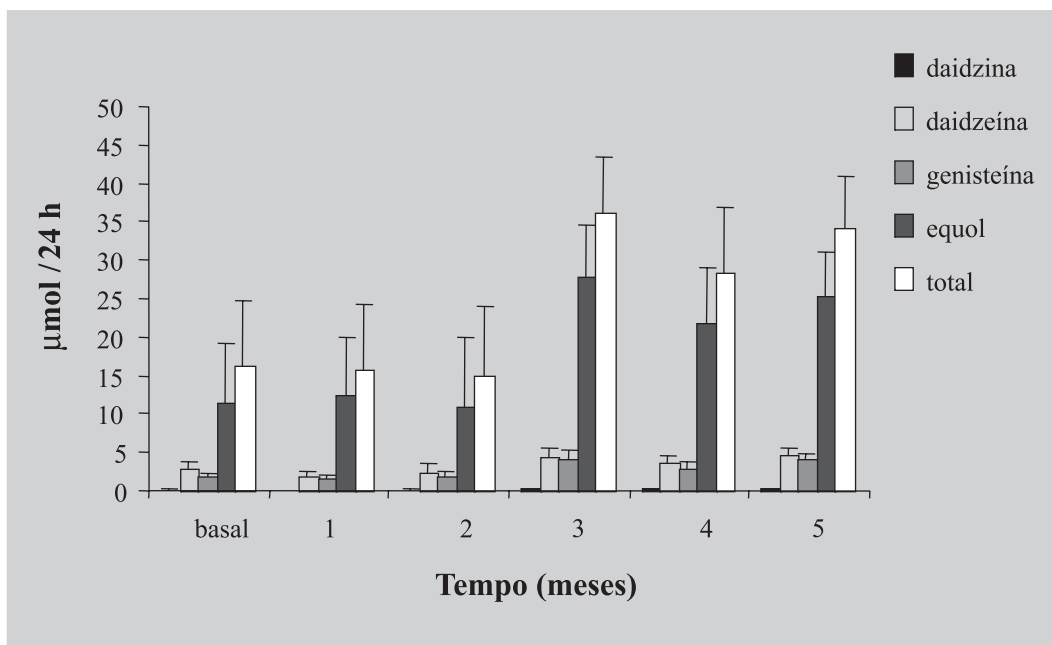


FIGURA 7 - Excreção urinária de isoflavonas no período experimental.

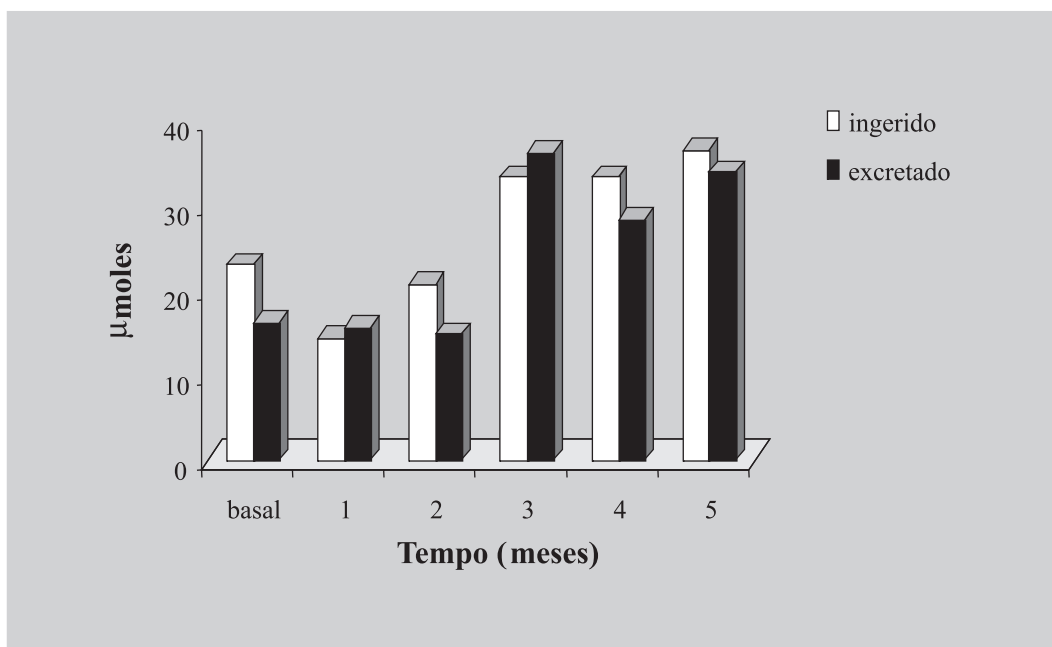


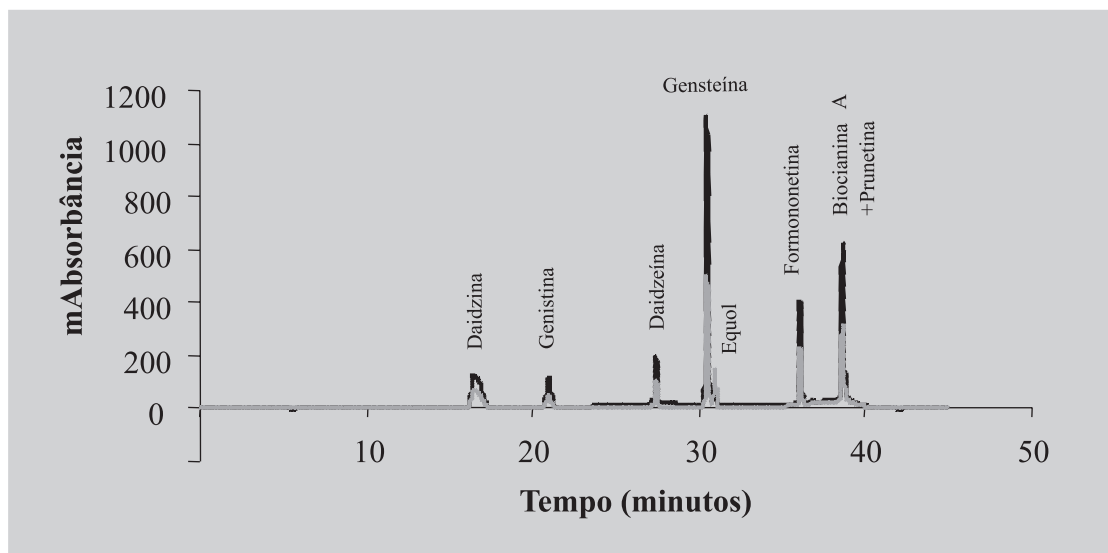
FIGURA 8 - Relação entre a quantidade ingerida e excretada na urina de isoflavonas, em 24 horas, no período experimental.

## Cromatogramas das Isoflavonas obtidos por CLAE

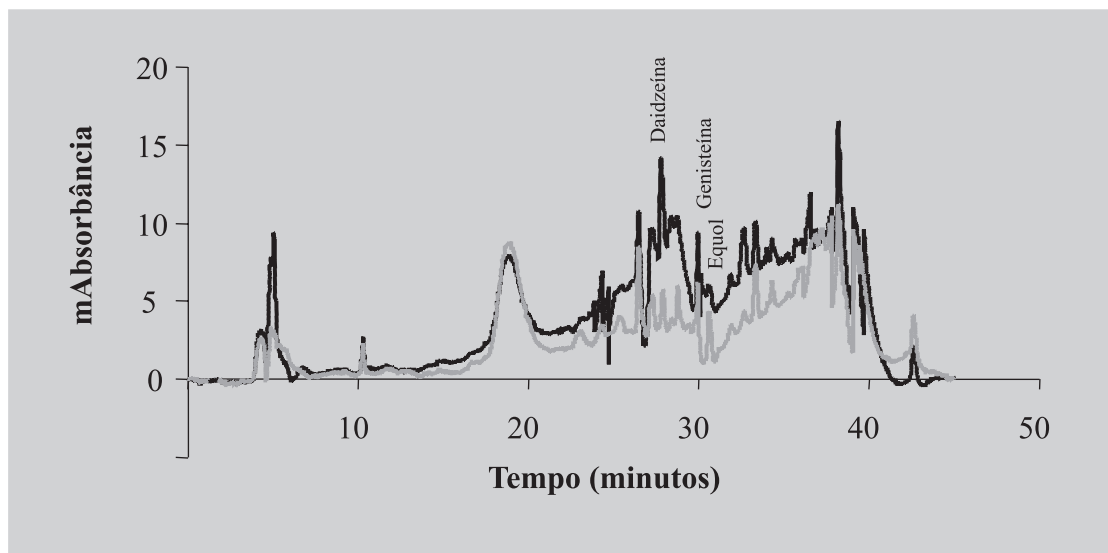
As Figuras 9, 10 e 11 mostram os cromatogramas obtidos de mistura de padrões, de amostra de plasma e de amostra de urina. O equol é melhor detectado em 280 nm e as demais isoflavonas são detectadas em 262 nm. Os picos correspondentes aos glicosídeos genistina e daidzina não são observados na escala mostrada.

## DISCUSSÃO

O melaço de soja é atualmente descartado pela indústria brasileira de produtos derivados da soja, mas o seu aproveitamento pode ser de grande importância econômica. O melaço da soja é obtido a partir de extrato hidro-alcoólico produzido durante o processo industrial de extração da proteína da soja, sendo que apenas o etanol é

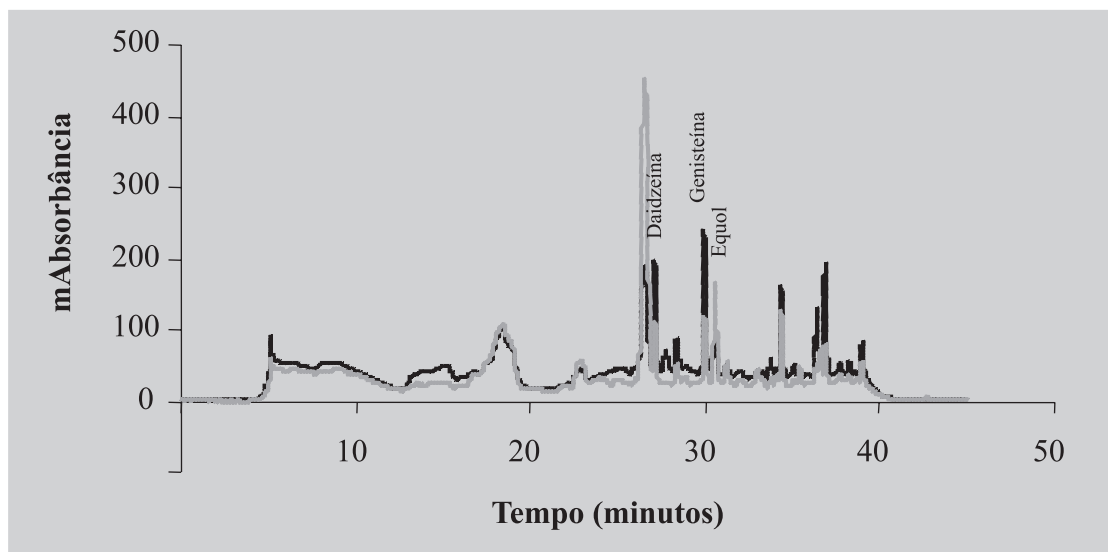


**FIGURA 9** - Cromatograma obtido de mistura de padrões de isoflavonas. Comprimento de onda: — 262 nm; comprimento de onda: — 280 nm.



**FIGURA 10** - Cromatograma de isoflavonas de amostra de plasma. Comprimento de onda: — 262 nm; comprimento de onda: — 280 nm.





**FIGURA 11** - Cromatograma de isoflavonas de uma amostra de urina. Comprimento de onda: —262 nm; comprimento de onda: —280 nm.

reaproveitado pela indústria. Para definir a metodologia mais adequada para a extração de isoflavonas presentes no melaço de soja, foram utilizadas metodologias de extração empregadas para a extração de isoflavonas a partir das farinhas, isolados protéicos e outros derivados da soja. Genovese *et al.* (2001) descreveram que o metanol 80% é o solvente mais adequado para a extração de isoflavonas de produtos derivados de soja, tais como, farinha desengordurada, isolado protéico e proteína texturizada de soja. No entanto, para a extração das isoflavonas presentes no melaço, o etanol 90% mostrou maior eficiência, sendo capaz de eliminar grande quantidade de contaminantes, incluindo os carboidratos. A maioria dos outros contaminantes que permaneceram após a extração com etanol 90% foram eliminados na extração em fase sólida. O extrato purificado também se mostrou isento de contaminação por saponinas, que têm comprovada ação hipocolesterolêmica (Petit *et al.*, 1995; Morehouse *et al.*, 1999), o que poderia interferir na utilização deste extrato em estudos experimentais. A elevação da temperatura para 40 °C não interferiu na concentração do extrato. Genovese *et al.* (2001) também verificaram que esta temperatura, utilizada durante a concentração dos extratos, não alterou a concentração das isoflavonas presentes na amostra.

As isoflavonas presentes no extrato purificado do melaço da soja mostraram-se biodisponíveis, sendo detectadas no plasma e na urina dos animais. As isoflavonas glicosiladas (genistina e daidzina) não foram detectadas no plasma (Figuras 6 e 10) porque os glicosídeos são

hidrolisados pelo ácido gástrico estomacal (Xu *et al.*, 1995) e/ou clivados pelas  $\beta$ -glicosidases produzidas por bactérias da flora intestinal, tais como, *Lactobacilli*, *Bacteroides* e *Bifidobacteria* (Xu *et al.*, 1995; Friend *et al.*, 1984), resultando em suas agliconas genisteína e daidzeína, respectivamente. Recentemente, demonstrou-se que a genisteína e a daidzeína são detectadas no sangue periférico humano, cerca de 15 minutos após o consumo da proteína texturizada da soja, sugerindo a hidrólise dos glicosídeos no trato gastrointestinal superior (Bowey *et al.*, 1998). Day *et al.* (1998) mostraram que extrato de células do intestino delgado humano são capazes de hidrolisar os glicosídeos das isoflavonas, através das  $\beta$ -glicosidases citosólicas. Este processo é importante porque as agliconas das isoflavonas são mais biodisponíveis que as suas formas conjugadas (King *et al.*, 1996; Huthchins *et al.*, 1995). No intestino, também, ocorre a formação de metabólitos específicos pelas bactérias intestinais. Assim, a genisteína pode ser convertida a *p*-etilfenol e 6-hidroxi-*O*-desmetilangolesina (6-OH-*O*-DMA) e a daidzeína pode ser convertida a equol e *O*-desmetilangolesina (*O*-DMA) (Kelly *et al.*, 1993). As agliconas, os glicosídeos, em menor proporção, e alguns metabólitos bacterianos são absorvidos do trato gastrointestinal, sendo conjugados no fígado com ácido glicurônico e sulfato (Griffiths, Barrow, 1972). Esses conjugados, posteriormente, sofrem recirculação entero-hepática (Joanneau *et al.*, 1995).

Neste trabalho, verificou-se que a genisteína e seu glicosídeo, genistina, são menos biodisponíveis que a daidzeína e sua forma glicosilada, daidzina, pois, embora

tenha sido administrada dose maior de genisteína e genistina (Figura 5), as concentrações de daidzeína e daidzina foram mais elevadas no plasma e na urina dos coelhos (Figuras 6 e 7). A daidzeína é mais resistente que a genisteína frente ao metabolismo bacteriano, em ratos (Griffiths, Smith, 1972) e em humanos (Xu *et al.*, 1995). Conseqüentemente, a daidzeína está presente em maiores concentrações no intestino por um longo período de tempo, sendo mais biodisponível que a genisteína. Tew *et al.* (1996) sugeriram que a genisteína tem menor biodisponibilidade que a daidzeína devido à sua baixa eliminação urinária. A daidzeína pode ser eliminada mais rapidamente na urina que a genisteína, provavelmente, pelo fato de compostos com três grupos hidroxila livres, como a genisteína, serem mais rapidamente excretados para a bile (Adlercreutz, Luukainen, 1967). Estudos realizados em humanos mostram que ocorre variação individual considerável no metabolismo das isoflavonas, o que poderia estar relacionado às diferenças na resposta da flora bacteriana intestinal à dieta (Xu *et al.*, 1995; Lampe *et al.*, 1998). Alguns indivíduos não são capazes de excretar quantidades significativas de equol, não havendo relação entre a excreção de equol e O-DMA (Rowland *et al.*, 2000). O consumo de lipídeos parece diminuir a capacidade da flora bacteriana intestinal de sintetizar equol (Rowland *et al.*, 2000).

Os metabólitos das isoflavonas têm propriedades diferentes dos seus compostos precursores. O equol tem efeito estrogênico três vezes maior que a daidzeína em células de tumor endometrial (Markiewicz *et al.*, 1993). Estudos *ex vivo* têm demonstrado que o equol também é um antioxidante mais potente que a daidzeína (Arora *et al.*, 1998; Wiseman *et al.*, 1998). A excreção urinária elevada de equol tem sido associada à diminuição do risco de câncer de mama (Ingram *et al.*, 1997). O consumo das isoflavonas da soja e, conseqüentemente, a presença dessas substâncias e de seus metabólitos no plasma, estão relacionados com a redução do risco de várias doenças como câncer, osteoporose e doenças cardiovasculares, além de reduzir os sintomas da menopausa (Messina, 1999). Portanto, a demonstração de que as isoflavonas presentes no extrato obtido do melaço da soja são absorvidas e metabolizadas contribui para a validação do mesmo em estudos experimentais e clínicos.

## CONCLUSÕES

A purificação das isoflavonas a partir do melaço obtido da soja, pelo protocolo descrito neste trabalho, fornece preparação adequada para a utilização em estudos experimentais. Estes dados fornecem subsídios a estudos futuros, cujo objetivo seja a suplementação com isoflavonas,

além de indicar às indústrias, que atualmente descartam o melaço obtido da soja, possível utilização comercial deste subproduto.

## ABSTRACT

### Evaluation of plasmatic and urinary concentrations of purified soy isoflavones

*Soy isoflavones show antioxidant and estrogenic effects and have been related to decreased risk of cancer and cardiovascular diseases. The goal of the present study was to standardize the extraction of isoflavones from soy molasses and to evaluate the plasmatic and urinary concentrations of isoflavones in rabbits after consumption of extracted isoflavones. Isoflavones were extracted with 90% ethanol and purified with a C18 column. The extraction yield was 81%. The purified isoflavone extract was added to the chow (5 mg isoflavone/kg body weight/day) used for feeding rabbits during 6 months. The concentration of isoflavones (genistein and daidzein) in the extracts, chow, blood plasma and urine was determined by high performance liquid chromatography. The mean concentration of isoflavones in blood plasma was 4 mM and the urinary excretion was 22 µmol/24 h. The extraction of isoflavones from soy molasses resulted in a suitable preparation for experimental studies.*

*UNITERMS: Isoflavones. Phytoestrogens. Soy molasses. Genistein. Equol.*

## AGRADECIMENTOS

À FAPESP, pela Bolsa de Mestrado concedida à Isabela R. O. Pereira e pelo financiamento do projeto; ao CNPq, pela bolsa de produtividade em pesquisa concedida à Dulcineia S.P. Abdalla, e à Ceval Alimentos S/A, pelo fornecimento do melaço obtido da soja.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLERCREUTZ, H., LUUKAINEN, T. Biochemical and clinical aspects of the enterohepatic circulation of oestrogens in man. *Acta Endocrinol*, Kobenhavn, v.124, (suppl.), p.101-140, 1967.
- AKIYAMA, T., ISHIDA, J., NAKAGAWA, S., OGAWARA, H., WATANABE, S., ITOH, N., SHIBUYA, M., FUKAMI, Y. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v.262, n.12, p.5592-5, 1987.

- ARORA, A., NAIR, M. G., STRASBURG, G. M. Antioxidant activities of isoflavones and their biological metabolites in a liposomal system. *Arch. Biochem. Biophys.*, New York, v.356, n.2, p.133-41, 1998.
- BARNES, S., KIRK, M., COWARD, L. Isoflavones and their conjugates in soy foods - extraction conditions and analysis by HPLC Mass-Spectrometry. *J. Agr. Food. Chem.*, Easton, v.42, n.11, p.2466-2474, 1994.
- BOWEY, W. A., ROWLAND, I. R., ADLERCRUTZ, H., SANDRS, T. A. B. WISEMAN, H. Isoflavone phytoestrogens as functional ingredients in soya products: physiological importance of metabolism and possible indications for their rapid absorption following consumption of textured vegetable protein. In: SADLER, M. J., SALTMARSH, M, eds. *Functional Foods: the consumer, the products and the evidence*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1998. p. 120-123.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento - Ministério da Agricultura, pecuária e abastecimento. [Online]. Disponível em: [http://www.conab.gov.br/politica\\_agricola/Safra/avalia.html](http://www.conab.gov.br/politica_agricola/Safra/avalia.html). Acesso em: Fev., 2002.
- DAY, A. J., DUPONT, M. S., RIDLEY, S., RHODES, M., RHODES, M. J., MORGAN, M. R., WILLIAMSON, G. Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver beta-glucosidase activity. *FEBS Lett.*, Amsterdam, v.436, n.1, p.71-5, 1998.
- DE KLEIJN, M. J., VAN DER SCHOUW, Y. T., WILSON, P. W., GROBBEE, D. E., JACQUES, P. F. Dietary intake of phytoestrogens is associated with a favorable metabolic cardiovascular risk profile in postmenopausal U.S. women: the Framingham study. *J. Nutr.*, Bethesda, v.132, n.2, p.276-82, 2002.
- FRANKE, A. A., CUSTER, L. J., TANAKA, Y. Isoflavones in human breast milk and other biological fluids. *Am. J. Clin. Nutr.*, Bethesda, v.68, suppl., p.1466S-1473S, 1998.
- FRIEND, D. R., CHANG, G. W. A colon-specific drug-delivery system based on drug glycosides and the glycosidases of colonic bacteria. *J. Med. Chem.*, Columbus, v.27, p.261-266, 1984.
- FUKUTAKE, M., TAKAHASHI, M., KANAMURA, H., SUGIMURA, T., WAKABAYASHI, K. Quantification of genistein and genistin in soybeans and soybean products. *Food Chem. Toxicol.*, Amsterdam, v.34, n.5, p.457-461, 1996.
- FURMAN, M. I., GRIGORYEV, D., BRAY, P. F., DISE, K. R., GOLDSCHMIDT-CLERMONT, P. J. Platelet tyrosine kinases and fibrinogen receptor activation. *Circ. Res.*, Baltimore, v.75, n.1, p.172-180, 1994.
- GENOVESE, M. I., LAJOLO, F. M. Determinação de isoflavonas em derivados de soja. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 21, p. 86-93, 2001.
- GRIFFITHS, L. A., BARROW, A. Metabolism of flavonoid compounds in germ-free rats. *Biochem. J.*, Colchester, v.130, p.1161-1162, 1972.
- GRIFFITHS, L. A., SMITH, G. E. Metabolism of apigenin and related compounds in the rat. *Biochem. J.*, Colchester, v.128, p.901-911, 1972.
- HONORÉ, E. K., WILLIAMS, J. K., ANTONY, M. S., CLARKSON, T. B. Soy isoflavones enhance coronary vascular reactivity in atherosclerotic female macaques. *Fertil. Steril.*, Birmingham, v.67, p.148-154, 1997.
- HUTCHINS, A. M., SLAVIN, J. L., LAMPE, J. W. Urinary isoflavonoid phytoestrogen and lignan excretion after consumption of fermented and unfermented soy products. *J. Am. Diet. Assoc.*, Chicago, v.95, p.545-551, 1995.
- INGRAM D, SANDERS K, KOLYBABA M, LOPEZ D. Case-control study of phyto-oestrogens and breast cancer. *Lancet*, London, v.350, n.9083, p.990-4, 1997.
- JOANNOU, G. E., KELLI, G. E., REEDER, A. Y., WARING, M. A., NELSON, C. A. urinary profile study of dietary phytoestrogens: the identification and mode of metabolism of new isoflavonoids. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, Amsterdam, v.54, p.167-184, 1995.
- KELLY, G. E., NELSON, C., WARING, M. A., JOANNOU, G. E., REEDER, A. Y. Metabolites of dietary (soya) isoflavones in human urine. *Clin. Chim. Acta*, Shannon, v.223, p.9-22, 1993.

- KING, R. A., BROADBENT, J. L., HEAD, R. J. Absorption and excretion of the soy isoflavone genistein in rats. *J. Nutr.*, Bethesda, v.126, n.1, p.176-82, 1996.
- KING, R. A., BROADBENT, J. L., HEAD, R. J. Absorption and excretion of the soy isoflavone genistein in rats. *J. Nutr.*, Bethesda, v.126, p.176-182, 1996.
- LAMPE, J. W., KARR, S. C., HUTCHINS, A. M., SLAVIN, J. L. Urinary equol excretion with a soy challenge: influence of habitual diet. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, Malden, v.217, n.3, p.335-9, 1998.
- MÄKELÄ, S., SAVOLAINEN, H., AAVIK, E., MYLLÄRNIEMI, M., STRAUSS, L., TASKINEN, E., GUSTAAFSSON, J-A. O., HÄYRY, P. Differentiation between vasculoprotective and uterotrophic effects of ligands with different binding affinities to estrogen receptors a and b. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Washington, v.96, p.7077-7082, 1999.
- MARKIEWICZ, L., GAREY, J., ADLERCREUTZ, H., GURPIDE, E. In vitro bioassays of non-steroidal phytoestrogens. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, Oxford, v.45, n.5, p.399-405, 1993.
- MESSINA, M. J. Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. *Am. J. Clin. Nutr.*, Bethesda, v.70 Suppl 3, p.439S-450S, 1999.
- MESSINA, M. Soy intake and cancer risk: A review of the in vitro and in vivo data. *Nutr. Cancer*, Mahwah, v.21, p.113-131, 1994.
- MOREHOUSE, L. A., BANGERTER, F. W., DENINNO, M. P., INSKEEP, P. B., MCCARTHY, P. A., PETTINI, J. L., SAVOY, Y. E., SUGARMAN, E. D., WILKINS, R. W., WILSON, T. C., WOODY, H. A., ZACCARO, L. M., CHANDLER, C. E. Comparison of synthetic saponin cholesterol absorption inhibitors in rabbits: evidence for a non-stoichiometric, intestinal mechanism of action. *J. Lipid Res.*, Bethesda, v.40, n.3, p.464-474, 1999.
- MURPHY, P. A. Phytoestrogen content of processed soybean products. *Food Technol.*, Chicago, v.36, p.60-64, 1982.
- NESTEL, P. J., YAMASHITA, T., SASAHARA, T., POMEROY, S., DART, A., KOMESAROFF, P., OWEN, A., ABBEY, M. Soy isoflavones improve systemic arterial compliance but not plasma lipids in menopausal and perimenopausal women. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, Baltimore, v.17, p.3392-3398, 1997.
- OLESZC, W. Solid Phase Extraction-Fractionation of Alfalfa Saponins. *J. Sci. Food Agric.*, New York, v. 44, p.43-49, 1988.
- PETIT, P. R., SAUVAIRE, Y. D., HILLAIRE-BUYS, D. M., LÉCONTE, O. M., BAISSAC, Y. G., PONSIN, G. R., RIBES, G. R. Steroid saponins from fenugreek seeds: extraction, purification, and pharmacological investigation on feeding behavior and plasma cholesterol. *Steroids*, New York, v.60, n.10, p.674-680, 1995.
- RAINES, E. W., ROSS, R. Biology of atherosclerotic plaque formation: possible role of growth factors in lesion development and potential impact of soy. *J. Nutr.*, Bethesda, v.125, suppl.3, p.624S-630S, 1995.
- ROWLAND, I. R., WISEMAN, H., SANDERS, T. A., ADLERCREUTZ, H., BOWEY, E. A. Interindividual variation in metabolism of soy isoflavones and lignans: influence of habitual diet on equol production by the gut microflora. *Nutr. Cancer*, Hillsdale, v.36, n.1, p.27-32, 2000.
- RUIZ-LARREA, M. B., MOHAN, A. R., PAGANGA, G., MILLER, N. J., BOLWELL, G. P., RICE-EVANS, C. A. Antioxidant activity of phytoestrogenic isoflavones. *Free Radical Res.*, Amsterdam, v.26, p.63-70, 1997.
- SANTELL, R. C., CHANG, Y. C., NAIR, M. G., HELFERICH, W. G. Dietary genistein exerts estrogenic effects upon the uterus, mammary gland and the hypothalamic/pituitary axis in rats. *J. Nutr.*, Bethesda, v.127, p.263-269, 1997.
- TEW, B. Y., XU, X., WANG, H. J., MURPHY, P. A., HENDRICH, S. A. Diet high in wheat fiber decreases the bioavailability of soybean isoflavones in a single meal fed to women. *J. Nutr.*, Bethesda, v.126, n.4, p.871-7, 1996.

- TIKKANEN, M.J. and ADLERCREUTZ, H. Dietary Soy-Derived Isoflavone Phytoestrogens. Could they have a role in coronary heart disease prevention? *Biochem. Pharmacol.*, New York, v.60, p.1-5, 2000.
- WANG, G., HUEI-J., U., MURPHY, P. A. Mass balance study of isoflavones during soybean processing. *J. Agric. Food Chem.*, Columbus, v.44, p.2377-2383, 1996.
- WEI, H., WEI, L., FRENKEL, K., BOWEN, R., BARNES, S. Inhibition of tumor promoter-induced hydrogen peroxide formation *in vitro* and *in vivo* by genistein. *Nutr. Cancer*, Mahwah, v.20, n.1, p.1-12, 1993.
- WISEMAN, H., O'REILLY, J., LIM, P., GARNETT, A. P., HUANG, W-C. Antioxidant properties of the isoflavones phytoestrogen functional ingredient in soya products. In: SADLER, M., SALTMARSH, M., eds. *Functional Foods, the consumer, the products and the evidence*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1998. p. 80-86.
- XU, X., HARRIS, K. S., WANG, H. J., MURPHY, P. A., HENDRICH, S. Bioavailability of soybean isoflavones depends upon gut microflora in women. *J. Nutr.*, Bethesda, v.125, p.2307-2315, 1995.

Recebido para publicação em 04 de abril de 2002.