

DETERMINAÇÃO DE ISOFLAVONÓIDES EM FEIJÃO COMUM PARA SELEÇÃO DE LINHAGENS COM VALOR NUTRACÊUTICO AGREGADO

PAULA F. DE LIMA¹; LYDIA YAMAGUCHI²; MASSUO J. KATO³; ALISSON F.
CHIORATO⁴; CARLOS A. COLOMBO⁵; SÉRGIO A. M. CARBONELL⁶

Nº 11155

RESUMO

Os fitoestrógenos têm sido alvo permanente de estudos devido a sua possível atividade estrogênica. Em leguminosas, as isoflavonas são os fitoestrógenos mais comuns e a busca pelos seus benefícios à saúde humana apresenta crescente interesse.

Sendo o feijão (*Phaseolus vulgaris*) a leguminosa mais consumida pela população brasileira, o presente trabalho avaliou 15 genótipos dessa cultura quanto à presença de isoflavonóides em folhas e grãos visando incorporar essa característica ao programa de melhoramento do feijoeiro do IAC (Instituto Agrônomo de Campinas) e agregar valor nutracêutico ao feijão.

Os resultados evidenciaram a presença dos isoflavonóides agliconas daidzeína e genisteína e 2,3-dihidroquievitona em dez genótipos de feijão. Daidzeína apresentou maior ocorrência em grãos de origem mesoamericana e genisteína e 2,3-dihidroquievitona principalmente em grãos do tipo preto.

¹ Bolsista CNPq: Graduação em Química, USP, São Paulo-SP, paulalima.usp@gmail.com

² Colaboradora: Pesquisadora, Laboratório de Química dos Produtos Naturais/USP, São Paulo-SP.

³ Colaborador: Pesquisador, Laboratório de Química dos Produtos Naturais /USP, São Paulo-SP.

⁴ Colaborador: Pesquisador, Centro Grãos e Fibras/IAC, Campinas-SP.

⁵ Colaborador: Pesquisador, Centro de Recursos Genéticos Vegetais/IAC, Campinas-SP.

⁶ Orientador: Pesquisador, Centro Grãos e Fibras/IAC, Campinas-SP.

ABSTRACT

Phytoestrogens has been the subject of studies due to its possible estrogenic activity. In legumes, isoflavones are phytoestrogens most common and the search for its benefits to human health is gaining increasing interest.

As the bean (*Phaseolus vulgaris*) the legume most consumed by the Brazilian population, this study evaluated 15 genotypes of this culture for the presence of isoflavones in leaves and grains in order to incorporate this feature in common bean breeding program of IAC (Agronomic Institute of Campinas) and add nutraceutical value to the beans.

The results showed the presence of isoflavones daidzein, genistein and 2,3-dehidrokievitona in ten genotypes of beans. Daidzein occurred mostly in grains of Mesoamerican origin and genistein and 2,3-dehidrokievitona mainly black grains.

INTRODUÇÃO

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) é um dos principais alimentos da população brasileira, fonte protéica na dieta humana, além de conter grandes quantidades de carboidratos complexos, fibras e isoflavonas (ANDERSON et al., 1999), além de representar importante fonte de ferro, fósforo, magnésio, manganês, zinco e cálcio (BROUGHTON et al., 2003). Considerado o mais importante das 50 espécies de *Phaseolus* nativas das Américas, ocupa mais de 85% das áreas semeadas desse gênero em todo do mundo (SINGH et al., 2005), sendo o Brasil o maior produtor e consumidor mundial do grão (Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB). Porém, um aspecto atualmente considerado importante e até então não abordado no melhoramento genético do feijoeiro é quanto ao seu potencial nutracêutico e presença de substâncias antioxidantes.

Substâncias antioxidantes como os flavonóides, e mais especificamente os isoflavonóides, são considerados fitoestrógenos devido à semelhança estrutural com 17 β -estradiol, um dos estrogênios mais utilizados na reposição hormonal. Além de possuírem capacidade antioxidante, os isoflavonóides podem atuar prevenindo sintomas da menopausa, doenças cardiovasculares e também o câncer (EWALD et al., 1999) pela provável ação com receptores de estrógenos. Propriedades estrogênicas e antiestrogênicas encontradas em alimentos têm sido a causa pela busca de novas fontes, sobretudo de isoflavonas em plantas (BOUÉ et al., 2011). No

caso das isoflavonas, sua ação terapêutica potencial reside em sua fraca atividade estrogênica com efeito protetor contra algumas doenças hormonais, muito embora outras atividades biológicas estão sendo propostas (PEÑALVO et al., 2003). São encontradas em concentrações mais acentuadas entre as leguminosas, sobretudo em soja, onde o seu teor é afetado por fatores ambientais e genéticos (GENOVESE E LAJOLO, 2002).

No feijoeiro, os estudos sobre a presença de isoflavonas são bastante limitados e assim, pretende-se com a presente proposta investigar a presença de isoflavonas em folhas e sementes de feijão e, desta forma, inserir mais uma característica relacionada com qualidade de grãos no programa de melhoramento genético da cultura, com vistas à seleção de linhagens com maiores teores de isoflavonas e, conseqüentemente, de maior valor nutracêutico.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do material vegetal

O material para estudo foi representado por 15 genótipos de ampla diversidade genética da espécie (Tabela 1). As sementes de cada cultivar foram semeadas em linha de 5 metros de comprimento (10 plantas/m linear) totalizando uma área de 105m² do Centro Experimental Fazenda Santa Elisa (Campinas) e o cultivo mantido dentro das normas técnicas recomendadas para a cultura.

Tabela 1. Genótipos de feijão comum representando os dois centros de origem da espécie (A: Andino/ M: Mesoamericano) para identificação de isoflavonóides.

Genótipos	Tipo de Grão	Origem
1 - IAC Diplomata - IAC	Preto	M
2 - IAC Una – IAC	Preto	M
3 - IAC Uirapuru – IAC	Preto	M
4 - IAC Alvorada – IAC	Carioca	M
5 - Pérola – Embrapa	Carioca	M
6 - Carioca comum – IAC	Carioca	M
7 - TU – CIAT	Preto	A
8 - IAC Harmonia – IAC	Rajado	A
9 - IAC Boreal – IAC	Rajado	A
10 - Brancão Argentino - INA	Branco	A
11 - IAC Jabola – IAC	Jabola	A
12 - IAC Esperança – IAC	Bolinha	
13 - Flor de Mayo – CIAT	Avermelhado	
14 - ARC 1 – BAG IAC	Preto	M
15 - RAZ 55 – BAG IAC	Preto	M

O experimento foi conduzido de 16 de dezembro de 2010 a 2 de abril de 2011 e de acordo com as condições climáticas do local. Essas condições foram registradas

pela estação climática presente no Centro Experimental Fazenda Santa Elisa (Campinas) apresentando temperaturas entre 16,4°C e 26,8°C. Folhas jovens de cada cultivar foram coletadas após um mês de plantio e mantidas em liofilizador para eliminação de toda a água. Após três meses de campo sementes de todos os genótipos foram colhidas e mantidas em estufa de secagem a 30°C.

Tanto folhas quanto grãos de todos os genótipos foram pulverizados em moinho até a obtenção de um fino pó e estocados ao abrigo da umidade.

Extração e Purificação dos isoflavonóides

A extração dos isoflavonóides foi conduzida segundo ROMANI et al. (2004) com adaptações, onde dois gramas de grãos secos e pulverizados foram extraídos três vezes com 60mL de etanol 70% pH 2,0 ajustado com ácido fórmico. Para as folhas foram utilizados 0,4g de tecido seco e pulverizado e 12,5mL de solvente de extração. Cada passo envolveu a extração durante 24 horas a temperatura ambiente. Os extratos foram particionados três vezes com 60mL de hexano (para grãos) e 12,5mL (para folhas) seguido de centrifugação a 10000rpm durante 10 minutos. Os sobrenadantes foram combinados e o solvente rotaveaporado até quase *secura*.

As amostras de grãos e folhas foram preparadas em metanol/água 1:1 na concentração final de 10mg/mL e 1mg/mL, seguida de filtragem em filtro PTFE 13mm de 0,45µm. O mesmo procedimento foi realizado para o preparo dos padrões dos isoflavonóides agliconas daidzeína e genisteína e de suas formas conjugadas daidzina e genisteína, e também do padrão flavonol quercetina, todos a 1mg/mL.

As análises para a identificação dos isoflavonóides foram conduzidas em aparelho HPLC-DAD Shimadzu (*High Pressure Liquid Chromatography - Diode Array Detector*) e em HPLC acoplado a espectrômetro de massas, LC-MS/ESI-qTOF MicroTOF QII Bruker (*Liquid Chromatography - Mass Spectrometry/Electrospray Ionization-Time-of-Flight*).

Para a análise via HPLC-DAD, 20µL de cada amostra de grão e 10µL de cada amostra de folha foram injetados a uma taxa de 0,5mL/min em coluna de fase reversa C₁₈ de 4µm (250 x 3,0mm) operando a 30°C. Como fase móvel foi utilizado solvente (A) metanol/ácido fórmico (95:5) e (B) água/ácido fórmico (95:5). O método de gradiente de solvente empregado durante 65 minutos constou de três etapas, iniciando com 30% de solução A e 70% de solução B de 0 a 4 minutos; 100% de solução A até 50 minutos; finalizando com 30% de solução A e 70% de solução B até 65 minutos, com uma taxa de vazão de 0,5ml/min. Os cromatogramas foram registrados em

comprimento de onda de 254, 270 e 330nm. As análises LC-MS/ESI-qTOF foram realizadas utilizando os mesmos eluentes da separação cromatográfica descrita anteriormente, em coluna C₁₈ (2) de 3µm (180 x 2,0mm) iniciando com 50% de solução A e 50% de solução B de 0 a 15 minutos, 100% de solução A até 17 minutos, finalizando com 50% de solução A e 50% de solução B até 20 minutos, fluxo de 250µL/min, temperatura de gás de 180°C, vazão de 4L/min de nitrogênio, pressão de nebulização de 0,4bar, temperatura de tripolo de 180°C e voltagem capilar de 4,5kV. Os espectros foram registrados no modo negativo para a identificação de isoflavonóides e flavonóis e no modo positivo para as antocianinas. Foram realizadas análises de componentes principais a partir dos dados de tempo de retenção e de fragmentação de flavonóides detectados em folhas e grãos nos 15 genótipos de feijão do estudo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quinze genótipos (folhas e grãos) foram analisados quanto a identificação de isoflavonóides. Também foi verificada a presença de outros flavonóides (flavonol) e antocianinas nesses mesmos materiais. Do total de materiais avaliados dez genótipos apresentaram isoflavonóides agliconas sendo elas daidzeína, genisteína e 2,3-dihidrokievitone presentes em grãos do tipo preto, carioca, jabola, bolinha e avermelhado (Tabela 2 e Figura 1), não sendo identificados isoflavonóides em folhas.

Tabela 2. Identificação dos isoflavonóides nas 10 genótipos de feijão (tipo de grão e centro de origem diferentes) em função do tempo de retenção (t_R) encontrados nas análise via LC-MS/ESI-qTOF. M: origem mesoamericana; A: origem andina.

Genótipos	Tipo de Grão	Origem	Isoflavonóides (t_R)		
			<i>Daidzeína</i>	<i>Genisteína</i>	<i>2,3-Dihidrokievitona</i>
1 - IAC Diplomata	Preto	M	7,13	8,64	13,06
2 - IAC Una	Preto	M	7,85	8,62	13,62
3 - IAC Uirapuru	Preto	M	—	8,74	12,96
5 - Pérola	Carioca	M	—	8,67	12,89
7 - TU	Preto	A	7,18	—	—
11 - IAC Jabola	Jabola	A	—	8,67	13,09
12 - IAC Esperança	Bolinha		—	8,79	12,80
13 - Flor de Mayo	Avermelhado		—	8,70	12,95
14 - ARC 1	Preto	M	—	8,62	12,87
15 - RAZ 55	Preto	M	7,10	8,60	12,85

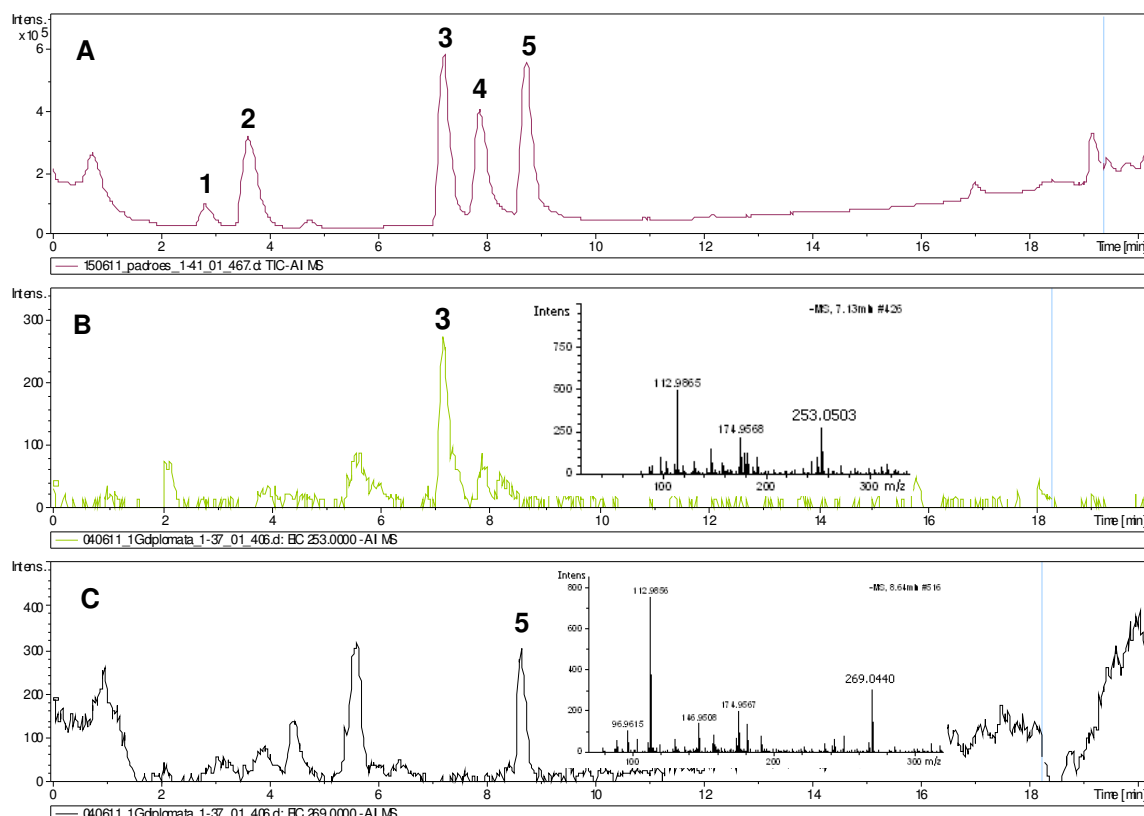


Figura 1. Perfil de separação dos isoflavonóides do genótipo Diplomata (grão preto) em função do tempo de retenção e fragmentação obtidos via LC-MS/ESI-qTOF. (A): Padrões 1-Daidzina; 2-Genistina; 3-Daidzeína; 4-Quercetina; 5-Genisteína. (B) Daidzeína e (C) Genisteína.

Os resultados aqui encontrados corroboram com os da literatura (ROMANI et al., 2004; BOUÉ et al., 2011) descritos para grãos de feijão. Genisteína e 2,3-dihidrokievitona ocorreram em dez genótipos exceto para TU. Já a presença de daidzeína apresentou menor distribuição entre os genótipos estudados, ocorrendo somente em grãos do tipo preto (Tabela 2). Esses resultados também foram encontrados por ROMANI et al. (2004) em germoplasma de feijão Zolfino, uma variedade de tegumento preto típica da região da Toscana. Estudos recentes demonstraram que isoflavonas agliconas são melhores absorvidas no intestino humano em relação às formas glicosiladas (PASCUAL-TERESA et al., 2006).

Os resultados para grãos e folhas foram confirmados também através do perfil de fragmentação de cada isoflavonóide. O espectro de massas no modo negativo para daidzeína e genisteína evidenciou sinal em m/z 253 e m/z 269, respectivamente, ambos de acordo com as fragmentações verificadas no genótipo Diplomata (Figura 1). Já o sinal que caracterizou 2,3-dihidrokievitona apresentou m/z 353. Os espectros de fragmentações permitiram ainda a identificação, em grãos e folhas, de kievitona (isoflavanona) em m/z 355, quercetina em m/z 301, kaempferol em m/z 285 e

miricetina (flavonol) em m/z 317. Coumestrol, um coumestano com ampla atividade estrogênica (BOUÉ et al., 2011) foi identificado em m/z 267, e cianidina e delphinidina foram evidenciadas através das fragmentações em modo positivo em m/z 287 e m/z 303, respectivamente. A análise de componentes principais, baseada no tempo de retenção e fragmentação de flavonóides, evidenciou a formação de dois grupos distintos para as amostras de folhas, separando-os em função do centro de origem genética (Andino ou Mesoamericano) e tipo de grão (Figura 2). Esse resultado foi confirmando tanto para o PCA dos tempos de retenção (HPLC-DAD) quanto da análise oriunda das fragmentações (LC-MS/ESI- q TOF), sendo que os dois primeiros componentes principais reuniram 76% e 79% da variância genética em ambos os casos, respectivamente.

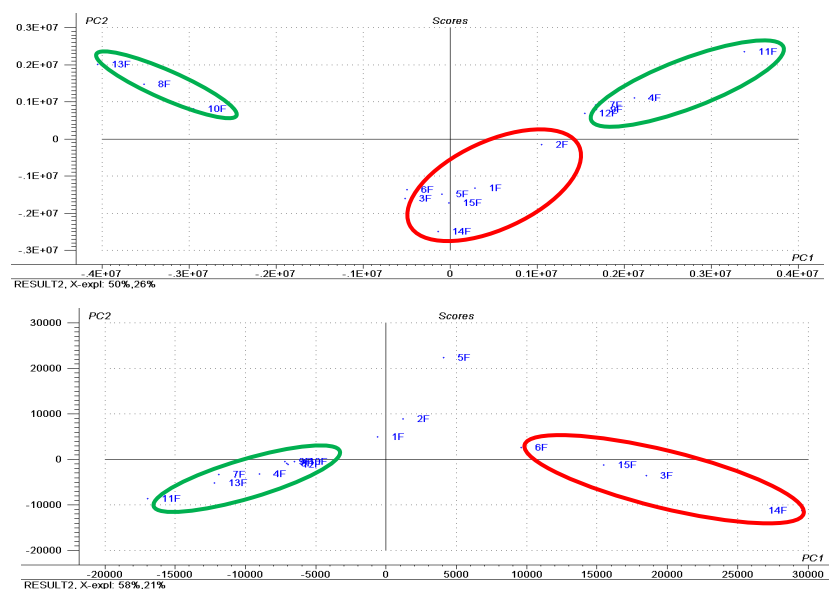


Figura 2. (A) PCA dos 15 genótipos s de folhas após separação em HPLC-DAD indicando a formação de três grupos em função do tempo de retenção de todos os flavonóides detectados. (B) PCA dos 15 genótipos de folhas após separação em LC-MS/ESI- q TOF indicando a formação de dois grupos em função das fragmentações (massas) de todos os flavonóides detectados. Em vermelho, separação preferencial das amostras de origem mesoamericana com tipo de grãos preto. Em verde separação preferencial das amostras de origem andina.

CONCLUSÃO

Os resultados encontrados revelaram a existência de isoflavonóides em feijão num estudo inédito direcionado ao programa de melhoramento do feijoeiro do IAC. Mesmo que preliminares esses resultados servirão de base para o aprofundamento das pesquisas de obtenção de cultivares de feijão com maior valor nutracêutico.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq – PIBITI, pela bolsa concedida.

Ao Laboratório de Química dos Produtos Naturais (LQPN) da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de desenvolvimento do trabalho, em especial a pesquisadora Dra. Lydia Yamaguchi pela execução das análises em LC-MS/ESI-qTOF.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, J.W.; SMITH, B.M.; WASHNOCK, C.S. Cardiovascular and renal benefits of dry bean and soybean intake. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 70, p. 464-474, 1999.

BOUÉ, S.M.; BUROW, M.E.; WIESE, T.E.; SHIH, B.Y.; ELLIOTT, S.; CARTER-WIENTJES, C.H.; McLACHLAN, J.A.; BHATNAGAR, D. Estrogenic and antiestrogenic activities of phytoalexins from red kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 112-120, 2011.

BROUGHTON, W.J.; HERNÁNDEZ, G.; BLAIR, M.W.; BEEBE, S. 2003. Beans (*Phaseolus* spp.) - model food legumes. **Plant Soil**, n. 252, p. 55-128, 2003.

EWALD, C.; FJELKNER-MODIG, S.; JOHANSSON, K.; SJÖHOLM, I.; AKESSON, B. Effect of processing on major flavonoids in processed onions, green beans and peas. **Food Chemistry**, v. 64, p. 231-235, 1999.

GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Isoflavones in soy-based consumed in Brazil: levels, distribution and estimate intake. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 5987-5993, 2002.

PASCUAL-TERESA, S.; HALLUND, J.; TALBOT, D.; SCHROOT, J.; WILLIAMS, C.M.; BUGEL, S.; CASSIDY, A. Absorption of isoflavones in humans: effects of food matrix and processing. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 17, p. 257-264, 2006.

PEÑALVO, J.L.; NURMI, T.; ADLERCREUTZ, H. A simplified HPLC method for total isoflavones in soy products. **Food Chemistry**, v. 87, p. 297-305, 2004.

ROMANI, A.; VIGNOLINI, P.; GALARDI, C.; MULINACCI, N.; BENEDETTELLI, S.; HEIMLER, D. Germplasm characterization of Zolfino Landraces (*Phaseolus vulgaris* L.) by flavonoid content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 3838-3842, 2004.