



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS SOCIAIS, SAÚDE E TECNOLOGIA.
COORDENAÇÃO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

RAELSON LIMA SERRA

**ANÁLISE CROMATOGRÁFICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE DE CULTIVARES DE SOJA TRANSGÊNICA E
CONVENCIONAL.**

IMPERATRIZ

2013

RAELSON LIMA SERRA

**ANÁLISE CROMATOGRÁFICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE DE CULTIVARES DE SOJA TRANSGÊNICA E
CONVENCIONAL.**

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal do Maranhão – UFMA, como requisito para obtenção do grau de Bacharel em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Dr. Alan Bezerra Ribeiro

IMPERATRIZ

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

Serra, Raelson Lima.

Análise cromatográfica e avaliação da atividade antioxidante de cultivares de soja transgênica e convencional / Raelson Lima Serra. - Imperatriz, 2013.

38f.

Orientador: Prof. Dr. Alan Bezerra Ribeiro.

Monografia (Graduação em Engenharia de Alimentos) – Curso de Bacharelado em Engenharia de Alimentos, Centro de Ciências Sociais, Saúde e Tecnologia de Imperatriz Maranhão (CCSST) / Universidade Federal do Maranhão (UFMA), 2013.

1. Soja transgênica 2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). 3. Metabólitos secundários 4 Difenil Picril Hidrazila (DPPH) I. Título.

CDU 633.34:543.54
S487a

RAELSON LIMA SERRA

**ANÁLISE CROMATOGRÁFICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE DE CULTIVARES DE SOJA TRANSGÊNICA E
CONVENCIONAL.**

Monografia apresentada à Coordenação Curso de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal do Maranhão – UFMA, como requisito para obtenção do grau de Bacharel em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Dr. Alan Bezerra Ribeiro

Aprovada em 04 / 03 / 2013

BANCA EXAMINADORA

Alan Bezerra Ribeiro

Prof. Dr. Alan Bezerra Ribeiro (Orientador)

Ana Lúcia Fernandes Pereira

Profª. Dra. Ana Lucia Fernandes Pereira (Membro)

José Ribamar Macedo Costa

Prof. MSc. José Ribamar Macedo Costa (Membro)

A Deus, à minha mãe Maria Raimunda L. Serra, meus irmãos e meus amigos. Obrigado pelo apoio e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a Deus, por ter me proporcionado essa vitória. Ao meu pai (*in memoriam*) Raimundo Serra, uma pena ele não poder participar deste conquista comigo, mas o seu exemplo foi uma extraordinária experiência de vida e decisivo na formação do meu caráter, humildade, liderança e responsabilidade foram algumas das muitas lições aprendidas e jamais serão esquecidas.

A minha mãe Maria Raimunda pelo imenso cuidado e dedicação mesmo estando tão distante, obrigado pelos ensinamentos, pela educação, por acreditar e confiar em mim, por me ajudar na formação do caráter que tenho, tudo que aprendi será usufruído em todos os aspectos de minha vida. Aos meus irmãos Nelio, Edna, Robenilson (pretinho), Conceição (preta), por sua dedicação, companheirismo, cuidado e conselhos maravilhosos que me fizeram crescer, em especial ao meu *brother* Ronilson (rona) e à Raimunda esses foram *show*, palavras não são capazes de descrever meus sentimentos, foram “pai” e “mãe”. Obrigado! Essa família maravilhosa me fez entender o que significa ser uma família de verdade.

À família Pires Costa nas pessoas de José Ribamar, Arlete (carinhosamente *mundica*), Ingryd Pires, Matheus, minha imensa gratidão por tudo que fizeram por mim. Sem vocês este sonho não seria uma realidade. Esta família se tornou minha família. Amizade e gratidão eternas. Espero poder retribuir o que fizeram por mim.

Ao meu professor e orientador Prof. Alan Ribeiro com quem aprendi muito em sala de aula, e também no laboratório não apenas academia, mas lições para vida. Obrigado por tudo, pela confiança a mim depositada para este projeto que resultou neste trabalho de conclusão de curso.

Ao Prof. Jose Ribamar. Sou imensamente grato pelo que fez por mim, pelo apoio, esse professor é exemplo de profissionalismo, aprendi muito com seu exemplo. Respeito, responsabilidade, persistência, determinação e cuidado, são algumas das varias virtudes que aprendi, foi uma honra tê-lo como professor.

Às minhas irmãs *in vitro*, mas de coração Lilia e Kamila. Obrigado pelas companhias no laboratório, por se disporem a me ensinar técnicas que eu não sabia e com muita paciência,

por me ajudarem neste trabalho, a gente se divertiu muito e pudemos compartilhar muito conhecimento, vocês são muito especiais.

Ao pessoal do Centro Acadêmico: Thyara, Maressa, Samya, Diego, foram lutas, conquistas, jamais vou esquecer esses momentos maravilhosos em que rimos e choramos, e juntos sempre lutamos por um bem maior, o nosso curso Engenharia de Alimentos.

Ao grande mestre Romildo Sampaio com seu exemplo de um verdadeiro engenheiro professor, um espelho para mim. À nossa, como já citado em outro trabalho, “mãe de profissão” Maria do Livramento (Lili), minha imensa gratidão pelos conselhos, e exemplo de profissional que devemos ser. À professora Adriana Crispim que chegou com seu jeitinho e mostrou ser uma GRANDE profissional. Obrigado por tudo que você fez por mim, meu estagio, por confiar esse “cartucho”, com Dr. Gustavo da EMBRAPA a quem também agradeço por confiar a mim o trabalho no Lab. Bioprocessos. À Dra. Kally por me acolher em seu AP e me apoiar no trabalho na EMBRAPA Fortaleza.

Aos meus superamigos Edilberto Cordeiro e Paulo Humberto (Bebeto). Foram momentos fantásticos esses que passamos, noites em claro estudando FT e OPs, como aprendi com vocês, sou imensamente grato. Esses caros amigos se tornaram mais que amigos são “irmãos”, foram tantas situações: futebol com os amigos, os melhores filmes, etc. pudemos até voltar no tempo de criança em muitas ocasiões.

A todos que de uma forma direta ou indireta puderam contribuir para minha formação acadêmica e de caráter.

“Quem só a engenharia sabe, nada sabe”

(Autor Desconhecido)

RESUMO

A cultura da soja tem sido alvo de muitos debates em vários países, principalmente quando se refere ao processo de transgenia, onde o DNA é modificado por ação do homem em busca de melhoria ou outro fim. Pode-se afirmar que o crescimento da cultura da soja no Brasil nas últimas décadas ganhou posição de grande importância, o que denota no cenário nacional de um novo ciclo de uma cultura agrícola com grandes impactos para o desenvolvimento da economia nacional assim como foram os ciclos da cana de açúcar e do café nos séculos passado. Diante dessa situação de controvérsia entre o bem e o mal da soja transgênica este trabalho teve por objetivo, avaliar e comparar o efeito da transgenia sobre os metabolitos secundários da soja convencional e da soja transgênica, por meio da cromatografia em camada comparativa e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os extratos foram submetidos a análises da presença de substâncias antioxidantes por meio do teste com β -caroteno e por meio do reagente difenil picril hidrazila (DPPH). As amostras de soja convencional e transgênica foram analisadas por meio do método de DPPH, onde mediu-se a atividade antioxidante, apresentando reduções de 8,5% na soja transgênica e 7,5% na soja convencional em relação ao padrão rotina. No método CLAE também houve alterações observadas nos extratos, a soja transgênica apresentou maior quantidade de picos que a soja convencional evidenciando substâncias em diferentes ou em quantidades diferentes.

Palavras-Chave: Soja. Transgenia. Metabolitos Secundários.

ABSTRACT

Soy has been the subject of much contest in many countries, especially when it comes to the process of gene in which DNA was modified by human action seeking improvement or other purposes. It can be said that the growth of soybean in Brazil in recent decades gained a position of great importance, which shows on the national stage for a new cycle of a crop with large impacts on the national economy as well as the cycles were sugar cane and coffee in centuries past. Given this situation of controversy between good and evil of transgenic soybeans this study aimed to evaluate and compare the effect of transgenesis on the secondary metabolites of conventional soybean and transgenic soybean, through comparative layer chromatography and high performance liquid chromatography (HPLC). The extracts were subjected to analysis the presence of antioxidant substances through the test β -carotene and through the reagent diphenyl picryl hydrazyl (DPPH). Samples of conventional and transgenic soybean were analyzed by the method of DPPH where was measured antioxidant activity, with reductions of 8.5% and 7.5% soybean transgenic soybean conventional compared to standard rutin. In the HPLC method was also observed changes in the extracts, transgenic soybeans had higher amounts of peaks showing that soy conventional substances in different or in different amounts.

Keywords: Soy. Transgenic. Secondary Metabolites.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Porcentagem de redução de DPPH	31
Gráfico 2 - Cromatograma de extrato da soja convencional	32
Gráfico 3 - Cromatograma do extrato da soja transgênica	32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema da reação de redução do radical DPPH.....	22
Figura 2 - Foto da reação em tubos de ensaios com DPPH.....	27
Figura 3 - Placas cromatográficas dos extratos hexânico.....	29
Figura 4 - Placas cromatográficas dos extratos acetânico.....	29
Figura 5 - Placas cromatográficas dos extratos etanólicos.....	30

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	17
2.1. Objetivo geral	17
2.2. Objetivos específicos	17
3. REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1. Soja	18
3.2. Organismos geneticamente modificados	19
3.3. Metabólitos secundários	21
4. METODOLOGIA	23
4.1. Materiais utilizados	23
4.1.1 <i>Matéria-prima</i>	23
4.1.2 <i>DPPH</i>	23
4.1.3 <i>CLAE</i>	23
4.1.4 <i>Equipamentos</i>	23
4.2. Análise dos metabólitos secundários	24
4.3. Preparo do extrato	24
4.4. Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC)	25
4.5. Teste com β-caroteno	26
4.6. Teste de difenil picril hidrazila (DPPH)	26
4.7. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	29
5.1. Análise dos metabólitos secundários	29
5.2. Teste com β-caroteno	29
5.3. Teste com o DPPH	31
5.4. Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	32
6. CONCLUSÕES	34
7. REFERÊNCIAS	35
APÊNDICE	38

1. INTRODUÇÃO

A soja possui lugar de destaque no cenário mundial e também nacional. A demanda por soja e subprodutos está em franco crescimento, segundo (CHIARELLO 2002). Entre os fatores que colocam este grão em destaque estão não somente o aumento no consumo humano, mas também a utilização para a produção de alimentos usados para nutrição animal (SIRQUEIRA, 2004).

Com um tempo aproximado de cinco mil anos de cultivo pelo homem, a soja é considerada uma das culturas mais antigas existentes, ela tem sua origem na Ásia, desenvolveu-se com maior importância na agricultura chinesa onde era considerado um grão sagrado. No ocidente, sua cultura só passou a ser mais conhecida quando os Estados Unidos começou a exploração comercial da soja forrageira no início do século 20, atingindo um grau elevado de importância a partir da década de 1940, quando a área cultivada para forragem diminuiu até que atingiu o final na metade da década de 1960, período em que a área destinada à produção de grãos crescia nos Estados Unidos e no restante do mundo (SIRQUEIRA, 2004).

Embora a cultura de soja seja disseminada em países por todos os continentes, a maior parte da produção concentra-se na América do Norte e do Sul onde a produtividade tem alcançado os melhores desempenhos mundiais. Na América do Sul, especificamente no Brasil, a soja tem alcançado um espaço muito amplo quanto à produção e o consumo (CHIARELLO 2002).

O Brasil apresenta-se entre os maiores produtores de soja do mundo, sendo a leguminosa cultivada em várias regiões do País (SILVA et al, 2006). Segundo a EMBRAPA-soja, a produção média da soja brasileira foi de 75 milhões de toneladas na safra 2010/2011, alcançando cerca de 24,2 milhões de hectares, com uma produtividade de aproximadamente 3.106 kg/ha, sendo estado de Mato Grosso é o maior produtor brasileiro de soja (EMBRAPA-soja, 2013).

Desde sua primeira menção nas estatísticas brasileiras em 1941, a soja tem se destacado por fornecer diferentes produtos de grande importância no mercado internacional.

Entre os produtos que são derivados da soja estão: o óleo, o farelo, a lecitina, além de outros metabólitos secundários como as saponinas e as isoflavonas (ROESSING, 1995).

O crescimento da cultura da soja no Brasil nas últimas décadas obteve posição de grande importância para o país, o que denota no cenário um novo ciclo de uma cultura agrícola com importantes impactos para o desenvolvimento da economia nacional, assim como o foram os ciclos da cana de açúcar e do café nos séculos XVI e XIX. No Brasil, a soja é quase que exclusivamente consumida sob a forma de óleo (cerca de 90% do consumo nacional) e de farelo (SIQUEIRA, 2004).

Para muitos pesquisadores, os benefícios à saúde humana provindos da leguminosa soja são notáveis, podendo ser classificada no grupo dos alimentos funcionais. Isto se deve ao fato de estudos demonstrarem que o consumo de soja pode reduzir o risco de várias doenças como o câncer de mama e próstata, osteoporose, doenças cardiovasculares e os sintomas da menopausa, doenças que atingem milhões de pessoas no mundo (MESSINA, 1999).

Porém, um dos pontos de maior controvérsia existentes é em relação à soja transgênica ou processo de transgenia, onde os organismos sofrem alterações genéticas a fim obter característica específica. Quando se refere a transgênicos, há muitas discussões no país referentes à soja como alimento. Alguns relatam sobre os riscos que tais alimentos podem oferecer, por outro lado há pesquisadores que defendem e apresentam estas culturas como sendo opções para soluções de problemas, como exemplo, a fome. Assim, sempre que se trata de soja transgênica no cenário nacional os pontos de discussão são muito amplos, principalmente porque neste caso, o problema poderia estar nos metabólitos secundários da soja, uma vez que essa é uma das características dos seres vivos, a presença de atividade metabólica (MONQUERO, 2005).

O metabolismo nada mais é do que o conjunto de reações químicas que ocorrem no interior das células. No caso das células vegetais, o metabolismo costuma ser dividido em primário e secundário. Entende-se por metabolismo primário o conjunto de processos metabólicos que desempenham uma função essencial no vegetal, tais como a fotossíntese, a respiração e o transporte de solutos. Em contrapartida, o metabolismo secundário, origina compostos que não possuem uma distribuição universal, segundo Taiz et al 2006. Esses compostos também denominados de produtos secundários não estão relacionados ao desenvolvimento da planta. Esta é uma característica que foi desenvolvida ao longo de sua

cadeia evolutiva e na maioria das vezes é usada em sua defesa (SOUZA FILHO; ALVES, 2002).

Para análise desses metabolismos secundários se faz necessário técnica apropriada, afim de que cada composto do metabolismo seja analisado sozinho garantindo um estudo mais profundo e direcionado, com resultados precisos e fidedignos. Entre as técnicas usadas estão a cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) e de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), que são técnicas muito precisas de separação de substâncias (COLLINS et al., 2006).

A cromatografia, em sua forma mais simples, é meramente uma técnica de separação, usada para separar fisicamente uma mistura de dois ou mais compostos químicos. Definindo melhor, a cromatografia é então um processo de separação baseado nas diferentes afinidades de duas ou mais substâncias através de migração diferencial sobre uma camada adsorvente plana. (COLLINS et al., 2006).

Para avaliação da atividade antioxidante das amostras de soja transgênica e soja convencional, é empregado o método com radical livre DPPH. Este método consiste em avaliar a capacidade que a substância tem de sequestrar radicais livres, baseando-se na mudança de cor de uma solução que contém o DPPH com uma coloração violeta, que adicionado de substâncias, pode ceder um radical hidrogênio perdendo sua cor violeta para uma coloração amarelada. Para verificação utiliza-se um comprimento de onda de 517nm em espectrofotômetro (BRAND WILLIANS et al. 1995).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- Estudar o efeito da transgenia sobre os metabólitos secundários da soja convencional e transgênica.

2.2. Objetivos específicos

- Realizar processos para extração dos metabólitos secundários;
- Avaliar por meio de Cromatografia em Camada Comparativa as alterações dos metabólitos secundários;
- Avaliar a atividade antioxidante das sojas transgênica e convencional por meio do teste com β -caroteno e DPPH;
- Determinar alterações do metabolito secundário das sojas transgênicas e convencional por meio da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Soja

A soja (*Glycine max*) pertence à família *Fabaceae*, destacando-se como uma leguminosa muito consumida segundo (MARIANE 2011). Dentre a cultura de grãos, a soja se caracteriza como a mais importante do País. O complexo soja, que compreende grãos, farelo e óleo, tem captado divisas no mercado internacional. A demanda mundial por soja e subprodutos está em franco crescimento. Isto se deve não somente ao aumento do consumo na alimentação humana, mas também ao aumento do uso da soja para preparar alimentos usados em nutrição animal (CHIARELLO, 2002).

A semente da soja pode ser considerada como o insumo agrícola de maior importância, representando a base do processo produtivo, de onde se deriva os produtos da soja. Por meio desta semente é possível conduzir ao campo as características genéticas determinantes do desempenho da cultivar de acordo com a espécie desejada (TERASAWA et al, 2009).

Dentre as várias leguminosas tropicais e subtropicais cultivadas no Brasil, a soja destaca-se como uma das principais, econômica e nutricionalmente, em função do alto teor protéico das sementes, que para se desenvolverem dependem de um suprimento de minerais e hormônios vegetais fornecidos pela planta (SCHRADER et al, 1981).

Até o fim da década de 1970, a produção de soja no Brasil praticamente restringiu-se às regiões Sul e Sudeste (São Paulo e Minas Gerais), tradicionais produtoras de grãos. Uma conjunção de fatores, domésticos e internacionais, contribuiu para que a fronteira agrícola avançasse, sobremaneira, rumo às regiões centro-oeste e nordeste, resultando na incorporação de imensas áreas de cerrado, o que culminou num extraordinário crescimento da produção brasileira de grãos, especialmente da soja (QUEIROZ, 2009).

A relação entre o consumo de soja e a saúde humana tem sido amplamente investigada pelas características nutricionais desse alimento, quer seja o elevado teor de proteína de qualidade nutricional adequada, o conteúdo significativo de minerais e fibras, ou

ainda, a quantidade reduzida de gordura saturada e a ausência de colesterol (NASCIMENTO et al, 2004).

O momento ideal para a colheita de sementes seria na maturidade fisiológica, ou seja, imediatamente após se desligarem fisiologicamente da planta-mãe. A partir desse estágio, não ocorrem acréscimos significativos na massa seca das sementes. No entanto, o teor de água da semente nesse momento é elevado (55% para soja), o que inviabiliza a colheita mecanizada, pois são verificadas dificuldades para o recolhimento e trilha, bem como a ocorrência de níveis severos de danos mecânicos (TERASAWA et al, 2009).

3.2. Organismos geneticamente modificados

A possibilidade de introduzir plantas transgênicas tem sido bastante discutida no país nos três últimos anos. Muitas vezes mais apaixonados do que racionais, os debates têm-se concentrado nos possíveis impactos ambientais que poderiam decorrer dessa decisão, além de aspectos relacionados à segurança alimentar e à rotulagem. Muito pouco ou nada se discute sobre possíveis efeitos da introdução de cultivares transgênicos na agricultura brasileira. De fato, o pano de fundo deste debate é: O Brasil vai adotar o plantio em larga escala de plantas transgênicas? Em caso positivo, o país vai plantar produtos resultantes de pacotes tecnológicos das grandes empresas ou vai tentar desenvolver também suas próprias variedades transgênicas? (FERREIRA, 2000).

Organismos geneticamente modificados (OGMs) ou transgênicos podem ser plantas, animais ou microrganismos que tiveram no seu material genético a introdução de DNA proveniente de outro organismo. Em alguns casos, esse organismo pode ser outro indivíduo da mesma espécie, ou o mais comum, de outra espécie com o qual não há cruzamento natural (MONQUERO, 2005).

A liberação dos transgênicos no Brasil, particularmente aqueles com finalidade comercial, vem provocando intensa polêmica quanto a possíveis riscos à saúde e ao meio ambiente. Tal polêmica, que envolve diversos atores, como cientistas, agricultores, ambientalistas e representantes do governo, refere-se ao nível de incerteza atribuído a esses alimentos diante da chamada 'segurança alimentar' (CAMARA et al, 2009).

Durante muitos anos, a manipulação genética das plantas pelo homem através de cruzamentos objetivando obter genótipos superiores tem estado em evidencia. No entanto, esse método pode gerar problemas tais como, a redução do grau das características genéticas de uma espécie ou *pool* gênico, incompatibilidade sexual, além do tempo necessário para que se transfiram caracteres desejáveis para cultivares de interesse (BRASILEIRO et al. 1997).

Em pesquisas desenvolvidas no Reino Unido e Estados Unidos, sobre os riscos dos alimentos transgênicos para a saúde da população e para o meio ambiente, estão a possível ocorrência no aumento das alergias com o consumo dos OGMs, pois novos compostos são formados no novo organismo, como proteínas e aminoácidos que ingeridos poderão desencadear processos alérgicos, aumento de resistência aos antibióticos, pois são inseridos nos alimentos transgênicos genes que podem ser bactérias usadas na produção de antibióticos (CAMARA et al, 2009).

Além disso o consumo pela população desses alimentos, poderá ocorrer resistência a esses medicamentos, reduzindo ou anulando a eficácia dos mesmos. Pode ainda, ser desencadeado um aumento das substâncias tóxicas quando o gene de uma planta ou de um microrganismo for utilizado em um alimento, é possível que o nível dessas toxinas aumente inadvertidamente, causando mal às pessoas, aos insetos benéficos e aos animais, citando que já foi constatado com o milho transgênico “Bt”, levando a Áustria a proibir o seu plantio (CAVALLI, 2001).

Estudos também têm demonstrado que a inserção de genes resistentes aos agrotóxicos em alguns alimentos transgênicos confere às pragas e às ervas daninhas maior resistência, tornando-se super-pragas, desequilibrando os ecossistemas, implicando uso de uma maior quantidade de agrotóxicos, que resultará no aumento de resíduos nos alimentos, rios e solos (CAVALLI, 2001).

A empresa norte-americana Monsanto contra-argumentou afirmando que suas pesquisas comprovaram que a soja transgênica não apresentava riscos à saúde humana e nem prejuízos à biodiversidade. A soja produzida através da biotecnologia torna viável um novo sistema de controle de plantas daninhas, respeitando às normas de segregação no plantio e a rotulagem dos produtos industrializados, com previsão da economia no custo por hectare da nova espécie. O novo foco estratégico é contribuir para que a oferta de alimento seja

abundante e que os OGM não interfiram nos sistemas nos quais a vida se baseia (QUEIROZ, 1998).

De forma clara pode-se afirmar que há debates intensos sobre a utilização comercial dos OGMs. A ciência jamais foi questionada de forma tão impetuosa ao desvelar os resultados de seus estudos e investigações até o surgimento dos produtos transgênicos (HOFFMAN, 1999).

3.3. Metabólitos secundários

O metabolismo secundário nem sempre é necessário para que uma planta complete seu ciclo de vida, porém ele desempenha um papel importante na mesma de forma garantir um processo interativo entre as plantas e o meio ambiente. Um dos principais componentes do meio externo cuja interação é mediada por compostos do metabolismo secundário são os fatores bióticos (GOBBO-NETO, 2007).

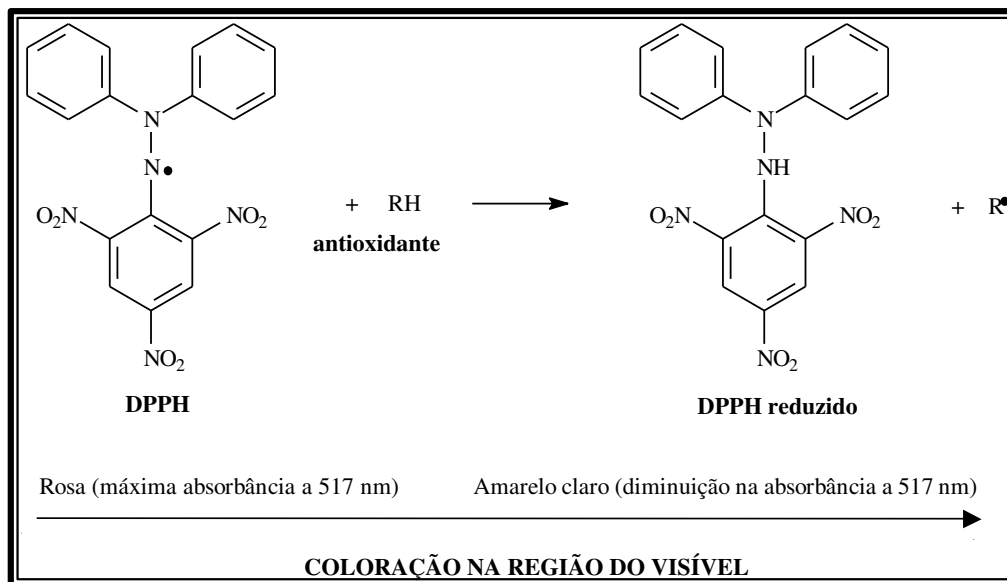
A necessidade de estudar os metabólitos secundários da soja ocorre devido a sua importância comercial e nutricional, pois a transgenia pode influenciar, alterando esses metabólitos (KIM et al. 2011; MARTINEZ et al. 2011).

Para análise desses metabolismos secundários se faz necessário técnica apropriada, afim de que cada composto do metabolismo seja analisado sozinho garantindo um estudo mais profundo e direcionado com resultados precisos e fidedignos. Entre as técnicas usadas está a CCDC e a CLAE que é uma técnica muito precisa quanto aos resultados de separação de substâncias (COLLINS et al., 2006).

A cromatografia é uma das técnicas utilizadas para análise de alterações nos metabólitos secundários de vegetais. Os dados coletados são mais completos quando realizadas em conjunto a outras análises, como por exemplo, de atividade antioxidante. Conforme Youngson (1995), alterações no metabolismo podem ocorrer quando, na sua forma livre, os radicais do oxigênio atacam as moléculas em um organismo provocando danos a ela, para isso, ele utiliza os elétrons livres ou não pareados, ligando a diferentes compostos em pequenos intervalos de tempo gerando uma reação em cadeia que pode deteriorar tecidos.

Para Dorman et al. 2003 estas reações podem ser prejudiciais a saúde humana. Desta forma, justifica-se a busca por substâncias que tenham a capacidade de sequestrar esses radicais livres.

O método de DPPH consiste em avaliar a essa atividade antioxidante, podendo ser definida como a capacidade que a substância tem de sequestrar radicais livres para isso utiliza-se neste trabalho o DPPH, baseado na mudança de cor de uma solução que contém o radical livre DPPH com uma coloração violeta que adicionado de substâncias que podem ceder um átomo de hidrogênio perdendo sua cor violeta para uma coloração amarelada. No figura 1, pode ser visualizado como ocorre essa reação (BRAND WILLIANS et al. 1995).



Fonte: apud CAVIN et al. e YAMAGUCHI et. al. 1998

Figura 1- Esquema da reação de redução do radical difenil-picril-hidrazila (DPPH).

4. METODOLOGIA

4.1. Materiais utilizados

4.1.1. Matéria-prima

Para a realização dos experimentos foi utilizada a soja cedida pela EMBRAPA-MA da espécie BRS candeia convencional lote 036/98 não climatizada e BRS 271 Transgênica não climatizada lote 091/98.

4.1.2. DPPH

A capacidade antioxidante destes extratos foi analisada por meio do teste descrito por Brand-William, Cuvier e Berset (1995). A técnica utiliza do reagente analítico difenil picril hidrazila (DPPH). Como padrão foi utilizado reagente rutina, após a reação de 30 minutos a leitura das amostras foi feita em um comprimento de onda de 517nm.

4.1.3. CLAE

Os metabolitos secundários foram analisados por meio desta técnica em um HPLC (High Performance Liquid Chromatography) com 2 comprimentos de onda UV e duas bombas.

4.1.4. Equipamentos:

Câmera UV (Modelo BT107 marca Biothec)

Capela com fluxo de ar

Espectrofotômetro de UV (marca Analyser, modelo LGS)

Evaporador Rotativo modelo BT 351 BIOTHEC

HPLC (modelo *Varian* /analítico / 2 bomba / 2 comprimento de onda (UV))

Liquidificador de alta rotação (Modelo: BM43, copo 4L)

4.2. Análise dos metabólitos secundários.

As amostras foram coletadas junto à EMBRAPA-MA com orientação do Professor Dr. Paulo Catunda do CESI-UEMA e armazenadas em recipientes plásticos à temperatura ambiente por um período não superior a duas semanas. A extração dos metabólitos secundários ocorreu por percolação com solventes em ordem crescente de polaridade usando-se Hexano, Acetona e Etanol com intuito de extrair os metabólitos de diferentes polaridades.

Em seguida os extratos hexânico, acetânico e etanólico foram submetidos à análise qualitativa dos metabólitos por meio da técnica de Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC) com intuito de verificar inicialmente possíveis alterações desses compostos ocasionados por meio da transgenia, e ainda obter a melhor separação dos compostos para análise posterior da atividade antioxidante por meio do teste com o β -caroteno.

Após essa primeira análise por CCDC, as placas que apresentaram melhor separação de compostos foram selecionadas e em seguida foram feitas alterações na fase móvel para melhorar a seletividade e conseqüentemente uma separação mais definida dos metabólitos.

A análise da atividade antioxidante foi realizada por meio de dois testes: um qualitativo com o reagente β -caroteno e outro quantitativo por meio do teste com o reagente difenil picril hidrazila (DPPH).

Por último, os extratos das sojas convencional e transgênica foram analisados por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), que permite uma análise mais precisa destes metabólitos, visto que o equipamento utilizado para esta análise permite, por meio de bombas auto injetoras e detector automatizados, uma análise mais detalhada.

4.3. Preparo do extrato

A soja convencional e a soja transgênica foram trituradas em liquidificador de alta rotação, por aproximadamente 3 minutos, obtendo-se 553,51g e 560,67g, respectivamente de soja triturada.

Em seguida, as amostras trituradas foram submetidas à lixiviação com solvente apolar hexano. As amostras foram colocadas em frascos de vidro adicionado aproximadamente 300mL de hexano sendo agitado em três etapas por um período de 24 horas. Logo após as amostras foram filtradas em papel de filtro. Este procedimento foi realizado por três dias consecutivos sendo sempre adicionado a mesma quantidade de solvente (300mL) a cada 24 horas para uma melhor extração dos metabólitos. Os extratos filtrados foram misturados de polaridade e concentrados em evaporador rotativo, obtendo-se assim, os extratos hexânicos de soja convencional e soja transgênica, e reservados para análises posteriores.

O mesmo procedimento foi feito para o segundo solvente acetona (média polaridade) e para o terceiro solvente etanol (polar), obtendo-se os extratos acetônicos e etanólicos de soja convencional e transgênica. Logo após a obtenção dos extratos, eles foram armazenados, sob-refrigeração, em recipiente de vidro para etapas posteriores de análise.

À medida que o tempo de lixiviação dos solventes finalizava, eles eram recuperados em um evaporador rotativo, para que o metabolito fosse concentrado a fim de armazenamento, para análise posterior. Isso ocorreu durante o uso dos três solventes usados, hexano, acetona e etanol, obtendo em cada um, uma quantidade de extrato de soja, de cada amostra analisada, transgênica e convencional.

4.4. Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC)

As análises por meio de CCDC foram feitas em fase normal, utilizando-se como fase estacionária sílica e fase móvel diferentes proporções de solventes, iniciando-se com solventes apolares e aumentando-se a polaridade gradativamente com uso de solventes de média e alta polaridade.

Desta forma, iniciaram-se as análises seguindo uma sequencia, começando pelas proporções **95:5** até **50:50** com solventes de diferentes polaridades, sendo eles o Hexano, Éter e Etanol, nas seguintes proporções: **95:5; 90:10; 80:20; 70:30; 50:50**; (para Hexano / Éter), e **100%** Éter. Depois de feita esta etapas foram refeitas as proporções **70:30; 50:50**(Hexano / Éter) e **100%** Éter. Uma nova fase móvel foi testada. **99:1; 95:5; 90:10; 50:50**. (para Éter / Etanol).

Depois de definidas as proporções, As placas cromatográficas analisadas nelas foram submetidas à luz ultravioleta (UV) em dois comprimentos de onda, o primeiro de 254nm e em seguida de 365nm, para visualização de possíveis substâncias que se apresentem em comprimentos de ondas diferentes e em Iodo sublimado, para revelação das substâncias.

4.5. Teste com β -caroteno

O teste de atividade antioxidante tem por base revelar os maiores responsáveis pelas reações de oxidação nos seres vivos, tais reações podem ser precursores de alguns problemas de saúde tais como degradação celular e crescimento desordenado das células.

Este teste foi realizado para verificar qualitativamente a atividade antioxidante da soja convencional e transgênica, e com isso, avaliar se a transgenia influenciou sobre o aumento e diminuição desta atividade dos metabólitos.

As placas cromatográficas selecionadas anteriormente com a melhor separação das substâncias foram borrifadas com solução β -caroteno 0,02% (em diclorometano) ficando as placas amareladas e submetidas à radiação ultravioleta solar por um período de aproximadamente duas horas. Após esse período, toda a placa sofre uma reação oxidação retornando à sua coloração original branca, exceto aquelas manchas referentes às substâncias com atividade que permanecem amareladas, revelando desta forma a atividade antioxidante do extrato.

4.6. Teste de difenil picril hidrazila (DPPH)

Para este teste foram utilizados os extratos etanólicos das sojas transgênica e convencional para análise quantitativa da atividade antioxidante.

Foi preparada uma solução de 0,004% de DPPH, em seguida foi preparado uma solução estoque padrão (quercetina) de 0,25 mg/mL, as diluições do padrão foram feitas para as seguintes concentrações: 2 / 1 / 0,5 / 0,25 mg/mL.

Esse mesmo procedimento foi seguido para as amostras de soja transgênica e soja convencional.

Foram colocadas para reagir em tubos de ensaio de 2mL de DPPH mais 0,4mL da amostra, as reações sempre foram feitas em triplicatas e em ambiente escuro, na figura 2 é possível observar as amostras após 30 minutos de reação no escuro.



Figura 2 – foto da reação em tubo de ensaios com DPPH.

Após 30 minutos de reação, foi feita leitura da amostra em espectrofotômetro, a um comprimento de onda de 517nm. Os valores obtidos das médias da triplicata foram colocados na fórmula.

$$\% \text{ Inibiçao} = \left(\frac{ADPPH - AExtr}{ADPPH} \right) * 100$$

E no aplicativo ExcelTM um gráfico foi gerado da percentagem de redução de DPPH e guardado para posterior análise.

4.7. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Para este teste foi utilizado o equipamento HPLC da marca Varian. As substâncias foram separadas em uma coluna analítica C₈. Foi utilizada uma fase móvel de metanol/água (70:30) com fluxo de 1mL/min com um tempo de corrida de 30 min. Os extratos de soja transgênica e de soja convencional foram diluídos em metanol e filtrados em filtros de pré-tratamento milipore de polifluoreto de vinilideno com 0,22 micrometro imediatamente antes da injeção no HPLC.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Análise dos metabólitos secundários

As amostras que apresentaram melhor separação das substâncias foram as seguintes: para os extratos hexânicos a melhor fase móvel foi hexano:éter (80:20); para os extratos acetônicos, hexano:éter (50:50) e para os extratos etanólicos, hexano:éter (30:70). Essas condições cromatográficas foram utilizadas para as análises de atividade antioxidante por meio do teste com β -caroteno.

5.2. Teste com β -caroteno

Após as placas preparadas e colocadas em exposição em luz solar e sofrerem oxidação, pode ser observado que as substâncias que apresentam atividade antioxidante permaneceram amareladas na placa enquanto toda a placa volta a sua cor normal branca, evidenciando-se assim a presença de atividade antioxidante tanto na soja convencional quanto na soja transgênica como mostrado nas Figuras 3, 4 e 5.

Na avaliação da atividade pelo teste com o β -caroteno foi possível observar a presença de atividade antioxidante, porém não foi possível observar uma variação da atividade entre as amostras de soja convencional e soja transgênica.

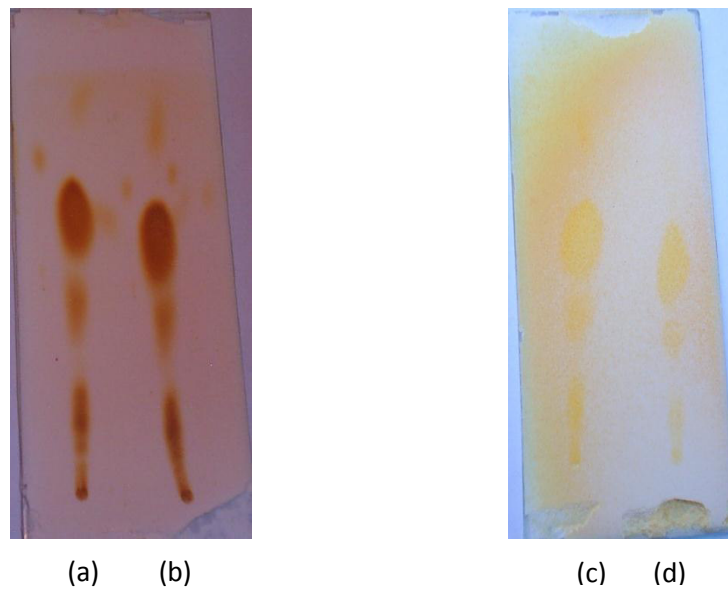


Figura 3 – Placas cromatográficas dos extratos hexânico. Amostras de soja convencional (a) e (c); amostras de soja transgênica (b) e (d); placa revelada com vapores de iodo amostras (a) e (b) e reveladas com solução de β -caroteno, amostras (c) e (d).

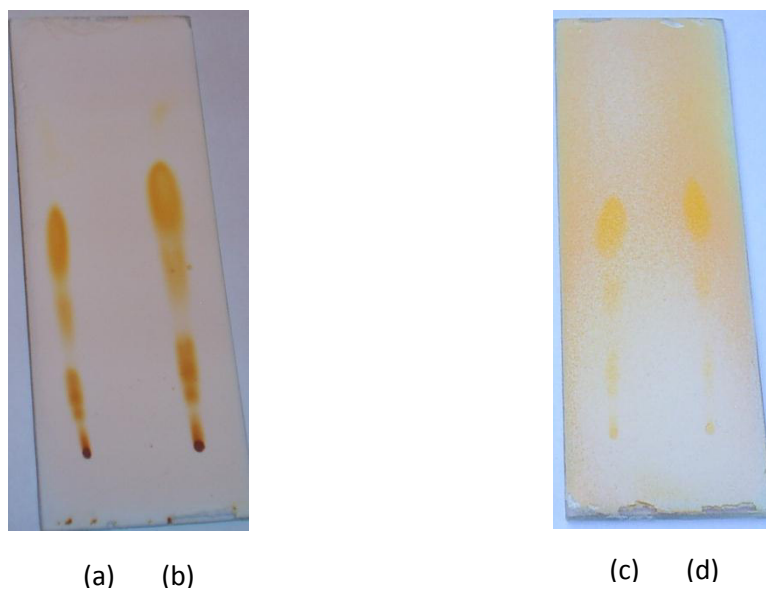


Figura 4 – Placas cromatográficas dos extratos acetânico. Amostras de soja convencional (a) e (c); amostras de soja transgênica (b) e (d); placa revelada com vapores de iodo amostras (a) e (b) e reveladas com solução de β -caroteno, amostras (c) e (d).

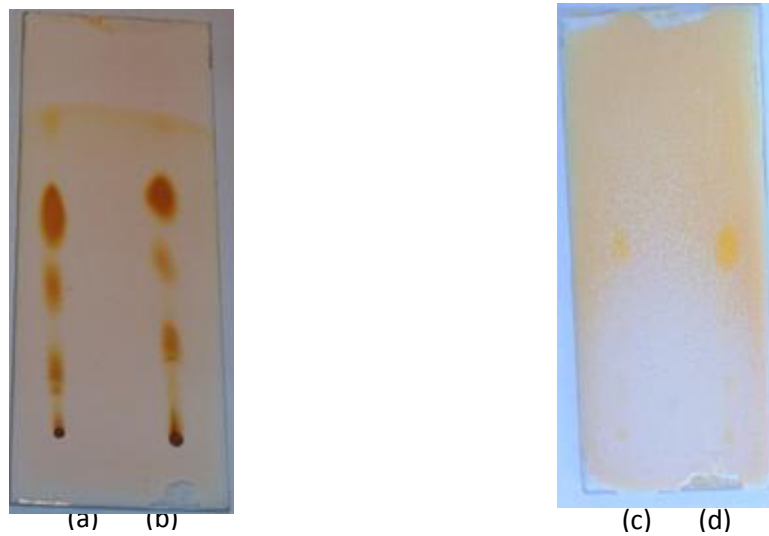


Figura 5 – Placas cromatográficas dos extratos etanólico. Amostras de soja convencional (a) e (c); amostras de soja transgênica (b) e (d); placa revelada com vapores de iodo amostras (a) e (b) e reveladas com solução de β -caroteno, amostras (c) e (d).

5.3. Teste com o DPPH

Através do teste com DPPH foi possível avaliar quantitativamente a atividade antioxidante por meio da capacidade de sequestrar radicais livres das amostras de soja transgênica e convencional. Para este teste foram utilizados os extratos etanólicos da soja convencional e transgênica, como mostrado no gráfico 1.

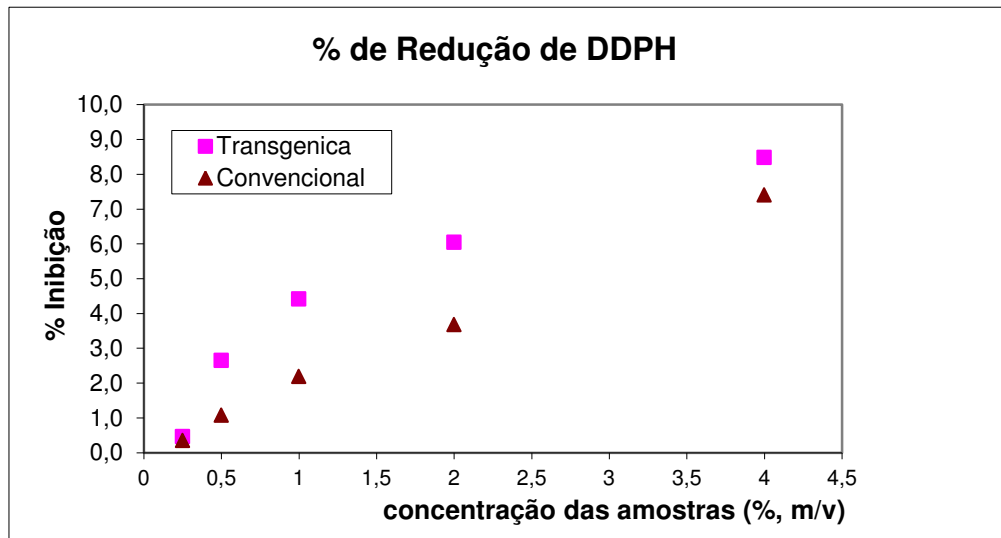


Gráfico 1 - porcentagem de redução de DPPH em presença de extrato etanólico da soja convencional e transgênica.

Por meio do gráfico foi possível observar uma diferença na atividade antioxidante entre as sojas transgênica e convencional. O que pode significar uma alteração nos metabolitos secundários entre as duas espécies de soja analisadas.

A soja transgênica tem uma redução do DPPH de aproximadamente 8,5%, enquanto a soja convencional apresenta uma redução de aproximadamente 7,5% em relação ao padrão rotina, que pode ser observado no apêndice A. Sendo assim, é possível observar que há possíveis diferenças entre as duas amostras analisadas. Essa diferença pode ser um aumento dos compostos com atividade antioxidante da soja convencional, ou uma alteração na composição e/ou quantidade de outras substâncias presentes na soja convencional e que apresentem atividade antioxidante.

5.4. Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A análise dos extratos foi feita apenas da amostra hexânica da soja convencional e transgênica, os outros extratos serão feitos posteriormente, porém por estas análises feitas neste trabalho por meio de cromatografia líquida de alta eficiência com este extrato, foi possível observar significativas diferenças então demonstradas nos cromatogramas abaixo (gráficos 2 e 3).

Por meio dos cromatogramas é possível observar picos no intervalo de 2 a 10 minutos na soja convencional diferentes da soja transgênica, além de um pico bem distinto presente na soja convencional e ausente na soja transgênica. Desta forma, é possível observar diferenças entre os metabólitos secundários presentes nas duas amostras, a transgenia pode ser estar ocasionando essa diferença os compostos presentes nas amostras.

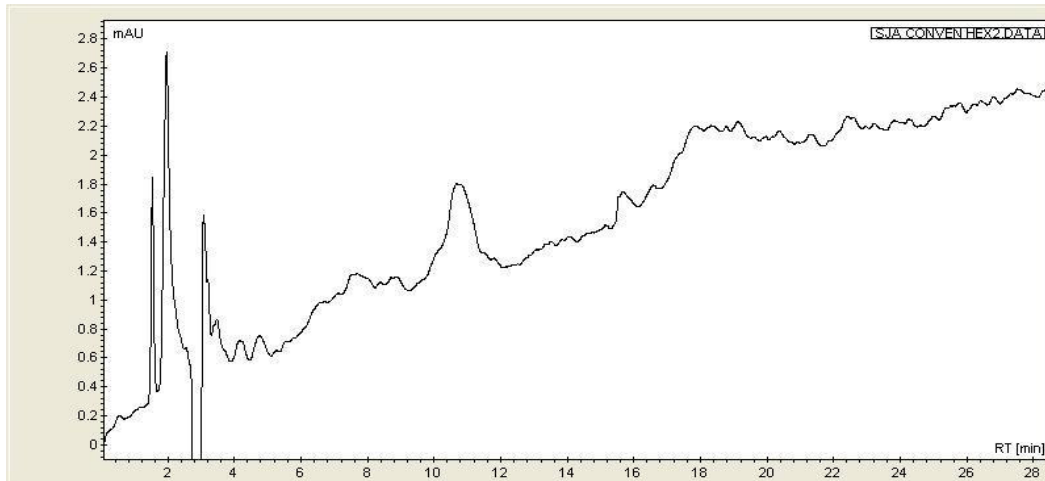


Gráfico 2 – Cromatograma do extrato hexânico da soja convencional.

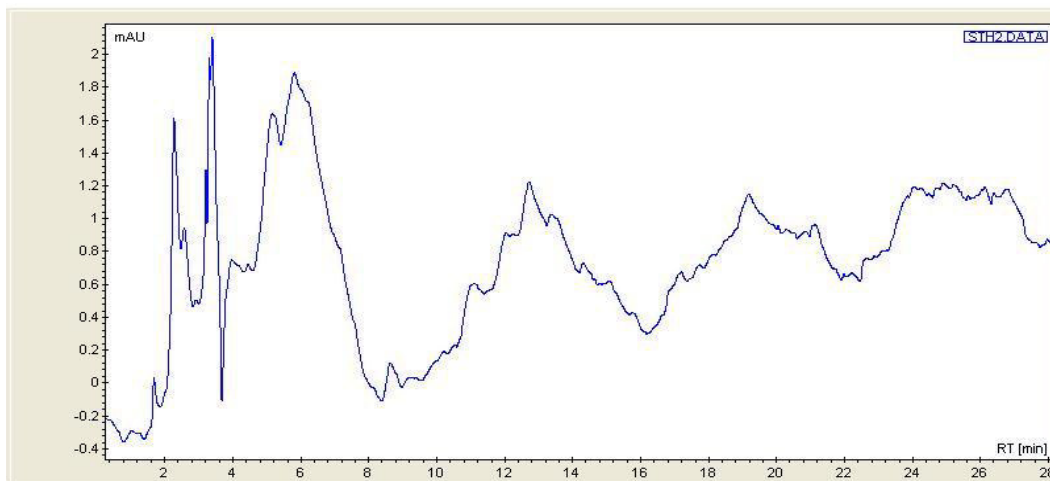


Gráfico 3 – Cromatograma do extrato hexânico da soja transgênica

Ainda não é possível dizer o que provoca essas alterações ou quais as substâncias que são alteradas, diante disso, análises mais apuradas devem ser feitas a fim de se obter dados mais preciso do que ocorre nas amostras de soja transgênica e convencional no aspecto dos seus metabólitos.

6. CONCLUSÕES

As análises dos metabólitos secundários da soja convencional e transgênica realizadas por meio de CCDC através dos testes de atividade antioxidante mostraram que tanto a soja convencional quanto a transgênica apresentam atividade antioxidante confirmadas pelos testes com o β -caroteno e pela redução do DPPH.

A atividade antioxidante observada no teste com o β -caroteno foi confirmada também pelo teste com o DPPH, porém este último apresentou resultados que confirmam a alteração dos metabólitos, visto que o extrato etanólico soja transgênica apresentou maior atividade de redução do DPPH quando comparado com extrato etanólico da soja convencional e ao padrão rotina.

A alteração dos metabólitos secundários da soja também foi evidenciada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência, onde os cromatogramas dos extratos hexânico da soja convencional e transgênica apresentaram diferentes picos e em tempos de eluições diferentes. Desta forma, pode-se sugerir que a transgenia altera os metabólitos secundários da soja, aumentando a quantidade dos compostos com atividade antioxidante ou induzindo a formação de outros compostos com essa mesma atividade.

7. REFERÊNCIAS

- ALEZANDRO M. R. et al. Soja transgênica BRS 243 RR: determinação de macronutrientes e das isoflavonas daidzeína e genisteína por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). **Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas**, 28(3): 520-526, jul.-set. 2008.
- ALVES C. Q. et al. Avaliação da atividade antioxidante de flavonoides. *Diálogos e ciência - revista da rede de ensino FTC*. Ano V, n 12, dez 2007.
- ARRIAGA A. M. C. et al. Avaliação da atividade antioxidante de metabólitos secundários isolados de *Tephrosia cinérea*. **Sociedade Brasileira de Química (SBQ)**, 2006.
- BOBBIO, F O, BOBBIO P A. **Manual de laboratório de química de alimentos**. – São Paulo: Livraria Varela. Reimpressão 2003.
- BRAND WILLIAMS, W; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie** v.28, p. 25-30, 1995.
- BRASILEIRO, C.A.; CARNEIRO, V.T. **Introdução à transformação genética de Plantas**. In: BRASILEIRO, C.A; CARNEIRO, V.T. (Eds.). *Manual de Transformação Genética de Plantas*. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa Cenargem,. cap 1, p.13. 1997.
- CAMARA, M.C.C.; MARINHO, C.L.C.; GUILAM, M.C.R.; NODARI, R.O.; Transgênicos: avaliação da possível (in)segurança alimentar através da produção científica. **História, Ciências, Saúde – Manguinhos**, Rio de Janeiro, v.16, n.3, jul.-set. p.669-681. 2009.
- CAVALLI, Suzi Barletto. Segurança alimentar: a abordagem dos alimentos transgênicos. **Revista de Nutrição**, Campinas, 14 (suplemento): 41-46, 2001.
- CHEN, Y. C. et al. Diet, vegetarian food and prostate carcinoma among men in Taiwan. **British Journal of Cancer**, v. 93, n. 9, p. 1057-1061, 2005.
- CHIARELLO, M. D. A soja e os alimentos funcionais: oportunidades de parcerias em P&D para os setores público e privado. **Revista Parcerias Estratégicas**, n. 15, p. 48-60, 2002.
- COLLINS, C. H. et al. **Fundamentos de Cromatografia**. **Organizadores**: Carol H Collins, Gilberto L. Braga e Pierina S. Bonato. – campinas, SP: Editora da UNICAMP, 2006.

DORMAN, H. J. D.; KOSAR, M.; KAHLOS, K.; HOLM, Y.; HILTUNEN, R. Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, Hybrids, Varieties, and Cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, n. 16, p. 4563-4569, 2000.

EMBRAPA-soja. **Soja em números (safra 2010/2011)**. Disponível em http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?cod_pai=2&op_page=294. Acesso em 03 de Fev. de 2013.

Gobbo-Neto, L.; Lopes, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência do conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, No. 2, 374-381, 2007.

GUTIERREZ, Z. et al. Soy isoflavone glycitein protects against beta amyloid-induced toxicity and oxidative stress in transgenic *Caenorhabditis elegans*. **BMC-Neuroscience**, v. 6, n. 54, p. 1471-2202, 2005.

HOFFMANN, M.A. **Preocupações e conseqüências negativas do uso de plantas transgênicas**. Plantio Direto, Passo Fundo, n.51, p.26-28, maio/jun. 1999.

INAGAKI, K. et al. Suppression of urokinase expression and invasion by a soybean Kunitz trypsin inhibitor are mediated through inhibition of Src-dependent signaling pathways. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 36, p. 31428-31437, 2005.

KIM Y. H. et al. Antioxidant Activity and Inhibition of Lipid Peroxidation in Germinating Seeds of Transgenic Soybean Expressing OsHGGT. **J. Agric. Food Chem.** 59, 584–591, 2011.

MARIANE L. Soy Isoflavones as Bioactive Ingredients of Functional Foods. **Soybean and Health**. 329-360. 2011.

MARTINEZ, A. P. C. et al. Alterações químicas em grãos de soja com a germinação. **Cienc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 31(1): 23-30, jan.-mar. 2011.

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.

MONQUERO P. A. **Plantas transgênicas resistentes aos herbicidas: situação e perspectivas**. Bragantia, Campinas, v.64, n.4, p.517-531, 2005

MOTHÉ C. G. et al. Estudo termoanalítico, clae e fracionamento físico e químico do subproduto industrial do milho. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 25(1): 1-7, jan.-mar. 2005.

OLIVEIRA, R.B. **Plantas tóxicas: conhecer para prevenir acidentes**. Monografia de conclusão de curso apresentada à FFCLRP/USP para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas. Ribeirão Preto, SP, 2002.

PEREIRA I. R. O. et al. Avaliação das concentrações plasmática e urinária de isoflavonas purificadas de soja. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** vol. 38, n. 3, jul./set., 2002.

ROESSING, A. C. **Situação mundial de oleaginosas**. Informe e econômico CNPSo, v. 2, p. 9-10, 1995.

SILVA, M. S.; NAVES, M.M.V.; OLIVEIRA, R.B.; LEITE, O.S.M. Composição Química e Valor Proteico do Resíduo de Soja em Relação ao Grão de Soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 26(3): 571-576, jul.-set. 2006.

SIQUEIRA, T. V., **o ciclo da soja: desempenho da cultura da soja entre 1961 e 2003**. BNDES Setorial, Rio de Janeiro, n. 20, p. 127-222, set. 2004.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE FARMACOLOGIA,
<http://sbfgnosia.org.br/Ensino/alcaloides.html>, acesso em 12 de março de 2012.

SOUZA FILHO, A. P. S.; ALVES, S. M. **Alelopatia: princípios básicos e aspectos gerais**. Belém: Embrapa Amazônia. Oriental,. 260 p, 2002.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Plant physiology. 4. ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc., 2006.

YOUNGSON, R. **Como combater os radicais livres: O Programa de Saúde dos Antioxidantes**. Rio de Janeiro: Campos,. 168p. 1995.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Gráfico da porcentagem de redução do DPPH com padrão rutina.

