

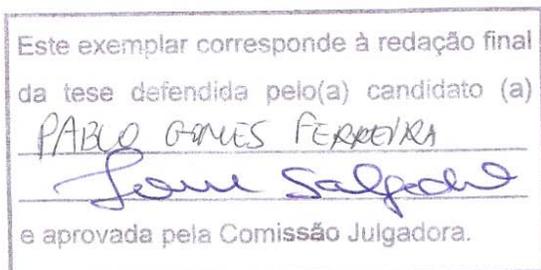
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



PABLO GOMES FERREIRA

**Atividade de extratos de soja enriquecidos em isoflavonas agliconas na síntese e degradação de óxido nítrico e no controle da proliferação de células de carcinoma de mama *in vitro***



Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade de Campinas (Unicamp), para obtenção do Título de Doutor em Biologia Funcional e Molecular, na área de Bioquímica.

**Orientadora: Profa. Dra. IONE SALGADO**

**Campinas**

**2010**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

F413a

Ferreira, Pablo Gomes  
Atividade de extratos de soja enriquecidos em isoflavonas agliconas na síntese e degradação de óxido nítrico e no controle da proliferação de células de carcinoma de mama in vitro / Pablo Gomes Ferreira. – Campinas, SP: [s.n.], 2010.

Orientadora: Ione Salgado.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Isoflavonas. 2. Óxido nítrico. 3. Mamas - Câncer. 4. Fitofármacos. 5. Espectrometria de massa. 6. Célula MCF-7. I. Salgado, Ione. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

**Título em inglês:** Activity of soybean extracts enriched in aglycone isoflavones on the synthesis and degradation of nitric oxide and on the control of breast cancer cell proliferation in vitro.

**Palavras-chave em inglês:** Isoflavones; Nitric oxide; Breast cancer; Phytochemicals; Mass spectrometry; MCF-7 cell.

**Área de concentração:** Bioquímica.

**Titulação:** Doutor em Biologia Funcional e Molecular.

**Banca examinadora:** Ione Salgado, Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo, Márcia Regina Braga, Marcos José Salvador, Willian Fernando Zambuzzi.

**Data da defesa:** 23/06/2010.

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Funcional e Molecular.

Data da Defesa: 23 de junho de 2010

**Banca Examinadora:**

Profa. Dra. Ione Salgado (Orientadora)  
(Depto. de Biologia Vegetal – IB – Unicamp)

Assinatura

Profa. Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo  
(Depto de Ciências Fisiológicas – UFSCAR)

Assinatura

Profa. Dra. Marcia Regina Braga  
(Depto de Fisiol. e Bioq. de Plantas – Inst. de Botânica – SP)

Assinatura

Prof. Dr. Marcos José Salvador  
(Depto de Biologia Vegetal – IB – Unicamp)

Assinatura

Prof. Dr. Willian Fernando Zambuzzi  
(Depto de Bioquímica – Univ. Fluminense do Rio de Janeiro)

Assinatura

Profa. Dra. Neura Bragagnolo  
(Depto de Ciência de Alimentos – FEA – Unicamp)

Assinatura

Profa. Dra. Maria Ângela Machado de Carvalho  
(Depto de Fisiol. e Bioq. de Plantas – Inst. de Botânica – SP)

Assinatura

Prof. Dr. Claudio Chrysostomo Werneck  
(Depto de Bioquímica – IB – Unicamp)

Assinatura

**“Se você quiser salvar o seu filho da pólio, você pode rezar ou você pode vacinar... Tente a ciência”**

**Carl Sagan**

De todas as escolhas e caminhos que a vida me ofereceu eu optei por ACREDITAR!

## **Aos meus Pais,**

Vocês são o meu espelho de formação como homem. Por me ensinarem valores que não podem ser comprados. Pelo amor e apoio sempre presentes em minha vida. O meu profundo amor, agradecimento e respeito. Este passo só foi possível por causa de vocês.

Mariana e João Antonio  
Dedico esta obra a vocês!

**A Profa. Dra. Ione Salgado,**

A minha mais sincera gratidão por toda a dedicação e sabedoria dedicada a mim. Pela incansável busca de me transformar em um melhor pesquisador e docente. O meu mais profundo respeito e admiração a você!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus**, por ser algo presente em minha vida e por me conceder sempre bons caminhos.

À minha irmã **Paula**, pelo grande carinho, ajuda e amor dispensados ao longo de toda a minha vida. Paulinha tenho muito orgulho de você!

À **Andrea**, pelo grande amor e dedicação. Por me fazer acreditar sempre e tornar a minha vida um encanto. Linda, não há como expressar no papel o tamanho da admiração e amor por você. Obrigado por estar sempre na minha vida!

Aos meus avós **Ceula, Leny e José**. À minha madrinha **Glória**. À minha tia **Sônia**. Pelos eternos exemplos de vida e amor.

Aos meus tios e primos, cuja lista torna impossível citá-los individualmente. Muito obrigado pelo carinho e apoio.

À **Elzira** e á **Jusceley**, pela total disposição em me ajudar no laboratório. Por se tornarem grandes amigas as quais tenho profundo respeito e carinho. O meu eterno abraço!

Às secretárias **Marina** e **Andrea** o meu muito obrigado pela atenção.

Ao **Halley**, grande amigo, o qual é sem dúvida alguma um excelente exemplo de profissionalismo, caráter e sinceridade. Pelas incansáveis ajudas, conversas e amizade que significam muito para mim.

Ao grande amigo **Eduardo**, por ser este grande irmão e amigo de longas datas.

Ao **Luís Henrique** (KIKO), por ter se tornado um grande amigo o qual tenho profundo carinho.

Ao **Plínio**, cuja amizade tem sido algo de bastante valor pra mim. Estendo este agradecimento aos demais amigos do laboratório, **Lucas, Bolinha e Simone**.

À **Maria Angélica** por ser o meu braço direito nesta minha caminhada do doutorado. O meu profundo agradecimento a você Lingüeta! Estendo o meu agradecimento a **Bruna** e a **Dani**.

Aos demais amigos que sempre me deram apoio pra chegar aos meus objetivos.

À Profa Dra **Ohara Augusto** e a Dra **Edlaine Linares**, por ter cedido valiosa contribuição ao meu trabalho.

Aos membros da minha banca de defesa, Profa Dra **Heloisa Sobreiro Selistre** de Araujo; Profa **Dra Marcia Regina Braga**; Prof. Dr. **Marcos José Salvador**; Prof. Dr. **Willian Fernando Zambuzzi**; Profa Dra **Neura Bragagnolo**; Profa Dra **Maria Ângela Machado de Carvalho**; Prof. Dr. **Claudio Chrysostomo Werneck**, pela disponibilidade e interesse em contribuírem para o meu trabalho.

Aos amigos **Dayse, Antônio e Rodrigo** pela sempre disponível ajuda nos experimentos com células. Fica aqui meu carinho e abraço.

A **Profa Dra Carmen Ferreira** pela gentileza em me ajudar nos experimentos com células.

A **Dra Alexandra** pelas ajudas com as identificações no espectrômetro de massas.

Em especial, agradeço a **FAPESP**, pelo apoio financeiro e por ter feito possível este trabalho.

A todos aqueles que, apesar de não serem citados, contribuíram direta ou indiretamente para este trabalho.

## ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE TABELAS	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS	xv
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xviii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Ações terapêuticas dos flavonóides de soja	1
1.2 O NO como Sinalizador nos Vegetais	5
1.3 Vias para produção de NO	8
1.4 Isoflavonas e o Câncer de Mama	10
1.5 Óxido Nítrico na Biologia do Carcinoma Mamário	12
2 OBJETIVOS	15
3 MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1 Indução da produção de flavonóides	16
3.2 Preparo das amostras para identificação de flavonóides por HPLC/MS	16
3.3 Preparo das amostras para identificação de compostos fenólicos e ácidos orgânicos por HPLC/MS	17
3.4 Análise do conteúdo de fenólicos totais dos extratos de soja	17
3.5 Processo cromatográfico para a identificação de flavonóides	17
3.6 Processo cromatográfico para identificar a produção de compostos fenólicos.	18
3.7 Determinação da concentração de NO com eletrodo específico	19
3.8 Determinação da concentração de NO por quimiluminescência	20
3.9 Determinação da produção de ânion superóxido	20

3.10	Cultura de células MCF-7 (tumor mamário) e células NIH 3T3 (Fibroblasto embrionário de camundongo)	21
3.11	Aplicação dos extratos e das isoflavonas nas culturas celulares	21
3.12	Avaliação da citotoxicidade e da viabilidade celular	22
3.13	Análise da emissão e da produção intracelular de NO	22
3.14	Análise estatística	23
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1	Obtenção de extratos de soja ricos em flavonóides agliconas	24
4.2	Conteúdo de flavonóides agliconas dos extratos de soja em relação ao de produtos comerciais	40
4.3	Atividade redutora de nitrito de extratos ricos em formas agliconas	43
4.4	Atividade redutora de nitrito de extratos de soja: quantificação de NO por quimiluminescência	48
4.5	Determinação da quantidade de fenólicos totais nos extratos de soja	51
4.6	Efeito de compostos fenólicos e ácidos orgânicos na redução ácida do nitrito	54
4.7	Identificação por HPLC dos compostos fenólicos dos extratos de soja	55
4.8	Atividade seqüestradora de radicais superóxido dos extratos de soja enriquecidos de agliconas	59
4.9	Atividade antinitrosativa dos flavonóides de soja e dos extratos enriquecidos de agliconas	61
4.10	Atividade proliferativa/inibitória dos extratos de soja ricos em agliconas em células tumorais de mama (MCF-7)	65
5	CONCLUSÕES	81
6	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura dos principais flavonóides de soja	4
<b>Figura 2.</b> Via biossintética dos fenilpropanóides de soja	7
<b>Figura 3.</b> Isoflavonóides exsudados de partes da soja tratadas com nitroprussiato de sódio (SNP).	25
<b>Figura 4.</b> Análise dos padrões de isoflavonas por HPLC-PDA-MS/MS	27
<b>Figura 5.</b> Isoflavonóides produzidos pelos eixos embrionários de soja em resposta ao tratamento com SNP: efeito do tempo de eliciação.	31
<b>Figura 6.</b> Quantificação de isoflavonas agliconas produzidas a partir de eixos embrionários de soja em resposta ao eliciador por diferentes períodos.	32
<b>Figura 7.</b> Indução, dose-dependente por SNP, da produção de agliconas em eixos embrionários de soja.	35
<b>Figura 8.</b> Quantificação de isoflavonas agliconas produzidas a partir de extratos de eixos embrionários de soja em resposta a diferentes concentrações de SNP	36
<b>Figura 9.</b> Cromatogramas obtidos por HPLC-PDA dos exsudatos de eixos embrionários e cotilédones de soja tratados por 20 horas com uma solução aquosa de 100 mM de SNP, sob agitação no escuro.	37
<b>Figura 10.</b> Porcentagem relativa de isoflavonas agliconas em relação ao total de isoflavonas analisadas nas diferentes extrações: somente a parte da soja e somente o exsudato	39
<b>Figura 11.</b> Cromatograma obtido por HPLC-PDA-MS/MS, de extrato de isoflavonas de soja comercial produzido pela empresa 1	41
<b>Figura 12.</b> Cromatograma obtido por HPLC-PDA-MS/MS, do extrato de isoflavonas de soja de um produto comercial produzido pela empresa 2	41
<b>Figura 13.</b> Efeito do pH e da concentração de nitrito na produção de NO	44

<b>Figura 14.</b> Efeito dos extratos de soja na redução ácida do nitrito	46
<b>Figura 15.</b> Relação dose-efeito entre o extrato de eixo embrionário e a redução do nitrito	47
<b>Figura 16.</b> Efeito dos extratos de soja na redução ácida do nitrito, determinada por quimiluminescência.	50
<b>Figura 17.</b> Concentração de fenólicos totais nos extratos de soja: efeito do tratamento com SNP	53
<b>Figura 18.</b> Efeito de compostos fenólicos e ácidos orgânicos na redução ácida do nitrito	55
<b>Figura 19.</b> Cromatogramas obtidos por HPLC-PDA da identificação de compostos fenólicos nos extratos de eixos embrionários e cotilédones de soja não tratados (A) e tratados (B) por 20 horas com uma solução aquosa de 100 mM de SNP.	57
<b>Figura 20.</b> Análise dos padrões de ácidos fenólicos por HPLC-PDA-MS/MS	58
<b>Figura 21.</b> Atividade sequestrante do radical ânion superóxido dos extratos e das isoflavonas isoladas de soja	60
<b>Figura 22.</b> Degradação de NO estimulada por extratos de soja e quercetina	62
<b>Figura 23.</b> Atividade antinitrosativa dos extratos de soja: efeito da diamida	64
<b>Figura 24.</b> Ação dos extratos de soja eliciados com SNP nos diferentes tempos de tratamento de células MCF-7	69
<b>Figura 25.</b> Ação dos extratos de soja “ <i>in natura</i> ” (sem tratamento com SNP) nos diferentes tempos de tratamento de células MCF-7	70
<b>Figura 26.</b> Ação comparativa dos extratos de soja eliciados com SNP nas atividades das desidrogenases mitocondriais (MTT) de células normais 3T3 e tumorais MCF-7	74

<b>Figura 27.</b> Avaliação do efeito de um produto comercial rico em agliconas de soja em células MCF-7 em três diferentes tempos de tratamento	75
<b>Figura 28.</b> Efeito das agliconas de soja em células tumorais de mama (MCF-7)	76
<b>Figura 29.</b> Efeito dos extratos de soja na emissão de NO em células tumorais de mama (MCF-7) e normais (3T3)	77
<b>Figura 30.</b> Ação sinérgica dos extratos de eixo embrionário com nitrito em células MCF-7	79
<b>Figura 31.</b> Efeito sinérgico dos extratos de soja e do nitrito na emissão de NO em células tumorais de mama (MCF-7) na presença de L-NAME.	80

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Concentração dos isoflavonóides identificados em exsudatos de eixo embrionário, cotilédone e semente de soja eliciados com SNP	26
<b>Tabela 2.</b> Características de massas das isoflavonas dos extratos de soja, obtidas por HPLC-PDA-MS/MS	28
<b>Tabela 3.</b> Contribuição, em termos de área e de porcentagem relativa, das isoflavonas identificadas nos extratos de soja	30
<b>Tabela 4.</b> Análise dos compostos presentes nos extratos de eixo embrionário e cotilédone de soja tratados com 100mM de SNP por 20h e analisados por HPLC-PDA	38
<b>Tabela 5.</b> Comparação, em termos de área e de porcentagem relativa, das isoflavonas identificadas nos extratos de soja: comparação entre os extratos produzidos e dois produtos comerciais	42
<b>Tabela 6.</b> Relação de flavonóides e extratos de soja na redução de nitrito em diferentes pHs, determinado por quimiluminescência e com eletrodo de NO	51
<b>Tabela 7.</b> Efeito dos extratos se soja enriquecidos em agliconas na atividade mitocondrial (MTT) de células MCF-7	66

## LISTAS DE ABREVIATURAS

CHR	Chalcona redutase
CHS	Chalcona sintase
CoA	Coenzima A
Cox-2	Ciclooxigenase 2
Dpm	<i>Diaporthe phaseolorum f. sp. meridionalis</i>
eNOS	Óxido Nítrico sintase constitutiva
ER	Receptor de estrogênio
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
FMN	Flavina mononucleotídeo
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
iNOS	Óxido Nítrico sintase induzida
MCF-7	Células de adenocarcinoma de mama ER+
MDA-MB-231	Células de adenocarcinoma de mama ER-
MS	Espectrometria de massas
mtNOS	Óxido nítrico sintase mitocôndrial
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico sintase
PAL	Fenilalanina amônia-liase
PDA	Arranjo de diodos
SNP	Nitroprussiato de sódio

## RESUMO

Embora as isoflavonas de soja naturalmente se acumulem nas formas glico- e malonil-conjugadas, os efeitos benéficos dos alimentos a base de soja para a saúde humana tem sido creditados às formas agliconas. O presente trabalho teve como objetivo desenvolver uma metodologia para produção de extratos de soja enriquecidos em isoflavonas agliconas e avaliar suas atividades na síntese e na degradação de óxido nítrico (NO) e na proliferação de células de adenocarcinoma de mama (MCF-7) cultivadas *in vitro*. O doador de óxido nítrico (NO), nitroprussiato de sódio (SNP), foi utilizado como agente indutor para o acúmulo de isoflavonas em sementes de soja, que foram identificadas e quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massas. O tratamento com SNP aumentou a síntese das isoflavonas agliconas de forma dose-dependente. A produção relativa de formas agliconas foi de aproximadamente 75% nos exsudatos (solução indutora), em comparação com a extração feita apenas a partir somente dos tecidos (34%). Após tratamento com SNP, o exsudato do eixo embrionário acumulou a maior quantidade de isoflavonas livres (1,61 µg/mg) em relação ao cotilédone (1,1 µg/mg), enquanto que nos controles a produção total de isoflavonas foi de 0,3 µg/mg, sendo 95% nas formas conjugadas. Os extratos (350 µg) do eixo embrionário ou cotilédone enriquecido em agliconas, mas não os controles, estimularam a redução ácida do nitrito (determinada com eletrodo específico) levando à produção de 1,4 e 0,9 ηmol de NO em pH 2,0, valores que foram 8 vezes e 5,1 vezes maiores quando comparados à redução apenas na presença de 50 µM de nitrito. A atividade redutora de nitrito foi diminuída com a elevação do pH e estes resultados foram validados através da detecção de NO por quimiluminescência. As principais isoflavonas, livres ou conjugadas, identificadas nos extratos não estimularam a redução ácida do nitrito. Entretanto, foi observado que o tratamento com SNP também provocou o acúmulo de outros fenólicos, como os ácidos gálico, caféico e *p*-coumárico, que estimularam a redução ácida do nitrito. Em pH neutro os extratos apresentaram atividade sequestrante de NO sendo o de embrião novamente o mais ativo (0,85 ηmol de NO degradado/min), quando comparado

com o cotilédone (0,24  $\eta$ mol/min) e com a degradação espontânea do controle (0,1  $\eta$ mol/min). Os extratos do eixo embrionário e do cotilédone apresentaram efeito bifásico dose-dependente na viabilidade e proliferação de células MCF-7. Nas doses menores (250-500  $\mu$ g/mL) os extratos promoveram (10-25%) e em concentrações mais elevadas (750-1000  $\mu$ g/mL) inibiram (15%) a proliferação celular. Na concentração de 500  $\mu$ g/mL, o efeito proliferativo dos extratos foi revertido por nitrito (100  $\mu$ M) em 34-36%. As doses mais elevadas dos extratos também estimularam a emissão de NO (detectado com um indicador fluorescente). O efeito bifásico foi atribuído à ação das isoflavonas agliconas em ativar os receptores estrogênicos e estimular a produção de NO, o que foi potencializado pelo nitrito. O conjunto dos resultados sugere que os extratos de soja enriquecidos em compostos bioativos interferem no metabolismo do NO e na proliferação de células de adenocarcinoma de mama.

## ABSTRACT

Although soybean isoflavones naturally accumulate in their glyco- and malonyl-conjugated forms, the beneficial effects that soybean containing foods have on human health have been credited to their aglycones. This study aimed to develop a methodology for producing soybean extracts enriched with isoflavones aglycones and evaluate their activities in the synthesis and degradation of nitric oxide (NO) and proliferation of breast carcinoma cells (MCF-7) cultured *in vitro*. The nitric oxide (NO) donor, sodium nitroprusside (SNP), was used as a promoter for the accumulation of isoflavones in soybean seeds, which were identified and quantified by high performance liquid chromatography and mass spectrometry. SNP treatment increased the synthesis of the aglycone isoflavones in a dose-dependent manner. The relative production of aglycone forms was approximately 75% in the exudates (promoter solution), compared to the extraction made from only the tissues (34%). After treatment with SNP, exudate from the embryonic axis accumulated the largest amount of free isoflavones (1.61  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) compared to cotyledon (1.1  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ), whereas in controls the total production of isoflavones was 0.3  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , with 95 % in conjugated forms. The extracts (350  $\mu\text{g}$ ) of embryonic axis or cotyledon enriched in aglycones, but not the controls, stimulated the acid reduction of nitrite (measured with specific electrode) leading to production of 1.4 and 0.9  $\text{nmol}$  of NO at pH 2, 0, values that were 8 times and 5.1 times higher when compared to the reduction only in the presence of 50  $\mu\text{M}$  nitrite. The nitrite reduction activity was decreased with increasing pH and these results were validated by detection of NO by chemiluminescence. The main isoflavones, free or conjugated, identified in the extracts did not stimulate the acid reduction of nitrite. However, we observed that treatment with SNP also caused the accumulation of other phenolic compounds such as gallic, caffeic and *p*-coumaric acids, which stimulated the acid reduction of nitrite. At neutral pH extracts showed scavenging activity of NO and the embryo again was the most active (0.85  $\text{nmol}$  NO degraded/min) when compared to the cotyledon (0.24  $\text{nmol}/\text{min}$ ) and to the spontaneous degradation of the control (0.1  $\text{nmol}/\text{min}$ ). The embryo and cotyledon extracts showed dose-dependent biphasic effects on viability and proliferation of

MCF-7 cells. At lower doses (250-500  $\mu\text{g/mL}$ ) extracts promoted (10-25%) and at higher concentrations (750-1000  $\mu\text{g/mL}$ ) inhibited (15%) cell proliferation. At 500  $\mu\text{g/mL}$ , the proliferative effect of the extracts was reversed by nitrite (100  $\mu\text{M}$ ) in 34-36%. The higher doses of the extracts also stimulated emission of NO (detected with a fluorescent indicator). The biphasic effect was attributed to the action of isoflavone aglycones in activating estrogen receptors and stimulating the production of nitric oxide, which was increased by nitrite. Overall, the results suggested that soybean extracts enriched in bioactive compounds interfere with the metabolism of NO and the proliferation of breast adenocarcinoma cells.

## 1 – INTRODUÇÃO

### 1.1– *Ações terapêuticas dos flavonóides de soja*

Os alimentos funcionais, também denominados nutracêuticos, referem-se aos produtos alimentícios que contêm compostos bioativos que trazem benefícios à saúde humana, além dos nutrientes tradicionais que eles contêm. Uma boa parte dos compostos bioativos é derivada do metabolismo secundário das plantas amplamente distribuídas no reino vegetal. Nos últimos anos, vários compostos bioativos têm sido investigados quanto ao seu potencial antioxidante, anticancerígeno e antiinflamatório em diferentes modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*, bem como em ensaios pré-clínicos. Existem milhares de compostos do metabolismo secundário vegetal já caracterizados, tais como fenóis (curcumina e flavonóides), carotenóides ( $\beta$ -caroteno), vitamina C e limonóides de *Citrus*, entre outros. Porém, poucos deles foram testados em modelos biológicos visando aplicações clínicas (Patil et al., 2009).

Os flavonóides foram pela primeira vez avaliados por Robert Boyel, em 1664. Mais tarde, durante os anos de 1800, a cor vermelha do vinho e do pigmento azul da flor do milho foi atribuída à presença de flavonóides e pigmentos de antocianina (Morot, 1849). Em 1900 Rusznyak e Szent-Gyorgyi mostraram que o suco de limão rico em flavonóides tem a capacidade de melhorar a resistência capilar. Eles chamaram os flavonóides de “vitamina P”, pois acreditavam que estas substâncias possuíam atividades semelhantes a aquelas das vitaminas (Rusznyak et al., 1936). Posteriormente, descobriu-se que tal efeito de resistência capilar era atribuído aos flavonóides hesperidina, eriocitina e rutina (Sokoloff et al., 1951). O nome “vitamina P” deixou de ser utilizado na década de 1950, no entanto, essas observações levaram a um intenso interesse na elucidação das atividades dos flavonóides em modelos biológicos.

Os flavonóides são compostos fenólicos encontrados principalmente em vegetais folhosos, frutas e sementes (Yusof et al., 1990). São conhecidos por suas atividades em inibir certas enzimas, serem estruturalmente muito semelhantes a

hormônios e neurotransmissores e também por serem compostos altamente antioxidantes, devido à sua habilidade de transferência de elétrons e em doar átomos de hidrogênio, agindo como captadores de radicais livres (Trípoli, 2007; Havsteen, 2002). A partir destas características, tem sido atribuída aos flavonóides a capacidade de proteção contra danos celulares e conseqüente instalação e desenvolvimento de doenças como o câncer (Cabanés et al., 2004), além de possuírem uma atividade antimicrobiana (Sharma et al., 2009).

Através da doação de prótons, os flavonóides podem inibir a ação oxidante do óxido nítrico (NO), evitando assim o aparecimento de outros intermediários reativos de nitrogênio que são ainda mais tóxicos, como por exemplo, o peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>). Já foi demonstrado que a administração via oral de flavonóides está relacionada com a prevenção de arteriosclerose (Loke et al., 2010; Sacks et al., 2006), de cânceres (Elangovan et al., 1994; Messina et al., 2006), com a inibição do desenvolvimento de tumores (Trípoli, 2007; Coward et al., 1993; Fotsis et al., 1995), entre outras atividades.

O potencial das isoflavonas, atuando como antioxidantes e seqüestrantes de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, pode explicar alguns dos efeitos benéficos de alimentos a base de soja à saúde humana, embora o mecanismo de ação destas moléculas não seja ainda completamente conhecido (Sadowska-Krowicka et al., 1998; Hsu et al., 2000). A genisteína, uma das principais isoflavonas extraídas da soja é um potente agente antioxidante (Dixon e Ferreira, 2002). A administração oral de isoflavonas e extratos de produtos à base de soja diminuíram significativamente o nitrito sérico e os níveis de nitrotirosina em ratos tratados com LPS (lipopolissacarídeos). Este efeito foi atribuído à capacidade das isoflavonas da soja em inibir a oxidação induzida por espécies reativas de nitrogênio (Yen e Lai, 2003).

Além de suas propriedades antioxidantes, os flavonóides apresentam propriedades estrogênicas, que começaram a ser investigadas entre as décadas de 1970 e 1980. O impacto trazido pelo "paradoxo francês", que aborda os benefícios potenciais para a saúde humana dos polifenóis do vinho e a baixa incidência de doenças cardiovasculares e de cânceres nos povos orientais, incitou

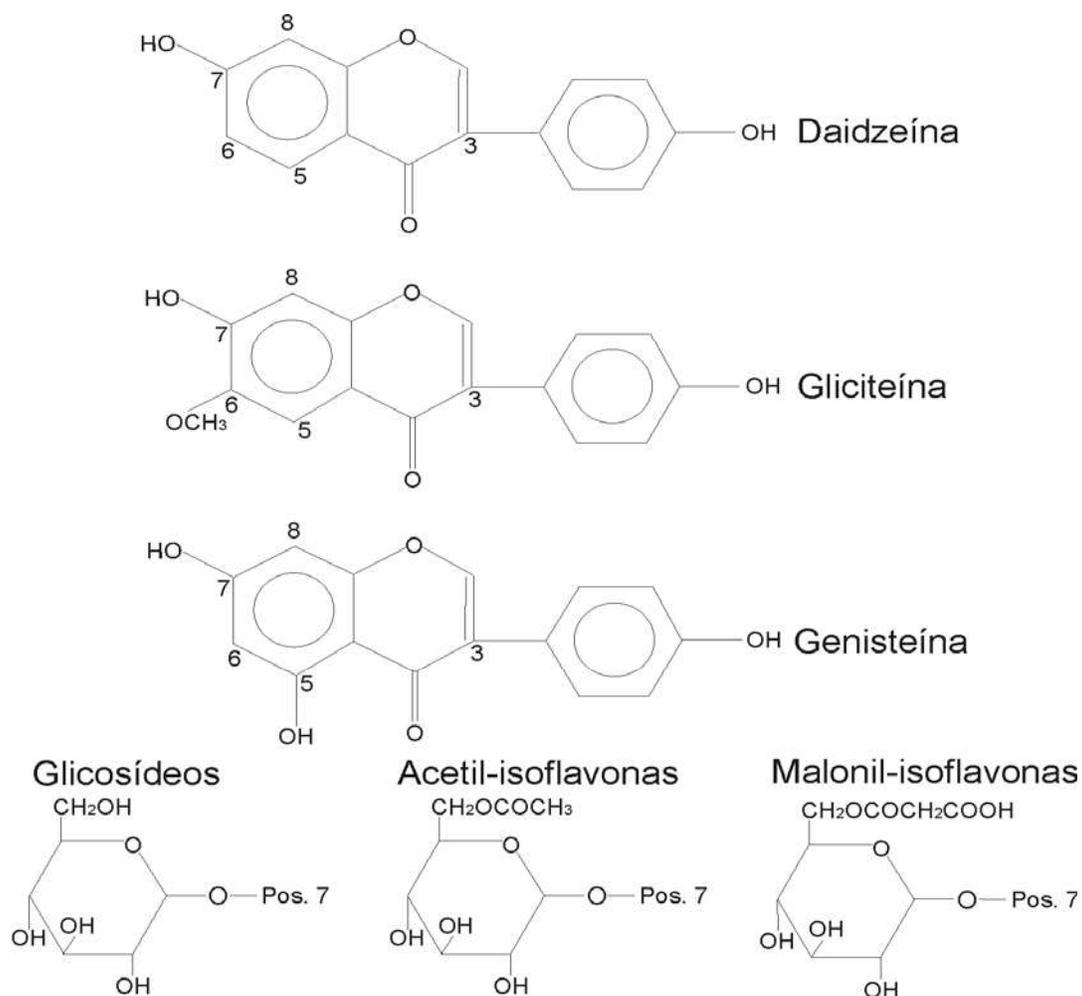
a investigação dos benefícios oferecidos pelos flavonóides (Miksicek, 1993). Evidências obtidas de dados epidemiológicos e experimentais sugerem fortemente efeitos benéficos das isoflavonas sobre a saúde humana (Mccue e Shetty, 2004; Valachovicova et al., 2004). Estes compostos podem regular ações imunológicas (Keung et al., 1993; Havsteen, 2002), modular a proliferação de tumores mamários (Shon et al., 2006) e prevenir a osteoporose (Usui, 2006).

As isoflavonas apresentam estrutura não-esteroidal (Figura 1), mas comportam-se como estrógenos na maioria dos sistemas biológicos, sendo, por isso, chamadas de fitoestrógenos (Dixon e Ferreira, 2002; Wei et al., 2003). Sabe-se que as isoflavonas se ligam ao receptor de estrógeno, com afinidade variável e podem interferir em várias reações metabólicas, como por exemplo, aquelas envolvidas na expressão de genes que controlam a proliferação celular (Hwang et al., 2006). As isoflavonas parecem exercer seus efeitos como antagonistas de estrógeno em ambientes com alta concentração, especialmente de  $17\beta$ -estradiol ou podem atuar como agonistas do estrógeno em ambientes com baixas concentrações deste hormônio (Matsumura et al., 2005). As baixas incidências de tumor mamário e de doenças coronarianas entre mulheres asiáticas são atribuídas aos seus baixos níveis de estrógeno, o que parece estar relacionado à ingestão de alimentos à base de soja (Dixon e Ferreira, 2002). Por outro lado, tem sido demonstrado que problemas causados pela deficiência de estrógeno em mulheres na pós-menopausa também podem ser tratados com o uso de genisteína (Dixon e Ferreira, 2002; Merzdemlow et al., 2000).

Outra importante isoflavona da soja é a daidzeína (Coward et al., 1993; Adlercreutz, 1995) que é capaz de se ligar aos receptores de estrógeno e induzir a resposta celular por mecanismos semelhantes àqueles de outros estrógenos naturais (Setchell et al., 2002).

O principal esforço para reduzir a mortalidade da população acometida pelo câncer tem sido direcionar o foco no desenvolvimento de melhores quimioterápicos (Steele, 2003). Embora os agentes farmacêuticos apresentem papéis terapêutico e preventivo, a busca por compostos de origem natural que atuem na prevenção não só do câncer mamário como dos demais tipos, têm sido

atualmente bastante explorada (Shon et al., 2006). Tendo em vista estes fatores, a produção de alimentos ou de suplementos nutricionais enriquecidos em compostos bioativos tem atualmente gerado grande interesse tanto no âmbito acadêmico quanto no industrial.



**Figura 1. Estrutura dos principais flavonóides de soja.** As isoflavonas de soja daidzeína, genisteína e gliciteína são naturalmente encontradas predominantemente nas formas glicosil-, acetil- e malonil-conjugadas através da ligação na posição 7 das agliconas.

Apesar de apresentar muitas potencialidades, os flavonóides são conhecidos por sua menor biodisponibilidade de todos os suplementos dietéticos, pois apenas as agliconas podem atravessar a parede do intestino. A soja, por exemplo, contém naturalmente grandes quantidades de isoflavonas glicosiladas, mas que são passíveis de hidrólise enzimática (Park et al., 2001). As formas agliconas são mais ativas contra radicais livres e tumores da mama e próstata, entre outras atividades biológicas (Setchell e Cassidy, 1999). Em grãos de soja as isoflavonas podem ser encontradas predominantemente nas formas malonil-glicosilada, glicosilada e acetil-glicosilada (Figura 1). Esses compostos fenólicos glicosilados, quando submetidos a processos térmicos, fermentativos e enzimáticos são transformados às suas formas agliconas e acumulados no produto fermentado final (Klus e Barz, 1998). Um bom exemplo disso é que Park e colaboradores (2001) utilizaram um fungo presente na farinha de soja para transformar as  $\beta$ -glicosil isoflavonas em agliconas através de um processo enzimático. Outra técnica que também parece promissora consistiria em estimular a produção de flavonóides de soja diretamente na sua forma aglicona. Em 2002, Modolo e colaboradores observaram que alguns indutores como, por exemplo, o extrato de *Diaporthe phaseolorum f. sp. meridionalis* e o nitroprussiato de sódio (SNP) eram capazes de estimular a produção de flavonóides em cotilédones de plântulas de soja germinadas. Diferentemente do extrato fúngico, que estimulou a produção das formas conjugadas dos flavonóides, o SNP provocou o acúmulo das formas bioativas dos flavonóides de soja, ou seja, as formas agliconas.

Assim, o desenvolvimento de uma metodologia que seja eficiente em aumentar a produção de agliconas bioativas em extratos de soja poderá ter potencial aplicabilidade na produção de alimentos funcionais.

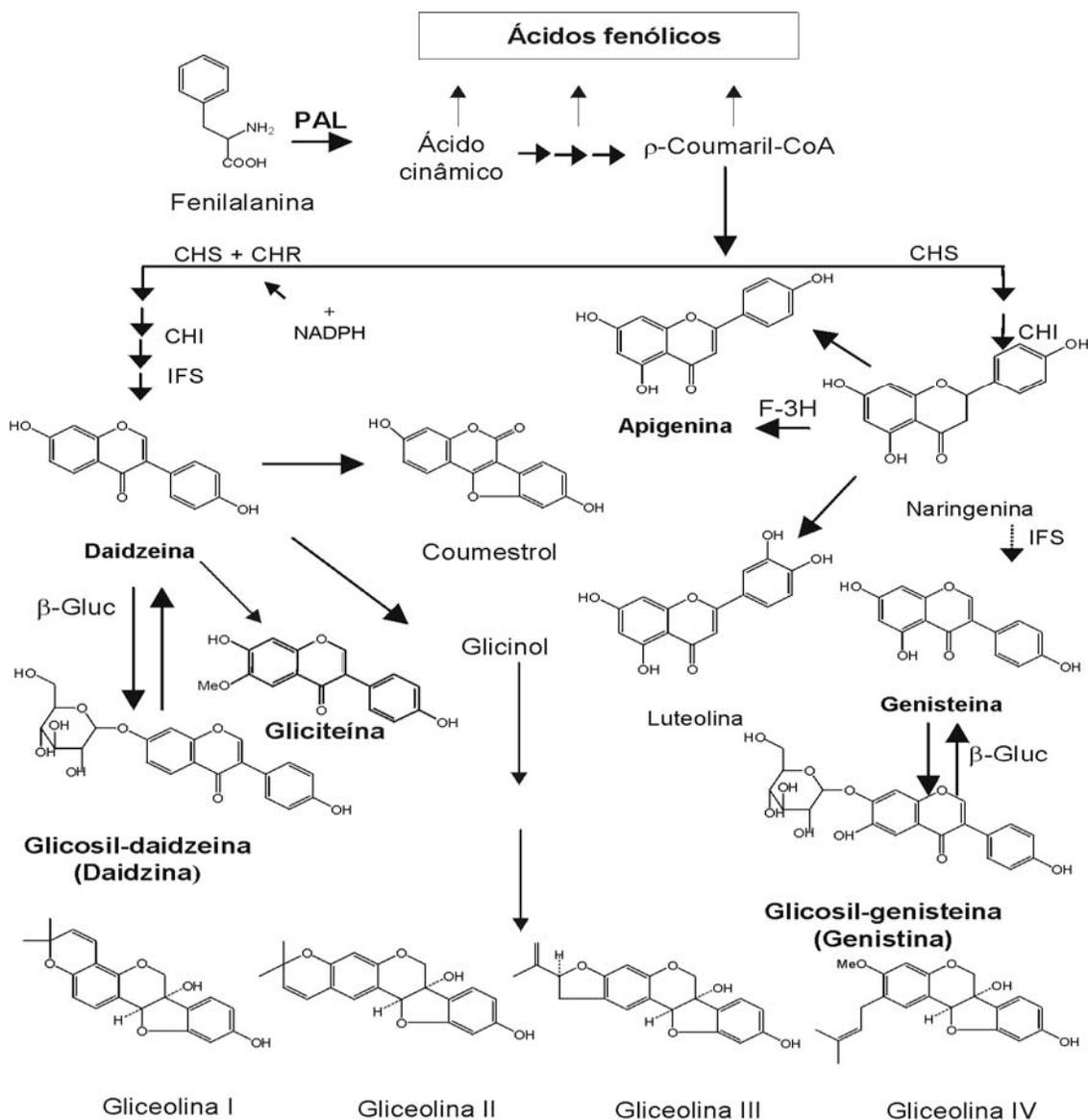
## **1.2 – O NO como Sinalizador nos Vegetais**

O óxido nítrico (NO) é um radical livre gasoso que apresenta uma ampla atividade em sistemas animais, controlando a homeostase vascular, a neurotransmissão e a resposta imune, mediando a ativação de macrófagos na

defesa contra patógenos e células tumorais (Ascenzi et al., 2003). Estudos mais recentes têm também revelado o papel do NO como um sinalizador para os vegetais. Como regulador do desenvolvimento e crescimento vegetal, o NO promove a germinação, expansão foliar e crescimento da raiz, além de retardar a senescência foliar, o processo de floração e a maturação do fruto (Beligni e Lamattina, 2000; Neill et al., 2003). Além disso, o NO atua como um sinal chave na resistência da planta a patógenos, mediando a síntese de flavonóides com atividade antimicrobiana (fitoalexinas) e a ativação de vários genes de defesa do hospedeiro (Modolo et al., 2002; Romero-Puertas e Delledone, 2003). Acredita-se que a rapidez na produção de fitoalexinas seria um fator importante na determinação da resistência, uma vez que sua produção ocorre também em muitas interações compatíveis, ou seja, quando o patógeno consegue se estabelecer na planta (Hammerschmidt, 1999; Harborne, 1999).

Trabalhos pioneiros de Delledonne e colaboradores (1998) e Durner e colaboradores (1998) mostraram que o NO é capaz de induzir a ativação transcricional de genes defesa-relacionados, como aqueles que codificam para as enzimas fenilalanina amônia-liase (PAL) e chalcona sintase (CHS), que são enzimas chaves na via dos fenilpropanóides, os precursores das fitoalexinas em muitas espécies vegetais. A enzima PAL catalisa a deaminação de fenilalanina para formação do ácido cinâmico, que quando hidroxilado origina o ácido p-coumárico (Cornille et al., 1998; Harborne, 1999). Este último pode sofrer reações seqüenciais de condensação com malonil-CoA, cujo produto sob ação conjunta das enzimas CHS e CHR (chalcona redutase) na soja gera a daidzeína. Contudo, se o produto de condensação sofrer apenas a ação de uma CHS, forma-se uma flavona correspondente, intermediário-chave tanto para a biossíntese de genisteína (isoflavona tri-hidroxilada) quanto das flavonas apigenina e luteolina. As relações biossintéticas que levam à produção das várias classes de fenilpropanóides em soja estão apresentadas na Figura 2. A produção de intermediários da via dos fenilpropanóides pode ser controlada em função da natureza do agente indutor. Conforme já mencionado, em soja o SNP, uma molécula doadora de NO, induziu predominantemente a produção das agliconas

daidzeína e genisteína (Modolo et al., 2002). Assim, a utilização de moléculas doadoras de NO pareceu ser uma metodologia promissora para aumentar a produção das formas bioativas dos flavonóides da soja, observação que levou ao pedido de registro de uma patente (Salgado e Modolo, 2003).



**Figura 2. Via biossintética dos derivados dos fenilpropanóides de soja.** PAL fenilalanina amônia liase; CHS, CHR, CHI chalcona sintase, redutase e isomerase respectivamente; IFS isoflavona sintase;  $\beta$ -Gluc  $\beta$ -glicosidase; F-3H flavanona-3-hidroxilase (adaptado de Kretschmar et al. 2009).

### **1.3 – Vias para produção de NO**

O principal mecanismo de síntese de NO em células animais ocorre através da oxidação da L-arginina à L-citrulina, pela enzima óxido nítrico sintase (NOS). As NOSs catalisam a formação de NO e L-citrulina a partir de L-arginina, numa reação dependente de O<sub>2</sub>, NADPH, heme, tetrahydrobiopterina, calmodulina, FAD e FMN (Stuehr, 1997). As principais isoformas das NOSs, neuronal, endotelial e de macrófagos (induzida), são citosólicas ou ligadas à membrana plasmática e, mais recentemente, alguns grupos têm demonstrado a existência de outra NOS de origem mitocondrial (mtNOS), que seria um “splice” alternativo da NOS neuronal (Haynes et al., 2003). A maior parte do NO assim produzido é neutralizado em produtos que eram considerados inertes para o metabolismo, como o nitrito. Entretanto, evidências recentes sugerem que o nitrito não é apenas o principal produto de oxidação do NO, mas é também sua principal forma de armazenamento, que é ativada e/ou reciclada para formar NO em condições de hipóxia/anóxia (Bryan et al., 2006) como aquelas que ocorrem durante o enfarte do miocárdio e derrame (Kakizawa et al., 2006; Zaobornyj et al., 2007). Ainda, a redução ácida de nitrito tem sido mais recentemente considerada uma fonte promissora de NO no trato gastrointestinal (Lundberg et al., 2004). O estudo destas novas vias de formação de NO, independentes das enzimáticas, já classicamente descritas, pode trazer um avanço no entendimento da importância desta molécula para a fisiologia humana.

O nitrito provém principalmente do nitrato obtido através da dieta de vegetais. Uma dieta rica em vegetais resulta também numa grande ingestão de nitrato inorgânico, que é encontrado em grandes quantidades em verduras e legumes. O nitrato inorgânico obtido na dieta é secretado na saliva e reduzido a nitrito pela flora bacteriana (Ferguson et al., 1998). No pH ácido do estômago, o nitrito está presente como ácido nitroso que pode ser convertido em NO (Benjamin et al., 1994). Estudos recentes têm sugerido que este radical no estômago pode exercer vários efeitos benéficos para o homem. Assim, o NO produzido a partir da redução ácida do nitrito no suco gástrico pode exercer ação bactericida, matando

as bactérias que foram ingeridas na alimentação (Xu et al., 2001) e apresentar um efeito vasodilatador na micro-circulação gástrica (Whittle et al., 1993). Ainda, parece estar envolvido no relaxamento reflexo do estômago para acomodar a alimentação, na produção de muco e no aumento do fluxo sanguíneo na mucosa (Takahama et al., 2006; Peri et al., 2005).

Embora alguns estudos tenham sugerido a toxicidade do nitrato (Moriya et al., 2002), esta é uma questão controversa, já que outros têm demonstrado uma relevante ação gastroprotetora (Miyoshi et al., 2003), um efeito que parece superar os riscos carcinogênicos deste íon (Moriya et al., 2002). Estes efeitos benéficos do nitrato têm sido atribuídos ao NO (Lundberg et al., 2004).

Em meio ácido, a síntese de NO é favorecida quando o nitrito é protonado formando ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ) que então se decompõe em óxido nítrico e outros óxidos de nitrogênio (Benjamin et al., 1994; Mcknight et al., 1997). A redução do nitrito em meio ácido é uma reação bastante lenta, mas que pode ser acelerada pela presença de um agente redutor, como o ácido ascórbico. Assim, agentes redutores com potenciais de redução apropriados podem facilitar a redução do ácido nitroso favorecendo a seguinte reação:  $\text{HNO}_2 + \text{H}^+ + \text{e}^- \longrightarrow \text{NO} + \text{H}_2\text{O}$ . Muitos flavonóides, bem como outros fenólicos derivados da via dos fenilpropanóides (Figura 2) têm assim potencial para atuarem como agentes redutores do nitrito, o que coloca esta categoria de compostos como possíveis facilitadores da produção de NO em condições ácidas. Realmente, já foi demonstrado que o flavonóide quercetina, bem como alguns ácidos fenólicos, como o caféico e o p-coumárico, foram capazes de estimular a redução ácida do nitrito (Gago et al., 2007; Peri et al., 2005) e que a quercetina e a epicatequina oriundas da dieta provocaram um aumento de NO, nitrito e S-nitrosotióis no plasma (Loke et al., 2008). Estes resultados vêm sugerindo que parte dos efeitos benéficos dos flavonóides e de outros fenólicos à saúde humana pode resultar da ação destes compostos em facilitar a produção de NO no trato gastrointestinal.

#### **1.4 - Isoflavonas e o Câncer de Mama**

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais freqüente no mundo e o primeiro entre as mulheres (Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil para 2008). O Ministério da Saúde, através do Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima que o número de casos novos de câncer de mama no Brasil em 2006 foi de 48.930 (52/100.000). Os fatores que podem estar associados ao aumento de risco do câncer de mama incluem o estado hormonal endógeno, o estilo de vida, fatores ambientais, suscetibilidade genética e falhas na detecção precoce. Os mecanismos responsáveis pelo crescimento celular dependente de hormônio ainda são pouco conhecidos (Jo et al., 2005). Sabe-se, porém, que o estrógeno regula o crescimento de tumores mamários que expressam receptores de estrógeno. Este tipo de tumor mamário é denominado receptor de estrógeno-positivo (ER+). O metabolismo e síntese intratumoral de estrógenos, resultado da interação de várias enzimas, desempenha papel importante na patogênese e desenvolvimento dos carcinomas mamários dependentes de hormônio, tal como ocorre no carcinoma *in situ* e nas células MCF-7, uma linhagem humana de células de adenocarcinoma de mama muito bem caracterizada. As células MCF-7 são positivas para os receptores de estrogênio e, conseqüentemente, um modelo *in vitro* útil para estudar o papel do estrogênio na biologia do câncer de mama. A interação do estradiol com o ER inicia uma seqüência de eventos que leva à modulação da expressão de vários genes responsáveis pelo aumento da proliferação de células do epitélio mamário (Sasano et al., 2006). Como os estrógenos induzem a proliferação de vários tumores mamários, os agentes terapêuticos que inibem a síntese de estrógenos, tais como o tamoxifeno e falsodex, são amplamente usados no tratamento do câncer de mama (Jo et al., 2005). Entretanto, a maioria das pessoas desenvolve resistência a esses antiestrogênicos, comprometendo o tratamento (Frankel et al., 2006).

O principal esforço para reduzir a mortalidade de acometidos pelo câncer de mama tem sido direcionado no desenvolvimento de terapias mais eficientes (Steele, 2003). Embora os agentes farmacêuticos apresentem papéis terapêutico

e preventivo, o uso de compostos de origem natural para prevenir o câncer mamário tem sido atualmente bastante explorado (Shon et al., 2006). Sabe-se que o tecido mamário expressa os receptores de estrógeno  $\alpha$  e  $\beta$  (ER $\alpha$  e ER $\beta$ ). No tecido normal há predomínio de ER $\beta$ , enquanto no tecido tumoral há predomínio de ER $\alpha$  e a ativação de ambos apresenta potencial para induzir e ativar a NOS (Lu et al., 2004). A ativação do receptor ER $\alpha$  promove a proliferação, enquanto que a ativação do receptor ER $\beta$  inibe a proliferação do epitélio mamário, o que corrobora a visão emergente de que as isoflavonas da soja não aumentam o risco de câncer mamário e possivelmente podem diminuí-lo, devido à afinidade que estes compostos exibem pelo receptor ER $\beta$  (McCarty, 2006). Contudo, os dados são controversos e o papel das isoflavonas no câncer mamário e sua relação com o NO ainda não está completamente esclarecido.

Estudos epidemiológicos sobre a ingestão de produtos de soja e a incidência de tumor mamário são escassos (Usui, 2006). Experimentos utilizando modelos animais com indução de câncer de mama e genisteína purificada têm demonstrado que o tempo de exposição dos animais aos isoflavonóides é crítico. Ratos tratados com altas doses de genisteína nos períodos neonatal ou pré-pubertal têm tido um tempo de latência maior antes do aparecimento de tumores de mama induzidos por 7,12-dimetilbenzoantraceno e expressiva redução no número de tumores. O mecanismo preventivo da genisteína ocorre, em parte, pela sua atividade estrogênica, a qual causa diferenciação das células das glândulas mamárias mais rapidamente. A administração de genisteína depois de 35 dias de idade apresentou alterações menores no risco ao câncer de mama (27% de redução). Em contraste, em animais ovariectomizados a genisteína aumentou a proliferação de células cancerosas comparado com a dieta controle (Murrill et al., 1996; Lamartiniere et al., 1998; Cabanes et al., 2004).

Alguns fitoestrógenos não deslocaram o 17 $\beta$ -estradiol do complexo com o receptor, como o antagonista de estrógeno classicamente utilizado no tratamento do câncer de mama (Matsumura et al., 2005). Assim, os efeitos benéficos das isoflavonas contra o câncer de mama podem incluir outro mecanismo que não seja o efeito anti-estrogênico.

A proliferação de linhagens celulares de carcinoma mamário humano, MCF-7 (ER+) e MDA-MB-231 (ER-) foi inibida por genisteína (Shon et al., 2006). Este efeito se deveu à inibição da atividade enzimática do citocromo P450, COX-2 e da ornitina carboxilase e mostrou-se dependente da concentração, sugerindo que a genisteína possa apresentar valor terapêutico na prevenção de tumores mamários.

É evidente que a carcinogênese mamária é um processo complexo, envolvendo vários eventos celulares e moleculares. Assim, a utilização de múltiplos agentes com diferentes modos de ação pode diminuir a toxicidade e aumentar a eficácia das estratégias terapêuticas para prevenção e tratamento desse carcinoma (Brenner, 2000). A ação conjunta de agliconas de soja na ação antitumoral do tamoxifeno foi avaliada por Lamartiniere et al., (1998). Ratos Sprague Dawley fêmeas tiveram suas dietas suplementadas com tamoxifeno, genisteína e daidzeína ou uma combinação de cada isoflavona com o tamoxifeno. Os tumores de mama foram induzidos por 7,12-dimetilbenzantraceno durante uma semana. Foi verificado que a dieta mais eficaz foi a combinação tamoxifeno/daidzeína que reduziu a multiplicidade do tumor em 76%, a incidência do tumor em 35%, a latência aumentada do tumor em 62%, bem como os níveis de desoxiguanosina (indicador de dano no DNA) nas glândulas mamárias. Assim, estes resultados evidenciaram a ação antitumoral da daidzeína quando utilizada concomitante com outro antitumoral, o tamoxifeno. A administração conjunta de miso (alimento à base de soja) e tamoxifeno também apresentou efeito contra o desenvolvimento de tumor mamário induzido pela N-nitroso-N-metiluréia (Gotoh et al., 1998).

### **1. 5 - Óxido Nítrico na Biologia do Carcinoma Mamário**

O NO tem sido considerado uma molécula importante para a progressão e sobrevivência do carcinoma mamário humano devido à sua ação em diferentes etapas do processo de crescimento tumoral e metástase. Entretanto, os resultados sobre as ações do NO no tumor mamário são conflitantes, pois tanto ações

benéficas como prejudiciais tem sido relatadas (Gattia et al., 2004; Pance, 2006). Os efeitos do NO dependem da sua concentração e, embora, altas concentrações sejam citostáticas e citotóxicas, baixas concentrações podem proteger a célula contra danos ao DNA e apoptose e, dessa forma, algumas células tumorais toleram a expressão da NOS sem sinais de citotoxicidade (Jones et al., 2003).

Vários trabalhos clínicos e experimentais enfatizam a contribuição do NO na progressão tumoral e demonstram uma correlação negativa entre a atividade da NOS e a proliferação celular (Chae et al., 1997; Hodgkin et al., 2002). Estes estudos mostraram que os tumores com alta atividade de NOS exibem baixa proliferação e menor malignidade, enquanto que tumores mamários com baixa atividade da NOS apresentam crescimento rápido e são invasivos. Ainda, a transfecção de células tumorais metastáticas de crescimento rápido com a iNOS produziu a diminuição do crescimento celular e de metástase indicando que o NO inibe a proliferação e progressão tumoral (Jadeski et al., 2000).

As citocinas e hipóxia podem, sinergisticamente, induzir a expressão da eNOS, assim, os tecidos tumorais pré-malignos e malignos podem estabelecer uma produção sustentável de NO. Esta produção é essencial para a estimulação da angiogênese, que atua na manutenção nutricional do tumor e pode promover a invasividade tumoral (Ambs et al., 1997; Gauthier et al., 2004). Já foi demonstrado que, em situações de estresse por hipóxia, o NO oriundo das NOS tende a modular a sinalização de uma uroquinase extracelular ativada por plasminogênio. Esta uroquinase tem um papel principal na invasividade, metástase e produção angiogênica da célula tumoral, regulando a disponibilidade do fator de crescimento endotelial (Yoon et al., 2006; Konopka et al., 2001).

O crescimento tumoral pode ainda estimular ou inibir o sistema imune. O metabolismo da L-arginina por macrófagos intratumorais pode fornecer uma explicação molecular para esta ação. Tem sido proposto que o metabolismo da L-arginina produzindo L-citrulina e NO favorece a rejeição do tumor, enquanto que a produção de L-citrulina e uréia promovem o crescimento tumoral (Ambs et al., 1997). A presença de células tumorais pode ainda estimular os macrófagos, que produzem grandes quantidades de NO, devido à ativação da iNOS. O excesso de

NO pode gerar outros radicais livres mais reativos que danificam o DNA, induzindo a apoptose das células tumorais, o que é benéfico. Entretanto, se a célula não sofrer apoptose, poderá acumular mais lesões no DNA, podendo inclusive estimular o crescimento tumoral (Jones et al., 2003).

O mecanismo molecular da ação dos hormônios esteróides no carcinoma mamário não está completamente elucidado, mas trabalhos recentes associam o NO aos efeitos dos esteróides (Jones et al., 2003). Tanto o estrógeno como a progesterona podem regular a NOS e, assim, o NO produzido pode interferir na homeostase da célula tumoral. O estrógeno aumenta a atividade da eNOS, enquanto a progesterona ativa a iNOS. Os dados sugerem que baixos níveis de NO produzidos pela eNOS mediam o efeito proliferativo do estrógeno. O aumento da apoptose mediada pela progesterona pode ser devido aos altos níveis de NO produzidos em resposta à ativação da iNOS (Pance, 2006). Loibl e colaboradores (2006) detectaram a presença de eNOS e iNOS em lesões cancerosas, mas não em benignas. Esta expressão pareceu estar relacionada ao estado de diferenciação tumoral e à presença de receptores de esteróide do tumor (Loibl et al., 2002; Niu et al., 2004). As células MCF-7 expressam a eNOS e apenas níveis detectáveis de iNOS. Nessas células a eNOS pode ser estimulada por estrógeno, enquanto a iNOS pode ser estimulada por diferentes citocinas e LPS, mas não pelo estrógeno (Loibl et al., 2006).

Pelo exposto, pode se observar que a relação entre o NO e o tumor mamário não está completamente esclarecida. Ainda, a produção de NO independente de L-arginina, ou seja, a partir do nitrito em células tumorais não tem sido avaliada, o que poderia explicar, pelo menos em parte, os resultados conflitantes em relação à expressão das enzimas NOS e a carcinogênese.

## 2 – OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos desenvolver uma metodologia para a produção de extratos de soja enriquecidos em compostos bioativos e avaliar suas atividades redutora de nitrito em meio ácido e antinitrosativa e antioxidante em meio neutro. Ainda, procurou-se avaliar o efeito dos extratos de soja e do óxido nítrico no controle da proliferação de células de carcinoma de mama cultivadas *in vitro*. Para alcançar tais objetivos as seguintes etapas foram propostas:

- (1) Estabelecer um método eficiente em aumentar a produção de compostos bioativos a partir de tecidos de soja, principalmente das isoflavonas agliconas como a genisteína e a daidzeína, utilizando como tratamento indutor o doador de NO nitropussiato de sódio (SNP);
- (2) Identificar, utilizando espectrometria de massas, as isoflavonas e seus conjugados produzidos em resposta ao tratamento indutor;
- (3) Analisar, em ensaios *in vitro*, a eficiência dos extratos de soja e de seus componentes em estimular a produção de NO em meio ácido, através da redução do nitrito;
- (4) Analisar, em ensaios *in vitro*, a eficiência dos extratos e seus componentes em seqüestrar NO e ânion superóxido em pH neutro;
- (5) Analisar o efeito dos extratos e do nitrito na proliferação de células de carcinoma de mama e a relação com a produção de NO.

### 3 - MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 - Indução da produção de flavonóides

Os ensaios foram realizados segundo (Modolo et al., 2002) com modificações. Sementes de soja (*Glicine max* L.) do cultivar IAC-18 (cultivar resistente ao fungo *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *Meridionalis* - Dpm, provido do Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, São Paulo) foram embebidas em água por 1 hora e posteriormente tratadas com hipoclorito de sódio 0,3% por 10 min e, então, enxaguadas três vezes com água ultra pura. Em seguida 50 partes da soja (semente, eixo embrionário ou cotilédone) ficaram em contato sob agitação com o nitroprussiato de sódio (SNP), em diferentes concentrações (10, 25, 100 e 200 mM) e por diferentes períodos de tempo (5, 10, 15 e 20 h), conforme o experimento. Durante os tratamentos as partes da soja foram deixadas em erlenmeyers, cobertos com papel alumínio, que continham 10 mL da solução aquosa de SNP. Nos controles os tecidos foram tratados com água.

#### 3.2 - Preparo das amostras para identificação de isoflavonas por HPLC/MS

Após a aplicação do tratamento de indução das isoflavonas nas partes da soja, as amostras foram coletadas para extração de duas formas: somente a parte da soja sem o exsudato e somente o exsudato (solução aquosa). As extrações foram realizadas segundo método previamente descrito (Modolo et al., 2002) com modificações. Assim, as partes da soja ou os exsudatos passaram por uma extração líquido-líquido com metanol 80% (Merck, grau HPLC) na proporção 1:1, por 20 minutos, sob agitação. Em seguida, as soluções foram filtradas, o solvente foi evaporado e o precipitado armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ . No momento das análises por HPLC os extratos foram ressuspensos em 500  $\mu\text{L}$  de uma solução de metanol/ácido fórmico 5% (1:1). Os extratos foram filtrados em membrana Millipore de 0,22  $\mu\text{m}$  imediatamente antes da análise por HPLC-PDA-MS. Foram realizados em triplicata três experimentos independentes.

### *3.3 - Preparo das amostras para identificação de compostos fenólicos e ácidos orgânicos por HPLC/MS*

A extração dos compostos fenólicos foi realizada segundo Xu et al. (2007) com modificações. Partes da soja (triturado) e exsudato (solução aquosa) foram extraídos com 20 mL de acetona/água (50:50, v/v) por 12 horas sob agitação. Posteriormente foi realizada uma centrifugação a 3000 rpm por 15 min e o sobrenadante foi coletado, seco e armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  para análises posteriores por HPLC-PDA. Foram realizados em triplicata três experimentos independentes.

### *3.4 - Análise do conteúdo de compostos fenólicos totais dos extratos de soja*

O conteúdo de compostos fenólicos totais das amostras foi medido usando-se o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu com modificações (Sun et al., 2007). As quantificações foram feitas por espectrofotometria a 740 nm após duas horas no escuro da adição de 10  $\mu\text{L}$  do extrato no meio de reação (100  $\mu\text{L}$ ) que continha 50  $\mu\text{L}$  de folin (1:10) e 40  $\mu\text{L}$  de  $\text{CaCO}_3$  4%. As quantificações foram determinadas por curvas de calibração de quercetina e ácido gálico. Foram realizados em triplicata três experimentos independentes.

### *3.5 - Identificações de isoflavonas contidas nos extratos*

Para a identificação das isoflavonas foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência constituído de um sistema de bombeamento binário LC-20AD (Shimadzu), com sistema de injeção "Rheodyne" de 20  $\mu\text{L}$ , forno de colunas e detectores de arranjo de diodos (PDA) (Shimadzu) e de massas Esquire 4000 (Bruker Daltonik). A fonte empregada para a ionização foi elétron spray operando nos modos positivo e negativo com as condições gerais: gás de arraste  $325^{\circ}\text{C}$ , fluxo 11 L/min, nebulizador 60 psi e scan entre 50 e 1000  $m/z$ . Os parâmetros de ionização otimizados no modo positivo foram: voltagem do capilar -2500 V, voltagem prato offset -500 V, capilar de saída 70 V, skim 1 20 V, skim 2 10 V. No

modo negativo utilizou-se: voltagem do capilar -2500 V, voltagem prato offset -500 V, capilar de saída -74 V, skim 1 -36,6 V, skim 2 -6,0 V.

Para a separação das isoflavonas empregou-se uma coluna de fase reversa C<sub>18</sub> Phenomenex (250 x 4,6 mm com tamanho de partícula de 5 µm) e como fase móvel utilizou-se um gradiente linear de metanol/5% ácido fórmico (v/v) iniciando com proporção 15:85 passando para 80:20 em 25 minutos, mantendo essa proporção por 15 minutos. O fluxo foi mantido em 0,9 mL/min e a temperatura da coluna em 32 °C. Empregou-se um divisor de fluxo que manteve a entrada de amostra no espectrômetro de massas em 0,17 mL/min. Os espectros foram obtidos entre 200 e 600 nm e os cromatogramas foram processados a 300 nm devido a maior absorção dos flavonóides se encontrarem entre 245 e 315 nm.

As isoflavonas foram identificadas considerando-se os seguintes parâmetros: comparação da ordem de eluição em coluna C<sub>18</sub> com dados da literatura (Lin e Harnly, 2007; Lin et al., 2000), co-eluição com padrões e características dos espectros UV-visível e de massas (íon molecular e fragmentos) (Lin e Harnly, 2007; Lin et al., 2000). Para confirmação da identificação, padrões de isoflavonas (genistina, daidzina, genisteína, daidzeína, gliciteína e glicitina) provenientes da Sigma Aldrich foram utilizados.

### *3.6 - Identificação da produção de compostos fenólicos e ácidos orgânicos.*

A separação dos compostos fenólicos foi feita segundo Hvattum (2002) com modificações. Foi empregada uma coluna C<sub>18</sub> de fase reversa Shimadzu ODS (250 x 4,6 mm com tamanho de partícula de 5 µm). A fase móvel foi composta de um gradiente entre uma solução de ácido fórmico 0,5 % (A) e uma de metanol/0,5% ácido fórmico - v/v (B): nos primeiros 10 min – 99% de A; nos próximos 5 min – 95% de A; nos próximos 15 min 80% de A; seguido por 15 min de 40% de A; e mais 15 min de 20% de A; nos próximos 10 min 5% de A; por fim 10 min de condicionamento com 99% de A. O tempo total de corrida foi 70 min. O fluxo do gradiente foi 0,9 ml/min e a temperatura do forno da coluna foi de 32 °C. Para a confirmação dos compostos fenólicos as amostras foram submetidas à

espectrometria de massas. A fonte empregada para a ionização foi elétron spray operando no modo negativo com as condições gerais: gás de arraste 325 °C, fluxo 8 L/min, nebulizador 30 psi e scan entre 100 e 800 *m/z*. Os parâmetros de ionização otimizada no modo negativo foram: voltagem do capilar 1500 V, voltagem prato offset -500 V, capilar de saída -105,1 V. Os compostos fenólicos e ácidos orgânicos foram analisados no comprimento de onda de 278 nm. Os padrões (Sigma Aldrich – grau HPLC) utilizados para identificação dos compostos fenólicos foram: ácido p-cumárico, ácido gálico, ácido hidroxibenzóico, ácido caféico, quercetina, epicatequina, rutina e kaempferol.

### *3.7 - Determinação da concentração de NO com eletrodo específico*

As concentrações de NO no meio de reação foram determinadas eletroquimicamente por meio do eletrodo ISO-NOP, associado a um sistema detector de radicais Apollo 4000 (World Precision Instruments, Sarasota, Florida) segundo Zhang (2004) com modificações. Para as verificações da geração de NO, alíquotas dos extratos de soja, dos padrões de flavonóides e dos outros compostos fenólicos foram adicionadas a 1 mL do meio de reação, numa câmara fechada NOCHM-4 (World Precision Instruments), a 25 °C, sob agitação constante. Para a determinação da redução de nitrito o meio de reação foi composto por KCl/HCl (0,1M) pH 2,0; tampão citrato/fosfato (0,1M) pH 3,5 ou tampão fosfato (0,1M) pH 5,0 ou 7,0. Os experimentos foram iniciados pela adição de nitrito ao meio de reação e, em seguida, alíquotas dos extratos ou dos padrões. Para as análises da atividade antinitrosativa, 1 µL do doador de NO DEA nonoato (0,6 mg/mL) foi adicionado ao meio de reação contendo 1 mL de tampão fosfato (0,1M) pH 7,0 e, após a estabilização do sinal, alíquotas dos extratos ou dos compostos isolados (padrões) foram adicionadas. As concentrações utilizadas de nitrito, dos compostos fenólicos, ácidos orgânicos e dos extratos de soja variaram conforme o experimento e são indicadas nas legendas das figuras. O eletrodo de NO foi calibrado aplicando-se concentrações conhecidas de S-nitroso-N-

acetilpenicilamina em  $\text{CuCl}_2$  (0,1 M). Foram realizados em triplicata três experimentos independentes.

### *3.8 - Determinação da concentração de NO por quimiluminescência*

A produção de NO foi adicionalmente medida usando-se um analisador quimiluminescente (modelo NOA, Sievers Instruments, Boulder, CO) segundo Augusto e colaboradores (2004) com modificações. O nitrito foi injetado em anaerobiose numa câmara fechada sob fluxo de  $\text{N}_2$  que continha 5 mL de volume final de meio de reação nos pHs 2,0, 3,5, 5,0 ou 7,0 (conforme descrito no item 3.7). Foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  dos extratos (35  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) ao meio de reação contendo nitrito (50 a 200  $\mu\text{M}$ ) e, após 10 min de incubação, o total de NO produzido foi avaliado. A quantidade de NO produzida foi quantificada por curvas de calibração a partir de diferentes volumes de uma solução saturada de NO (1,75  $\eta\text{mol}/\mu\text{L}$ ). Esta solução foi preparada por borbulhamento do gás NO em uma solução de tampão fosfato contida em um frasco vedado. A quercetina e a luteolina foram usadas como controle positivo. Estes ensaios foram conduzidos no Laboratório da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ohara Augusto, do Instituto de Química da USP. Foram realizados em triplicata três experimentos independentes.

### *3.9 - Determinação da produção de ânion superóxido*

A atividade contra ânions superóxido foi medida pelo método de Sun et al. (2007) com modificações. Brevemente, alíquotas (2 – 20  $\mu\text{L}$ ) dos extratos (35  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) ou os padrões daidzeína, gliciteína e genisteína (0,005 – 0,05  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) foram adicionadas a 300  $\mu\text{L}$  do meio de reação (1,3  $\mu\text{M}$  de riboflavina, 13 mM de metionina, 63  $\mu\text{M}$  de nitro blue tetrazolium (NBT) e 100  $\mu\text{M}$  de EDTA em 0,05 M de tampão fosfato pH 7,0). O controle foi feito com metanol (20  $\mu\text{L}$ ). As análises foram realizadas medindo-se a redução fotoquímica do NBT. A riboflavina excitada pela luz é reduzida pela metionina a semiquinona que doa um elétron para o oxigênio formar o ânion superóxido. Este converte o NBT em formazan roxo que é

detectado a 560 nm. Após 15 min sob iluminação a absorbância foi medida neste comprimento de onda. A atividade sequestrante foi calculada de acordo com a seguinte fórmula: Atividade sequestrante (%) = 1 - (absorbância da amostra/absorbância do controle) x 100. Foram realizados em triplicata três experimentos independentes.

### *3.10 - Cultura de células MCF-7 (tumor mamário) e células NIH 3T3 (Fibroblasto embrionário de camundongo)*

A linhagem celular MCF-7 de carcinoma mamário humano foi obtida da “American Type Culture Collection” (ATCC, Manassas, Estados Unidos da América; ATCC HTB-22). As células foram cultivadas em meio de cultura de RPMI contendo 10% (v/v) de soro fetal bovino e gentamicina (50 µg/mL), a 37 °C em atmosfera umidificada com 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram sub-cultivadas a cada 2 dias. Para tanto, o meio de cultura foi descartado e as células foram lavadas rapidamente com tampão PBS A para remoção de inibidores de tripsina presentes no soro bovino fetal. Foram adicionados 1,0mL de solução Tripsina-EDTA (0,25%) e as células foram observadas em microscópio invertido até ficarem dispersas (2-5 min) e, a seguir, foram adicionados 6,0 mL de meio RPMI. As células foram homogenizadas, aspiradas e transferidas para tubos e centrifugadas a 125 x g por 5 min. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em meio de cultura. Alíquotas da suspensão celular foram adicionadas a novos frascos de cultura e incubadas. A linhagem celular 3T3 foi obtida da “National Institutes of Health (NIH)”. As células foram cultivadas e repicadas da mesma forma descrita para as células MCF-7, entretanto, foi utilizado o meio DMEM (Dullbecco’s modified Eagle’s medium).

### *3.11 - Aplicação dos extratos e das isoflavonas nas culturas celulares*

Após o subcultivo de 10 x 10<sup>3</sup> células por 24 h em placas com 96 poços (200 µL de meio em cada poço), o meio de cultura foi removido e substituído

por novo meio (200  $\mu$ L/poço) contendo diferentes concentrações dos extratos (31 - 1000  $\mu$ g extrato por mL de meio de cultura). Para o preparo dos tratamentos, alíquotas dos extratos foram inicialmente secas por evaporação em banho-Maria e ressuspensas em DMSO 100%. As diferentes concentrações dos extratos foram diluídas no meio de cultura, mantendo-se a proporção de 0,25% DMSO. As células incubadas apenas com meio de cultura com 0,25% de DMSO foram consideradas como controle negativo. As células foram analisadas após 24, 48 e 72hs de incubação.

### *3.12 - Avaliação da citotoxicidade e da viabilidade celular*

A citotoxicidade foi determinada pelo ensaio de redução do MTT (Mosmann, 1983). A viabilidade celular foi obtida através do método da exclusão de células coradas pelo azul de Trypan 0,2% (Freshney, 1987) ou vermelho neutro (Popiołkiewicz et al., 2005). A análise dos ácidos nucleicos foi realizada após a do vermelho neutro, onde, a solução do corante é aspirada seguido de secagem dos recipientes celulares e adição de NaOH 1N. O recipiente celular permaneceu em estufa por 1 hora e após foi lido a 260 nm. Foram realizados em triplicata três experimentos independentes.

### *3.13 – Análise da emissão e da produção intracelular de NO*

O nível intra e extracelular de NO foi determinado usando o indicador fluorescente de NO (DAF-2DA e DAF-2, respectivamente) segundo Hamuro et al. (2002) com modificações, a saber: As células foram previamente submetidas aos tratamentos descritos anteriormente na presença e na ausência de 1mM de L-NAME (N (G)-nitro-L- arginina metil ester). Após os tempos de tratamento, as células foram incubadas com o meio de cultura contendo 2,5  $\mu$ M do indicador fluorescente de NO e 500  $\mu$ M de L-arginina por 1h a 37 °C. As células foram então coletadas por tripsinização (análise intracelular), lavadas duas vezes com PBS A e a intensidade de fluorescência foi medida por Fluorimetria (Hitachi F-

2500) com excitação de 488 nm e emissão de 530 nm. Nas análises extracelulares não houve a etapa de tripsinização nem lavagem com PBS A. Foram realizados em triplicata três experimentos independentes.

### *3.14 - Análise estatística*

Os dados obtidos para os experimentos realizados foram comparados por teste *t*-Student ou por análise de variância pelo teste ANOVA, seguido do teste de Tukey, quando  $p < 0,05$ .

## 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

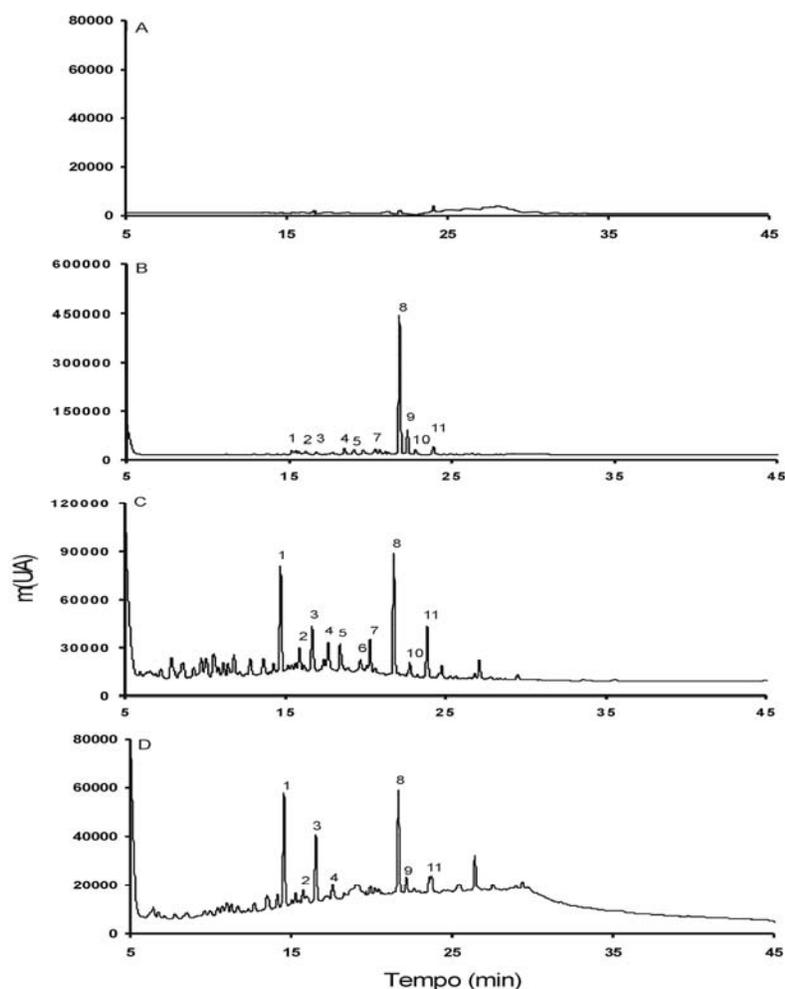
### 4.1 – *Obtenção de extratos de soja ricos em flavonóides agliconas*

Tendo em vista a já bem estabelecida atividade farmacoterapêutica dos flavonóides (Mccue e Shetty, 2004; Valachovicova et al., 2004), uma metodologia que seja simples, de baixo custo, rápida e eficiente na produção destes compostos pode ser uma ótima ferramenta no desenvolvimento de um produto de interesse comercial. Estes metabólitos (Figura 1) são naturalmente encontrados em sua maior parte nas suas formas glicosiladas. Entretanto, várias descrições na literatura indicam que são as formas livres (agliconas) dos flavonóides de soja (daidzeína, gliciteína e genisteína) que apresentam as maiores atividades farmacoterapêuticas (Setchell e Cassidy, 1999).

Com o objetivo de aumentar a proporção de flavonóides de soja (isoflavonas) na sua forma farmacologicamente ativa, partes da soja foram tratadas com nitroprussiato de sódio (SNP), um doador de NO, que em trabalhos anteriores de nosso grupo se mostrou bastante eficiente em ativar a produção de flavonóides em cotilédones destacados de plântulas de soja de 8-10 dias de idade (Modolo et al., 2002). No presente trabalho, procurou-se inicialmente avaliar a eficiência de tal tratamento em sementes não germinadas e intactas, já que a semente de soja corresponde à parte da planta onde ocorre o maior acúmulo de flavonóides (Park et al., 2001). Posteriormente duas diferentes partes que compõem a semente (eixo embrionário e o cotilédone), foram também testados, não perdendo assim, uma valiosa informação de qual parte da semente, tão importante para o processo reprodutivo da planta, seria mais eficiente na produção das formas ativas das isoflavonas. A Figura 3 apresenta o perfil cromatográfico e a Tabela 1 apresenta a concentração dos isoflavonóides que foram exsudados das partes da soja quando eliciados com 10 mM de SNP por 15 horas.

Para ampliar a confiabilidade das identificações das isoflavonas encontradas nas amostras analisadas e para auxiliar na identificação dos compostos  $\beta$ -conjugados a açúcares e a ácidos, os picos encontrados por HPLC

foram também submetidos à análise por espectrometria de massas (Figura 4 e Tabela 2). Como podem ser avaliados na Figura 4, os espectros de massas das isoflavonas apresentaram picos intensos das moléculas protonadas ( $[M+H]^+$ ), característica importante para a eficiente identificação do composto.

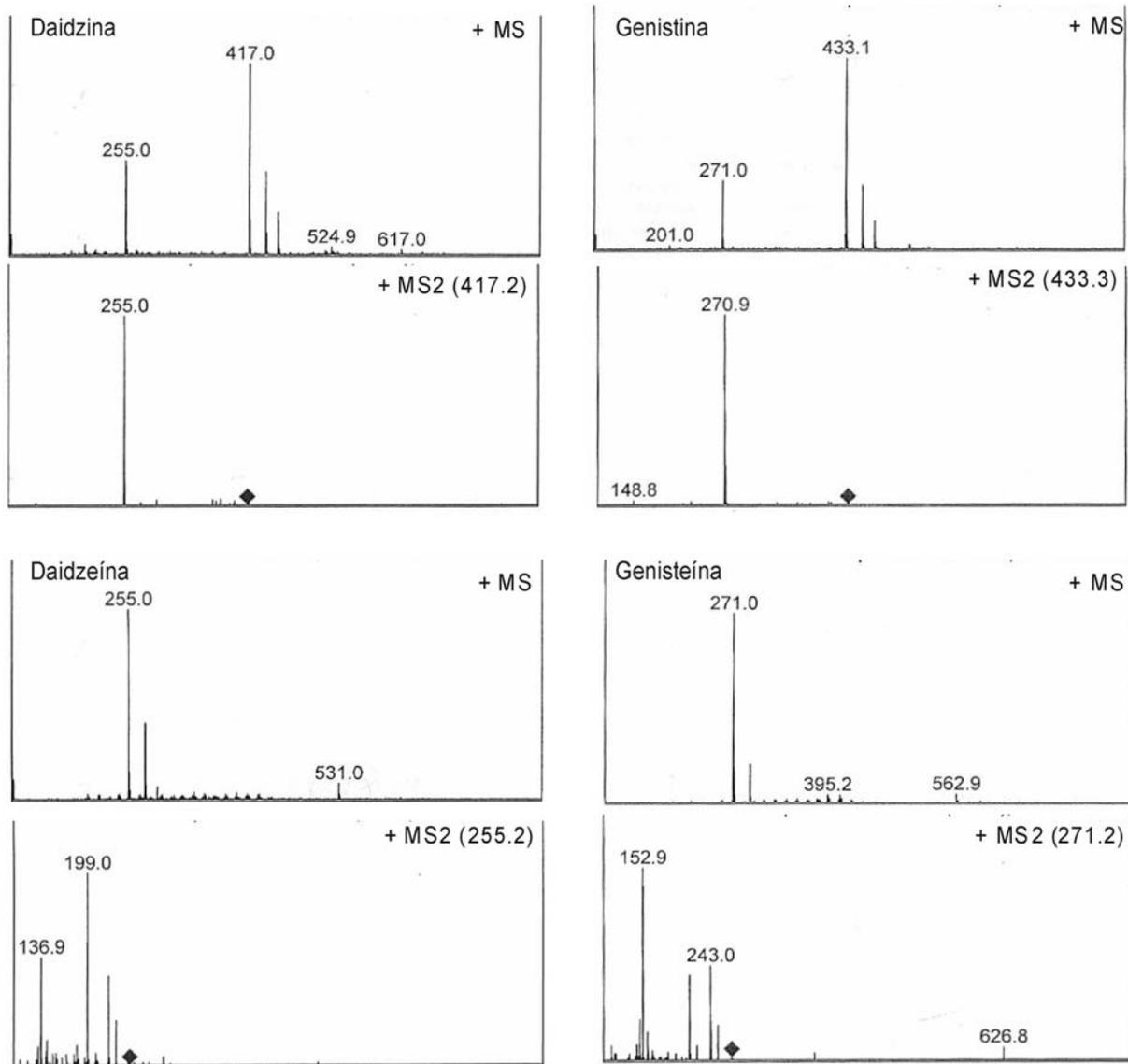


**Figura 3. Isoflavonóides exsudados de partes da soja tratadas com nitroprussiato de sódio (SNP).** Perfil obtido por cromatografia líquida de alta eficiência, acoplada à espectrometria de massas com uma coluna C18 de fase reversa. **(A)** Extrato de soja sem tratamento. Extrato de **(B)** eixo embrionário, **(C)** cotilédone e **(D)** semente tratados com SNP 10 mM por 15 horas. Processamento a 300 nm com detector de arranjo de diodos (PDA). 1: não identificado, 2: daidzina, 3: glicitina, 4: genistina, 5: malonil-daidzina, 6: malonil-glicitina, 7: malonil-genistina, 8: daidzeína, 9: gliciteína, 10: não identificado e 11: genisteína.

**Tabela 1.** Concentração dos isoflavonóides identificados em exsudatos de eixo embrionário, cotilédone e semente de soja eliciados com SNP.

Pico	Composto	$t_R$ (min) <sup>2</sup>	$\lambda_{max}$ (nm) <sup>3</sup>	µg do composto por g do extrato		
				Eixo embrionário	Cotilédone	Semente
1	não identificado	13,2	279, 308	–	–	–
2	daidzina	14,1	260, 300	13±1,1 <sup>a</sup>	8±3,5 <sup>b</sup>	3±0,088 <sup>c</sup>
3	glicitina	15,1	260, 317	15±1,3 <sup>a</sup>	13±3,1 <sup>a</sup>	13±1,3 <sup>a</sup>
4	genistina	16,3	260, 330	10±1,7 <sup>a</sup>	5±0,4 <sup>b</sup>	3±0,1 <sup>c</sup>
5	malonil-daidzina*	17,4	260, 300	60±1,5 <sup>a</sup>	1±0,1 <sup>b</sup>	n.d.
6	malonil-glicitina*	18,3	262, 318	45±1,8 <sup>a</sup>	7±0,4 <sup>b</sup>	n.d.
7	malonil-genistina*	19,2	261, 330	54±0,8 <sup>a</sup>	6±0,3 <sup>b</sup>	n.d.
8	daidzeína	20,1	260, 302	243±37 <sup>a</sup>	29±1,3 <sup>b</sup>	8±0,2 <sup>c</sup>
9	gliciteína	21,0	260, 319	210±11 <sup>a</sup>	14±2,2 <sup>b</sup>	3±0,1 <sup>c</sup>
10	não identificado	21,7	288, 335	–	–	–
11	genisteína	22,2	262, 330	32±3,5 <sup>a</sup>	18±1,7 <sup>b</sup>	3±0,4 <sup>c</sup>

\*Concentrações relativas às curvas de calibração das isoflavonas 2, 3 e 4; n.d. – não detectado;  $t_R$ : tempo de retenção; <sup>2</sup>Eluição em uma coluna C18 com forno a 32 °C; <sup>3</sup>Gradiente linear de Metanol/5% ácido fórmico. Os valores correspondem a concentração (µg do composto/g do extrato seco) dos compostos extraídos dos exsudatos de partes da soja tratados com 10 mM de SNP por 15 horas (50 unidades de partes da soja/10 mL) cuja extração foi realizada por 20 minutos em metanol e analisados a 300 nm por HPLC-PDA-MS/MS. A média e os desvios padrões das análises de três experimentos independentes estão apresentados: letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes (p<0,01).



**Figura 4. Análise dos padrões de isoflavonas por HPLC-PDA-MS/MS.** Espectro completo de MS (+MS) e espectro de fragmentação MS-MS (+MS2) dos picos principais que apareceram em amostras puras de daidzina, genistina, daidzeína e genisteína, conforme indicado.

**Tabela 2.** Características de massas das isoflavonas dos extratos de soja, obtidas por HPLC-PDA-MS/MS.

pico <sup>a</sup>	Composto	[M+H] <sup>+</sup> ( <i>m/z</i> )	[MS/MS] <sup>+</sup> ( <i>m/z</i> )	[M-H] <sup>-</sup> ( <i>m/z</i> )	[MS/MS] <sup>-</sup> ( <i>m/z</i> )
1	não identificado	561	369, 207	559	517, 499, 427, 367, 205
2	daidzina	417	255	415	253
3	glicitina	443	285	445	283
4	genistina	433	271	431	269
5	malonil-daidzina	503	255	501	253
6	malonil-glicitina	533	285	531	283
7	malonil-genistina	519	271	517	269
8	daidzeína	255	237, 227, 199, 137	253	237, 225, 209, 181
9	gliciteína	285	267, 225, 197, 145	283	268, 241
10	não identificado	n.d.	n.d.	271	253, 227, 177, 151
11	genisteína	271	253, 243, 215, 153	269	253, 227, 196, 181

<sup>a</sup>Numerado de acordo com a Tabela 1.

Além disso, os espectros MS/MS das agliconas (picos 8, 9 e 11) protonadas ([M+H]<sup>+</sup>) e desprotonadas ([M-H]<sup>-</sup>) apresentaram fragmentos característicos devido a perdas consecutivas de água, CO e CO<sub>2</sub> (*m/z* 237, 268 e 253 respectivamente) (Tabela 2). Para as isoflavonas glicosiladas (picos 2, 3 e 4) os espectros MS/MS mostraram os fragmentos correspondentes às agliconas daidzeína (*m/z* 255/253), gliciteína (*m/z* 285/283) e genisteína (*m/z* 271/269), referentes a perda de hexose (162 u). No caso das isoflavonas aciladas (picos 5, 6 e 7), o MS/MS também apresentou os fragmentos característicos das agliconas, devido a perda de hexose + ácido malônico (248 u).

Os resultados mostram que o eixo embrionário, em função da produção das formas agliconas, foi a parte da soja que forneceu o melhor resultado por g de extrato (500 µg/g). A daidzeína foi o flavonóide de maior concentração nas partes analisadas, correspondendo em µg/g a 243, 29 e 8 no eixo embrionário, no cotilédone e na semente respectivamente (Tabela 1). A daidzeína apresentou uma porcentagem relativa de 52% no eixo embrionário, 35% no cotilédone e 30% na semente (Tabela 3). A genisteína foi produzida em maior proporção no cotilédone (14%) em relação aos extratos da semente (6%) e do eixo embrionário (4%). Já em valores por g de extrato, a maior concentração ocorreu no eixo embrionário com 32 µg/g contra 20 µg/g no cotilédone e 3 µg/g na semente. Comparando-se a produção de isoflavonas β-conjugados a açúcares, o eixo embrionário e o cotilédone forneceram uma menor proporção relativa destes compostos (15%), em relação à semente (23%). Analisando-se os valores por grama do extrato, o cotilédone produziu a maior concentração de isoflavonas β-conjugados quando comparado com as outras partes. Mesmo assim é notável a observação de que o tratamento induziu em todas as partes testadas (eixo embrionário, cotilédone e semente), uma alta proporção de isoflavonas agliconas, conforme mostrado na Tabela 1 e Figura 3. Entretanto é importante ressaltar que o cotilédone apresenta uma massa que é a metade da massa da semente e 10 vezes maior que a do eixo embrionário, logo, quando se avalia a produção por unidade, o cotilédone passa a possuir o melhor rendimento na produção de daidzeína e genisteína (2,05 e 1,3 µg/unidade respectivamente). De uma forma geral o eixo embrionário se mostra bem produtivo em relação às formas ativas dos flavonóides (agliconas), fato este que pode ser comprovado pelo melhor rendimento percentual e também pela maior concentração de agliconas por mg das partes da soja analisadas, além do melhor rendimento de gliciteína por unidade (1,47 µg /unidade de tecido).

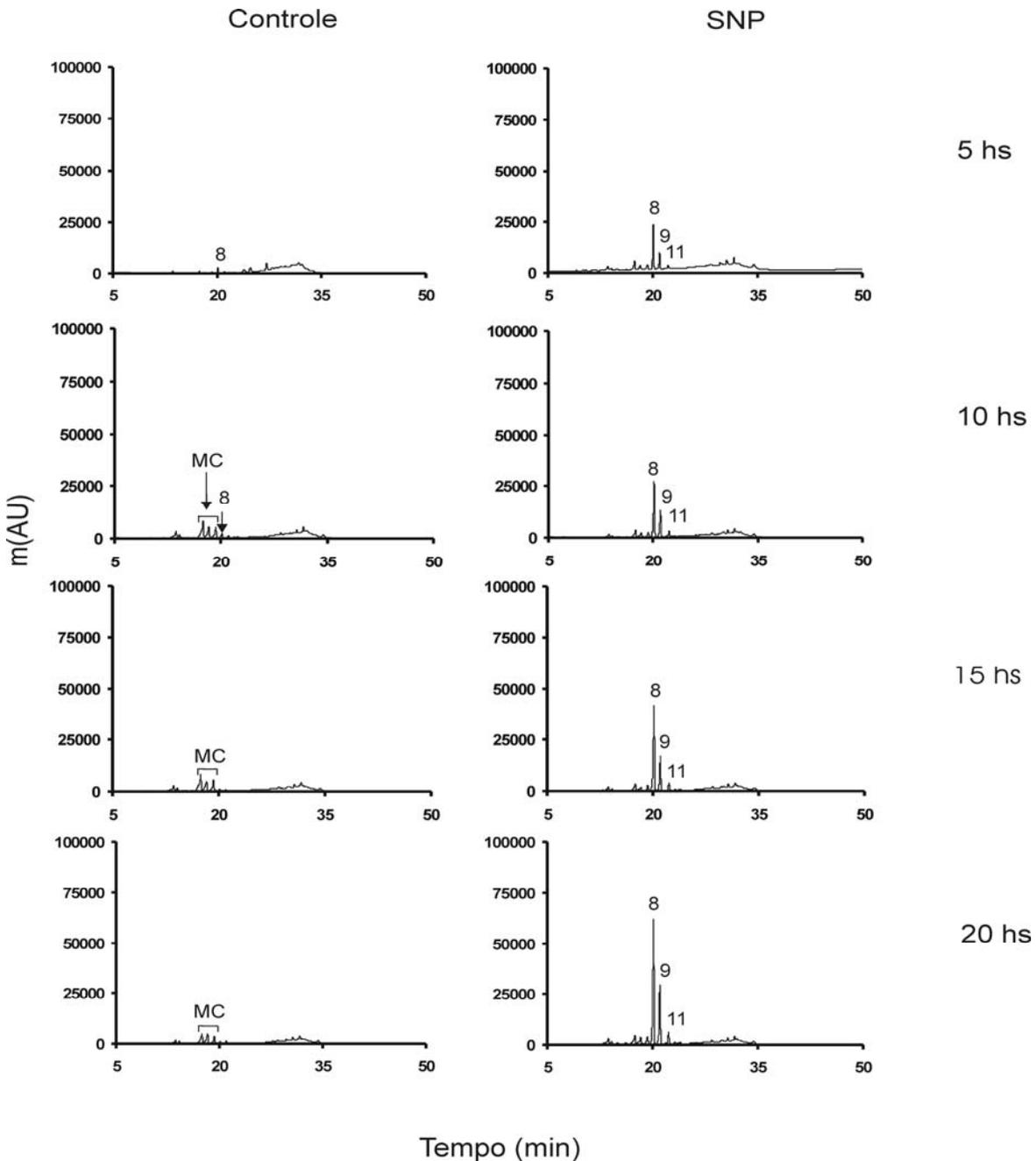
A cinética de produção de flavonóides em função do tempo de tratamento com SNP foi avaliada nos eixos embrionários, já que estes apresentaram a melhor resposta em termos de produção de isoflavonas agliconas. O mesmo procedimento experimental descrito anteriormente foi aplicado, variando-se os tempos de exposição ao tratamento com SNP (10mM), que foram: 5, 10, 15 e 20

horas. Nestes mesmos tempos foi feito simultaneamente um grupo controle, sem SNP, garantindo que o estresse hídrico (solução aquosa), ou mecânico (agitação) não produzisse falsos resultados positivos. Como pode ser avaliada na Figura 5 pelo perfil cromatográfico dos extratos, a produção de flavonóides aumentou com o tempo de tratamento, sendo que, o tempo de 20 horas foi o que se mostrou mais efetivo quanto à quantidade de agliconas produzidas.

**Tabela 3.** Contribuição, em termos de área e de porcentagem relativa, das isoflavonas identificadas nos extratos de soja.

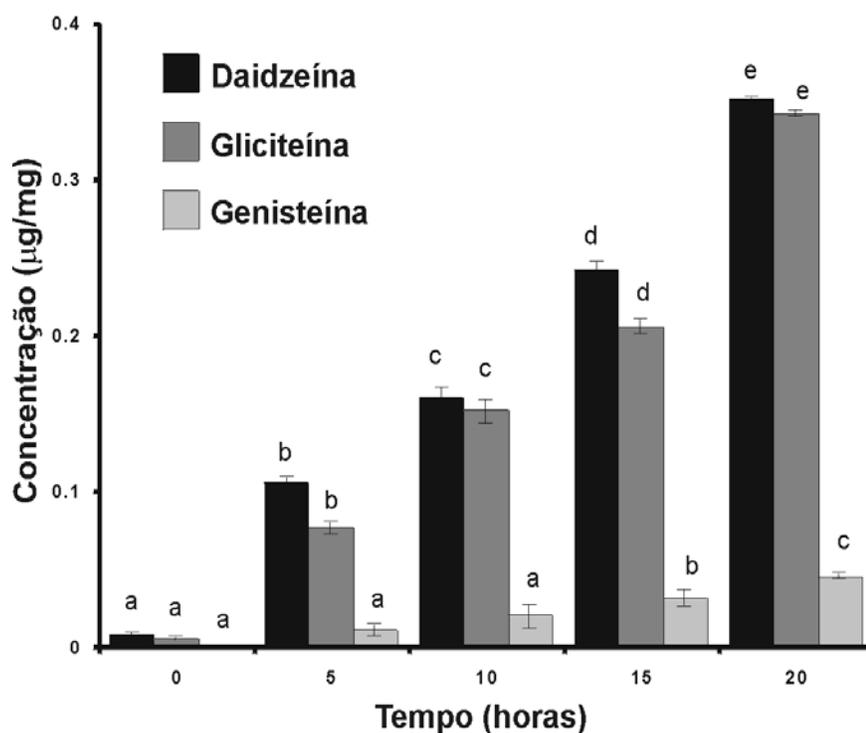
Pico	Compostos	E.Embrionário <sup>1</sup>	Cotilédone <sup>1</sup>	Semente <sup>1</sup>
1	não identificado	–	–	–
2	daidzina	2 ± 0,17% <sup>a</sup>	4,7 ± 0,21% <sup>b</sup>	5,8 ± 0,17% <sup>c</sup>
3	glicitina	2 ± 0,18% <sup>a</sup>	4,4 ± 1,05% <sup>b</sup>	1,8 ± 0,18% <sup>a</sup>
4	genistina	1 ± 0,18% <sup>a</sup>	1,9 ± 0,16% <sup>b</sup>	3,6 ± 0,16% <sup>c</sup>
5	malonil-daidzina	3,5 ± 0,09% <sup>a</sup>	1,3 ± 0,14% <sup>b</sup>	n.d.
6	malonil-glicitina	3,4 ± 0,13% <sup>a</sup>	0,5 ± 0,003% <sup>b</sup>	n.d.
7	malonil-genistina	3,6 ± 0,06% <sup>a</sup>	2,5 ± 0,13% <sup>b</sup>	n.d.
8	daidzeína	52 ± 0,86% <sup>a</sup>	35 ± 1,6% <sup>b</sup>	30 ± 0,83% <sup>c</sup>
9	gliciteína	14 ± 0,74% <sup>a</sup>	7,9 ± 1,2% <sup>b</sup>	4,9 ± 0,19% <sup>c</sup>
10	não identificado	–	–	–
11	genisteína	4 ± 0,43% <sup>a</sup>	14 ± 1,4 % <sup>b</sup>	6 ± 0,8% <sup>a</sup>
A	acetil-daidzina	n.d.	n.d.	n.d.
B	acetil-glicitina	n.d.	n.d.	n.d.
C	acetil-genistina	n.d.	n.d.	n.d.

<sup>1</sup>Área absoluta (porcentagem relativa); n.d. – não detectado; E. – Eixo; a, b, c correspondem aos β-conjugados ácidos (acetil) daidzina, glicitina e genistina respectivamente. Os valores correspondem à porcentagem dos compostos extraídos dos exsudatos de partes da soja tratadas com 10 mM de SNP por 15 horas (50 unidades/10 mL) cuja extração foi realizada por 20 minutos em metanol e analisados a 300 nm por HPLC-PDA-MS/MS. A média e os desvios padrões das análises de três experimentos independentes estão apresentados: letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes (p<0,05).



**Figura 5. Isoflavonóides produzidos pelos eixos embrionários de soja em resposta ao tratamento com SNP: efeito do tempo de eliciação.** Os eixos embrionários foram eliciados com uma solução aquosa (controle) ou com 10mM de SNP (50 unidades/10 mL). Após os tempos referidos as partes foram descartadas, os flavonóides dos exsudatos foram extraídos com metanol 80% e analisados a 300 nm por HPLC. (MC) Isoflavonas Malonil-Conjugadas; (8) Daidzeína, (9) Gliciteína e (11) Genisteína, numeradas de acordo com a Tabela 1.

Assim, a quantificação das agliconas mostrou que no período de cinco horas obteve-se aproximadamente 7  $\mu\text{g}$  de agliconas por mL de exsudato, valor que se elevou para 26  $\mu\text{g}/\text{mL}$  após 20 horas de tratamento. Estas quantidades, quando expressas em  $\mu\text{g}$  de agliconas produzidas por mg das partes da soja, correspondem a uma produção 0,19  $\mu\text{g}/\text{mg}$  e 0,74  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , após 5h e 20h, respectivamente (Figura 6).



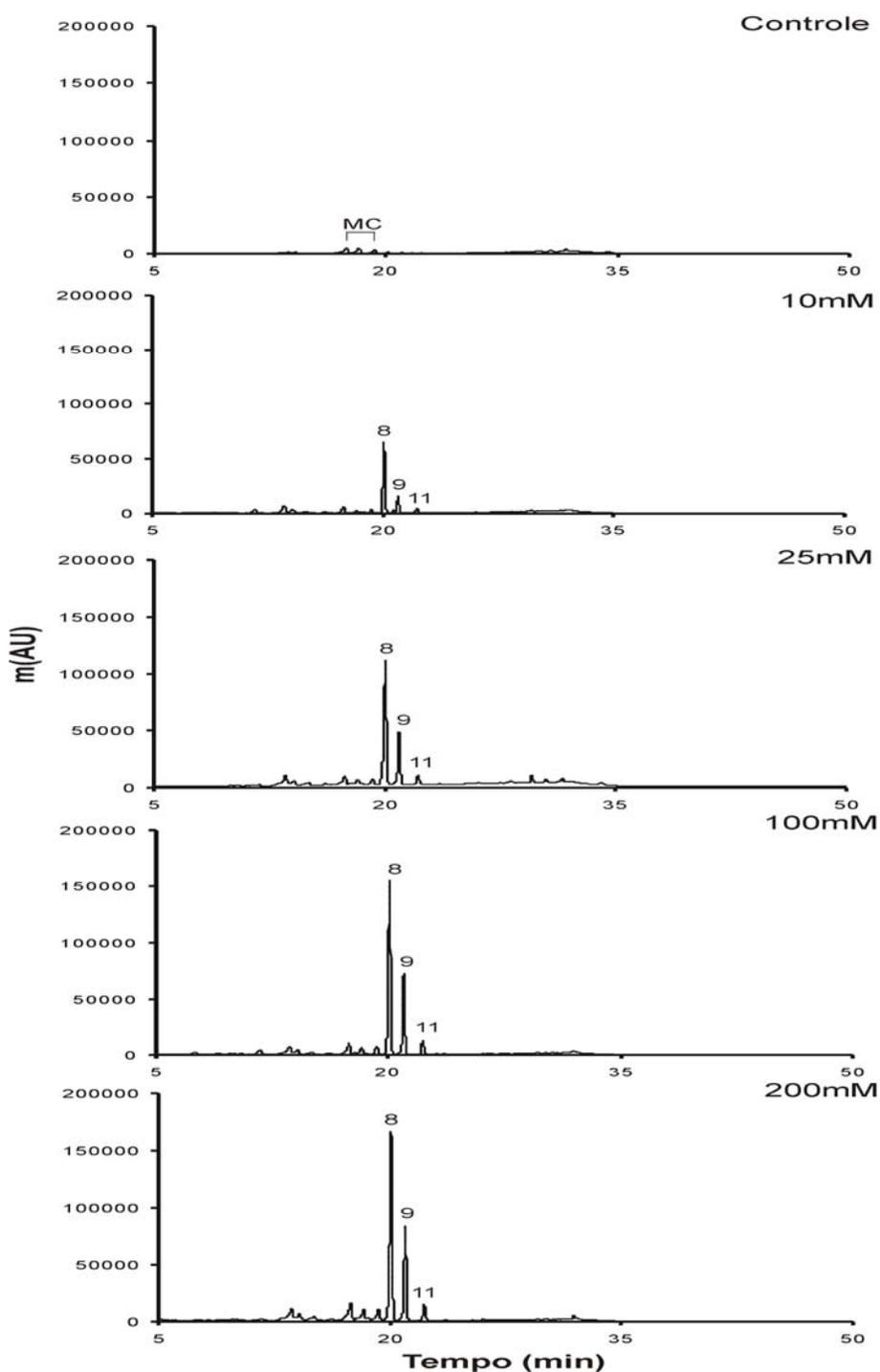
**Figura 6. Quantificação de isoflavonas agliconas produzidas a partir de eixos embrionários de soja em resposta ao eliciador por diferentes períodos.** A quantidade de agliconas produzidas por mg das partes expostas a 10mM SNP (50 unidades/10 mL solução) foi determinada a partir de curvas de calibração para daidzeína, gliciteína e genisteína. A média e os desvios padrões das análises de três experimentos independentes estão apresentados: para cada composto, barras com letras diferentes são significativamente diferentes ao nível de 0,01 (daidzeína, gliciteína) e 0,05 (genisteína).

Como pode ser ainda avaliado na Figura 5, o SNP favorece quase exclusivamente a formação das formas agliconas nos eixos embrionários de soja, enquanto que nos controles (sem tratamento com SNP), a produção das formas agliconas não é detectada, o que torna a metodologia bastante promissora na produção de compostos de interesse terapêutico. Isso confirma o que já fora anteriormente relatado (Modolo et al., 2002) que o NO está envolvido no mecanismo de resposta de defesa da soja e que o acúmulo de isoflavonas, pelo menos nas primeiras 20 horas, é diretamente proporcional ao tempo de exposição ao indutor (SNP). Segundo observações anteriores (Delledonne et al., 1998) o acúmulo de flavonóides de defesa em plantas, está relacionado com a ação do NO na via metabólica dos fenilpropanóides, principalmente na atividade da PAL.

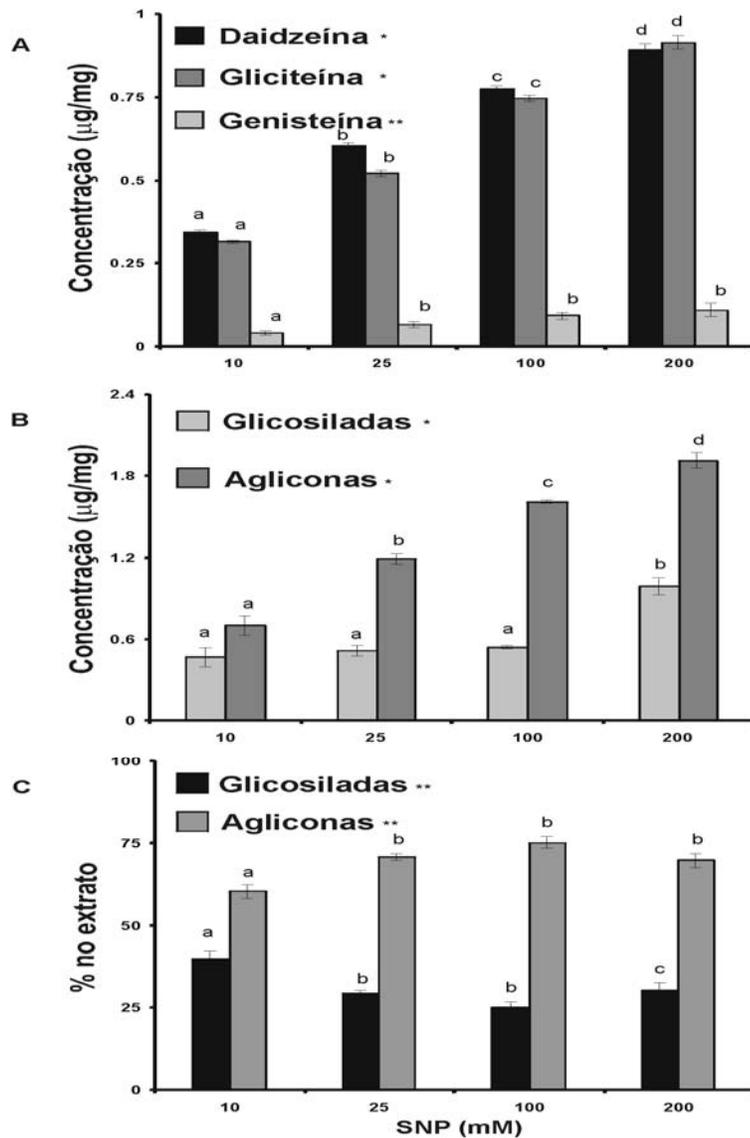
Além do tempo de tratamento, o efeito da concentração do eliciador na produção das formas agliconas das isoflavonas de soja foi avaliado. Quatro concentrações de SNP (10, 25, 100 e 200 mM) foram testadas no melhor tempo para a indução das formas agliconas, que foi de 20 horas (Figuras 5 e 6). O perfil cromatográfico dos extratos (Figura 7) mostra que a produção das formas agliconas é estimulada com o aumento da concentração do indutor. As concentrações de agliconas por mg de extrato (exsudado na solução) foram de 0,34 µg daidzeína/mg, 0,31 µg gliciteína/mg e 0,04 µg genisteína/mg, quando os eixos embrionários foram estimulados com 10mM de SNP e de 0,9, 0,91 e 0,11 µg/mg de extrato, respectivamente, quando expostos a 200mM de SNP (Figura 8A). Entretanto, pode-se perceber (Figura 8B) que no tratamento com 200 mM de SNP, apesar de haver uma maior concentração de daidzeína, gliciteína e genisteína e, assim, de agliconas totais (1,92 µg/mg de extrato), há uma queda percentual na relação de agliconas (69,6%) em relação aos seus conjugados (30,1%) (Figura 8C) comparado com 100 mM de SNP (75%). Tendo em vista que esta proporção, para o objetivo do trabalho também apresenta relevância, foi concluído que na concentração de 100 mM de SNP houve a melhor resposta dos eixos embrionários de soja (1,61 µg de agliconas/mg tecido). Levando em consideração esta análise e, sabendo que estas diferentes formas agliconas possuem diferentes caminhos metabólicos de produção na soja, diferentes

concentrações de SNP poderiam gerar individualmente melhores proporções de cada uma destas agliconas. Como visto na Figura 8A, a gliciteína se acumulou em maior quantidade (0,91 µg/mg) quando se utilizou 200 mM de SNP, enquanto que, com 100 mM houve melhor produção da daidzeína (0,8 µg/mg). É importante salientar que nos controles (sem tratamento com SNP) a produção total de isoflavonas foi bem menor, obtendo-se após 20h de tratamento (solução aquosa) 0,3 µg/mg tecido, 95% na forma de malonil-conjugada.

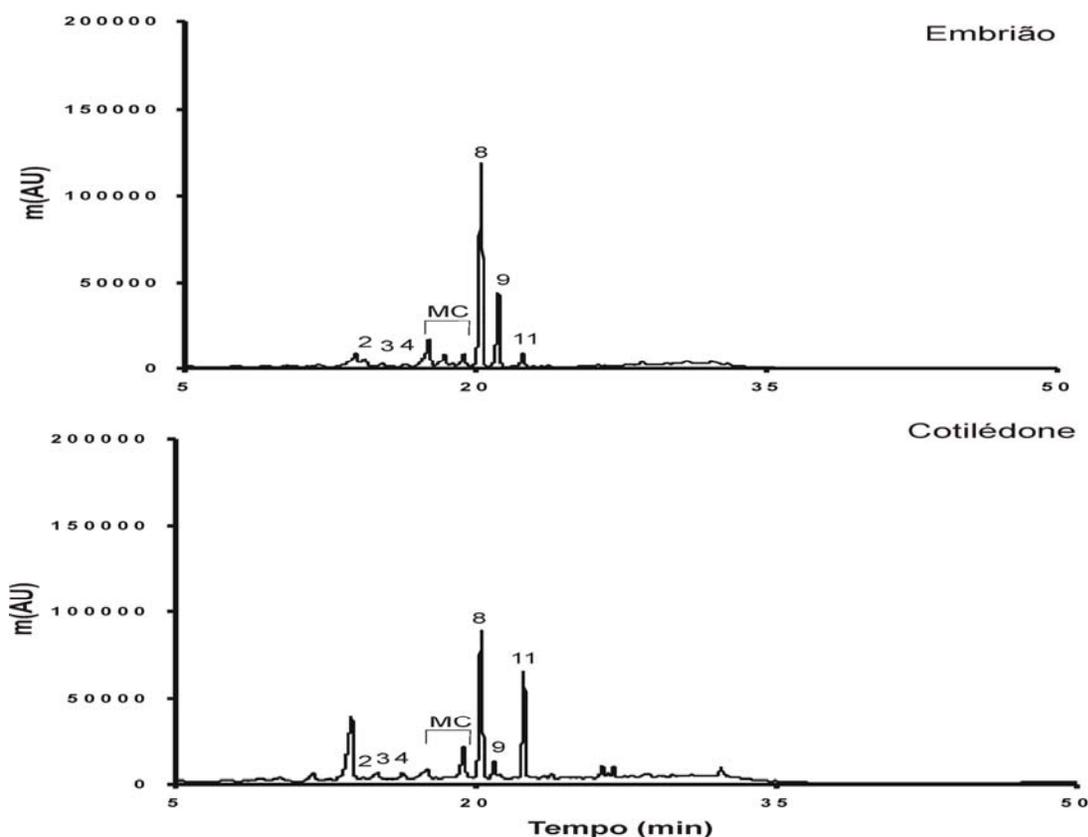
Considerando que a eliciação de eixos embrionários com 100 mM de SNP por 20 horas produziu o melhor rendimento proporcional de formas agliconas, este tratamento foi utilizado para comparar as respostas entre os eixos embrionários e os cotilédones. O perfil cromatográfico obtido dos exsudatos é apresentado na Figura 9 e a quantificação dos compostos identificados é apresentada na Tabela 4. Conforme pode ser avaliado, em relação às agliconas, houve maior produção de genisteína pelo cotilédone (16,3 µg/mL de exudato) do que pelo eixo embrionário (3,2 µg/mL). Entretanto no exsudato do eixo embrionário houve maior acúmulo das agliconas daidzeína (27,1 µg/mL) e gliciteína (26,1 µg/mL). Ainda, é importante salientar que, mesmo nas análises por unidade, o eixo embrionário se mostra mais eficaz na produção de daidzeína (5,6 µg/ por unidade) e gliciteína (4,9 µg/unidade) enquanto que o cotilédone apresenta um melhor rendimento de genisteína (3,3 µg/unidade). Logo, pode-se realmente concluir que, dependendo do produto a ser produzido, diferentes partes da soja e/ou formas de indução podem oferecer melhores rendimentos. Com relação às quantidades proporcionais das isoflavonas, também o eixo embrionário apresenta uma superior concentração de daidzeína (49%) e gliciteína (22%) em relação ao cotilédone. Já o cotilédone apresenta maior concentração de genisteína (26%) e das formas β-conjugadas (28%) (Tabela 4). As análises gerais destes resultados mostram que o eixo embrionário induzido com 100 mM de SNP por 20 horas é a melhor fonte dentre as analisadas para a produção de isoflavonas livres, pois apresentou no geral um melhor rendimento proporcional (Tabela 4).



**Figura 7. Indução, dose-dependente por SNP, da produção de agliconas em eixos embrionários de soja.** Os eixos embrionários foram tratados com as concentrações de SNP indicadas, por 20 horas, no escuro. Após o período o conteúdo dos extratos foi analisado a 300nm por HPLC. 8: daidzeína, 9: gliciteína, 11: genisteína e (MC) isoflavonas malonil-conjugadas.



**Figura 8. Quantificação de isoflavonas agliconas produzidas a partir de extratos de eixos embrionários de soja em resposta a diferentes concentrações de SNP.** O tratamento realizou-se com 50 unidades mergulhados em 10mL de solução eliciadora por 20 horas, sob agitação e na ausência de luz. **(A)** Concentração das isoflavonas agliconas; **(B)** Concentração total de agliconas e glicosiladas; **(C)** Porcentagem relativa de isoflavonas agliconas e glicosiladas em relação ao total de isoflavonas analisadas (conjugadas + livres). A média e os desvios padrões das análises de três experimentos independentes estão apresentados: para cada grupo de compostos, barras com letras diferentes são significativamente diferentes ao nível de 0,01(\*) e 0,05 (\*\*).



**Figura 9. Cromatogramas obtidos por HPLC-PDA dos exsudatos de eixos embrionários e cotilédones de soja tratados por 20 horas com uma solução aquosa de 100 mM de SNP, sob agitação no escuro. Numerado de acordo com a tabela 1; (MC) Isoflavonas malonil-conjugadas.**

Nos resultados acima descritos, o processo de extração foi feito utilizando-se apenas o exsudato, como descrito por Modolo et al. (2002). De acordo com alguns autores, principalmente Bajer e colaboradores (2007), a forma da extração pode influenciar o resultado final da composição dos extratos. Com base nesta informação, o processo de extração foi feito utilizando-se apenas as partes da soja ou apenas os exsudatos. Conforme mostrado na Figura 10, quando o processo extrativo envolveu o exsudato, o rendimento na produção das isoflavonas agliconas foi de aproximadamente 75% em relação às formas conjugadas, como já observado anteriormente (Figura 8C).

**Tabela 4.** Análise dos compostos presentes nos extratos de eixo embrionário e cotilédone de soja tratados com 100mM de SNP por 20h e analisados por HPLC-PDA.

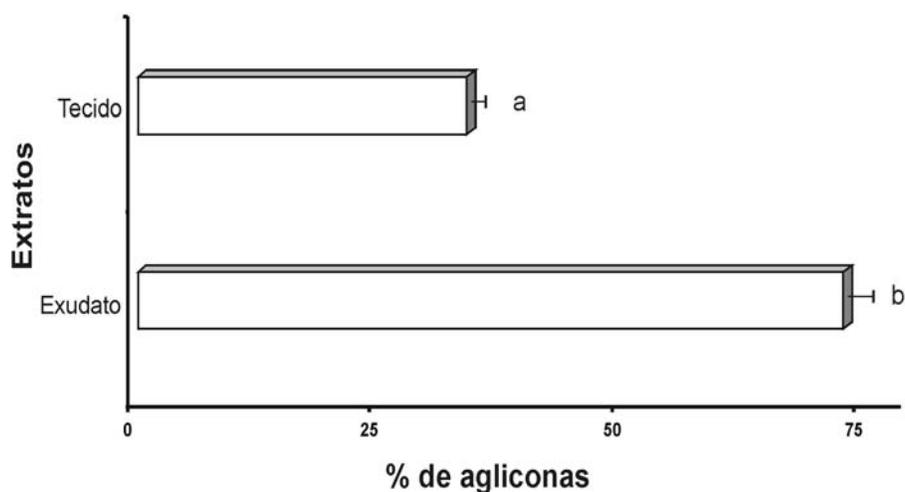
Pico	Composto	% composição <sup>1</sup>		Concentração (µg/mL)	
		E. embr. <sup>2</sup>	Cotilédone	E. embr. <sup>2</sup>	Cotilédone
1	não identificado	*	*	**	**
2	daidzina	2 ± 0,9 <sup>a</sup>	0.5 ± 0,1 <sup>a</sup>	2,15 ± 0,96 <sup>a</sup>	0,34 ± 0,07 <sup>b</sup>
3	glicitina	1 ± 0,6 <sup>a</sup>	4 ± 0,2 <sup>b</sup>	2,0 ± 1,14 <sup>a</sup>	4,4 ± 0,22 <sup>a</sup>
4	genistina	1 ± 0,7 <sup>a</sup>	3 ± 0,5 <sup>a</sup>	1,7 ± 1,2 <sup>a</sup>	3,8 ± 0,63 <sup>a</sup>
5	malonil-daidzina	*	*	**	**
6	malonil-glicitina	*	*	**	**
7	malonil-genistina	*	*	**	**
8	daidzeína	49 ± 4 <sup>a</sup>	40 ± 3 <sup>a</sup>	27,1 ± 2,21 <sup>a</sup>	16,48 ± 1,23 <sup>b</sup>
9	gliciteína	22 ± 2 <sup>a</sup>	5 ± 1 <sup>b</sup>	26,1 ± 2,3 <sup>a</sup>	4,34 ± 0,09 <sup>b</sup>
10	não identificado	*	*	**	**
11	genisteína	4 ± 1 <sup>a</sup>	26 ± 3 <sup>b</sup>	3,2 ± 0,84 <sup>a</sup>	16,34 ± 1,9 <sup>b</sup>

<sup>1</sup>Média percentual relativa; <sup>2</sup>Eixo embrionário. \*O percentual aproximado destes compostos (1, 5, 6, 7 e 10) somados no extrato é de 21% no eixo embrionário e 21,5% no cotilédone. \*\* A soma dos valores calculados (1, 5, 6, 7 e 10) em função da daidzina são, em µg/mL: 22,5 para o eixo embrionário e 17,15 para o cotilédone. Os valores correspondem a 50 eixos embrionários ou 50 cotilédones de soja tratados com 100 mM de SNP por 20 horas cuja extração foi realizada por 20 minutos em metanol e analisados por HPLC-PDA. A média e os desvios padrões das análises de três experimentos independentes estão apresentados: em cada análise as letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes (p<0,01).

Quando foi feita a extração somente das partes da soja o rendimento foi bem inferior (34%). Estes resultados mostraram que, as formas agliconas se encontram

em sua grande parte no exsudato. Isso provavelmente se deve à resposta de defesa da soja, lançando no meio os agentes de defesa (flavonóides). A extração do exsudato torna o processo bem mais simples, em relação aos processos normalmente utilizados na indústria, onde a extração dos flavonóides é feita a partir de grãos de soja.

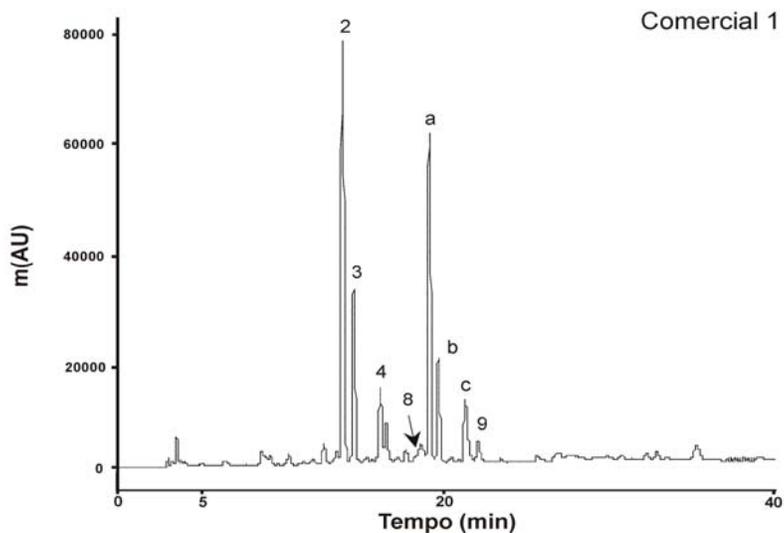
Segundo Griffith (2001), 5 minutos de contato com solvente orgânico são suficientes para extrair os flavonóides de um extrato de soja. Assim, o tempo utilizado de 20 minutos foi considerado suficiente para garantir uma boa extração. Desta forma, o tratamento padrão para preparar os extratos de soja enriquecidos de formas agliconas consistiu em: incubação de 50 unidades das partes da soja analisadas em 10mL de uma solução de SNP 100 mM, sob agitação no escuro; após 20 horas de incubação, extração dos flavonóides com metanol 80% sob agitação por 20 minutos, utilizando o exsudato, seguido por filtração e secagem da amostra.



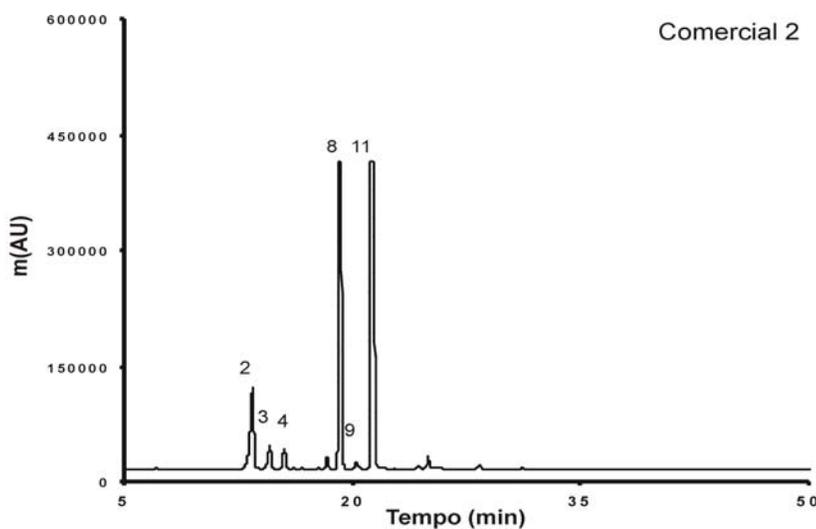
**Figura 10. Porcentagem relativa de isoflavonas agliconas em relação ao total de isoflavonas analisadas nas diferentes extrações: somente a parte da soja e somente o exsudato.** Eixos embrionários eliciados com 100 mM de SNP por 20 horas. Após este período os tecidos ou o exsudato foram extraídos com metanol 80% por 20 minutos sob agitação, seguido de filtragem e secagem. As amostras foram ressuspensas, filtradas novamente e analisadas por HPLC a 300nm. A média e os desvios padrões das análises de três experimentos independentes estão apresentados ( $p < 0,01$ ).

#### **4.2 - Conteúdo de flavonóides agliconas dos extratos de soja em relação ao de produtos comerciais**

Visando comparar a eficiência do tratamento utilizado no preparo dos extratos de soja com produtos já existentes no mercado, duas amostras comerciais foram extraídas e analisadas. Os resultados são apresentados nas Figuras 11 e 12 e comparados na Tabela 5. Como pode ser observado na Figura 11, as quantidades de isoflavonas agliconas são praticamente insignificantes no produto comercial 1, onde observa-se maior porcentagem das isoflavonas conjugadas a açúcares ou a ácidos (acetil). A conjugação com grupos acetil é bem comum em processos industriais de manufatura de alimentos ricos em isoflavonas (Griffith et al., 2001). O percentual relativo das agliconas neste produto está em torno de 5% (Tabela 5), bem inferior ao menor rendimento percentual de agliconas (71%), obtido quando os cotilédones foram eliciados com SNP (100 mM). Por outro lado, a análise do produto comercial 2 rico em isoflavonas (Figura 12) indica um rendimento percentual de agliconas em torno de 80% em relação às isoflavonas analisadas (Tabela 5). Comparativamente, o melhor rendimento percentual de agliconas, obtido com o extrato de eixo embrionário, após eliciação com 100mM de SNP por 20 horas, foi de 75%. Conclui-se assim que os extratos produzidos pelos tratamentos utilizados neste trabalho são muito superiores ao produto comercial 1, em relação às isoflavonas agliconas. Já o produto comercial 2 apresenta praticamente a mesma proporção das formas agliconas. Em relação ao rendimento produtivo, não é possível fazer comparações com os produtos comerciais, já que não se conhece os protocolos de obtenção destes produtos. Isto é relevante, uma vez que, com um baixo rendimento seriam necessárias grandes quantidades de soja para se produzir altas concentrações de agliconas. Apesar desta limitação, pode-se afirmar que os extratos, principalmente os de embrião, apresentaram um alto rendimento na produção de agliconas (2,15 µg de agliconas/mg de extrato, quando induzidos com 200 mM SNP).



**Figura 11. Cromatograma obtido por HPLC-PDA, de extrato de isoflavonas de soja comercial produzido pela empresa 1.** Identificação: 2- daidzina; 3- glicitina; 4- genistina; a- acetil-daidzina; b- acetil-glicitina; c- acetil-genistina; 8- daidzeína; 9- gliciteína. Processamento a 300 nm.



**Figura 12. Cromatograma obtido por HPLC-PDA, do extrato de isoflavonas de soja de um produto comercial produzido pela empresa 2.** Identificação: 2- daidzina; 3- glicitina; 4- genistina; 8- daidzeína; 9- gliciteína; 11- genisteína. Processamento a 300 nm.

Sendo assim, o tratamento de indução com SNP produz um extrato que pode ter uma importante aplicabilidade comercial, no que se refere ao desenvolvimento de um produto destinado à suplementação ou fitoterapia de isoflavonas bioativas.

**Tabela 5.** Comparação, em termos de área e de porcentagem relativa, das isoflavonas identificadas nos extratos de soja: comparação entre os extratos produzidos e dois produtos comerciais.

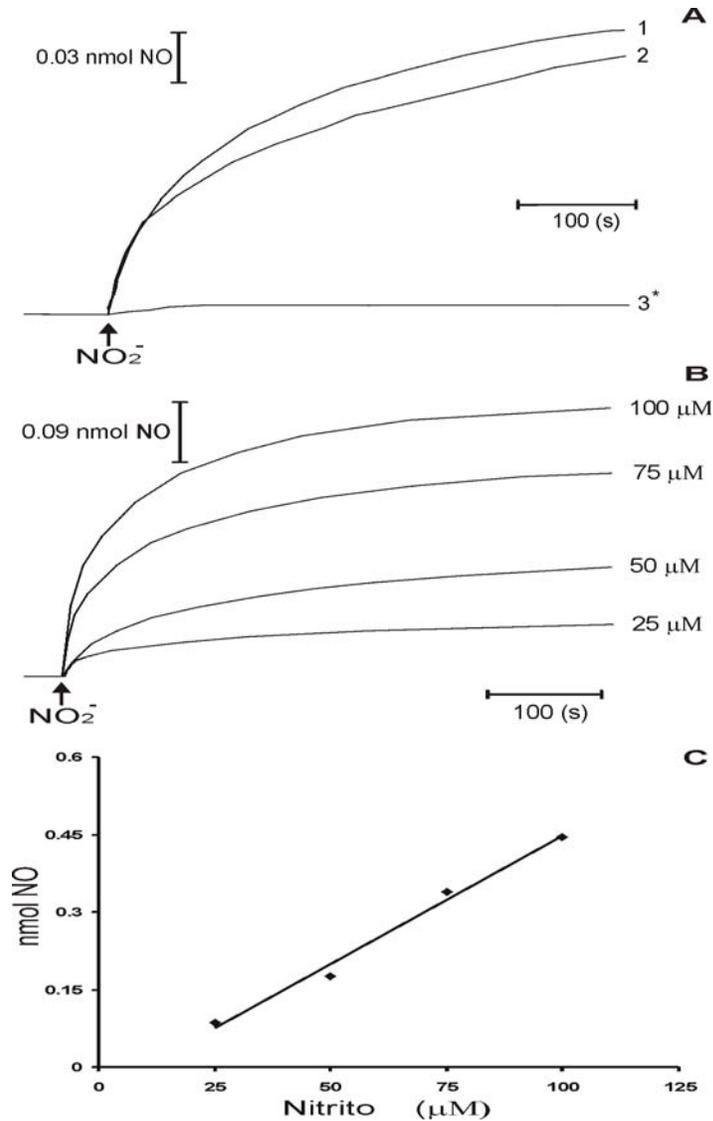
Pico	Composto	E. embr. <sup>1*</sup>	Cotilédone <sup>1</sup>	Produto comercial 1	Produto comercial 2
1	não identificado	–	–	–	–
2	Daidzina	2 ± 0,9% <sup>a</sup>	0,5 ± 0,1% <sup>a</sup>	34 ± 2% <sup>b</sup>	10,3 ± 1% <sup>c</sup>
3	Glicitina	1 ± 0,6% <sup>a</sup>	4 ± 0,2% <sup>b</sup>	15 ± 1,5% <sup>c</sup>	2,8 ± 0,2% <sup>d</sup>
4	Genistina	1 ± 0,7% <sup>a</sup>	3 ± 0,5% <sup>a</sup>	7 ± 0,7% <sup>c</sup>	2,3 ± 0,4% <sup>a</sup>
5	malonil-daidzina	4 ± 1% <sup>a</sup>	2 ± 0,7% <sup>b</sup>	n.d. <sup>c</sup>	n.d. <sup>c</sup>
6	malonil-glicitina	2 ± 0,3% <sup>a</sup>	1 ± 0,2% <sup>a</sup>	n.d. <sup>b</sup>	n.d. <sup>b</sup>
7	malonil-genistina	3 ± 0,9% <sup>a</sup>	3 ± 0,6% <sup>a</sup>	n.d. <sup>b</sup>	n.d. <sup>b</sup>
8	Daidzeína	49 ± 4% <sup>a</sup>	40 ± 3% <sup>a</sup>	2 ± 0,4% <sup>b</sup>	33,4 ± 4% <sup>c</sup>
9	Gliciteína	22 ± 2% <sup>a</sup>	5 ± 1% <sup>b</sup>	3 ± 1% <sup>b</sup>	0,7 ± 0,1% <sup>c</sup>
10	não identificado	–	–	–	–
11	Genisteína	4 ± 1% <sup>a</sup>	26 ± 3% <sup>b</sup>	n.d. <sup>c</sup>	46,7 ± 3,6% <sup>d</sup>
A	acetil-daidzina	n.d. <sup>a</sup>	n.d. <sup>a</sup>	26 ± 2% <sup>b</sup>	n.d. <sup>a</sup>
B	acetil-glicitina	n.d. <sup>a</sup>	n.d. <sup>a</sup>	7 ± 0,3% <sup>b</sup>	n.d. <sup>a</sup>
C	acetil-genistina	n.d. <sup>a</sup>	n.d. <sup>a</sup>	6 ± 0,8% <sup>b</sup>	n.d. <sup>a</sup>

<sup>1</sup>Área absoluta (porcentagem relativa), \*Eixo embrionário; n.d. – não detectado; Os valores correspondem aos compostos extraídos dos extratos de soja tratados com 100 mM de SNP por 20 horas (50 unidades/10 mL), extraídos em metanol 80% por 20min e analisados a 300 nm por HPLC-PDA-MS/MS. A média e os desvios padrões das análises de três experimentos independentes estão apresentados: letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes (p<0,01).

### **4.3 - Atividade redutora de nitrito de extratos ricos em formas agliconas**

Atualmente tem-se discutido muito na literatura, as possibilidades terapêuticas de determinados compostos, os quais estão relacionados com a produção de NO proveniente de uma fonte alternativa não-enzimática: a redução ácida do nitrito (Lundberg et al., 2008). Esta nova atividade para o nitrito tem sido proposta, relacionando-a a inúmeras funcionalidades orgânicas como o aumento do fluxo sanguíneo na parede do estômago, ação antimicrobiana dos alimentos, aumento da absorção alimentar, etc, devido à produção de NO no sistema digestivo (Takahama et al., 2002). A produção de NO a partir de nitrito se daria devido à redução do mesmo, facilitada pelo pH ácido do estômago. Recentemente foi demonstrado que flavonóides como a quercetina são capazes de potencializar a redução ácida do nitrito (Peri et al., 2005). Assim, foi avaliado eletroquimicamente as atividades dos extratos de soja e de alguns flavonóides isolados em reduzir o nitrito em pH ácido. A capacidade dos extratos de soja de estimular a redução ácida do nitrito poderia evidenciar mais uma propriedade dos extratos, o que daria mais relevância a um dos objetivos do presente trabalho que se refere à produção de extratos de soja enriquecidos em substâncias bioativas.

Inicialmente, a influência do pH na redução de nitrito foi analisada (Figura 13A). Conforme descrito por Takahama et al. (2006) existe uma importante influencia do pH na redução espontânea do nitrito. Nas nossas condições experimentais, a formação espontânea de NO a partir de nitrito (50  $\mu\text{M}$ ), após aproximadamente 5 minutos da adição do ânion, foi de 0,175  $\eta\text{mol}$  em pH 2,0, 0,15  $\eta\text{mol}$  em pH 3,5 e nos pHs 5,0 e 7,0 não houve resposta detectável, mostrando que a redução do nitrito está relacionada diretamente com o grau de acidez do meio. Como em pH 2,0 foi verificada uma maior atividade redutora, este pH foi utilizado para avaliar eletroquimicamente a cinética da geração de NO em função da concentração de nitrito. Conforme mostrado na Figura 13B, a redução de nitrito, quando utilizado na concentração de 25  $\mu\text{M}$ , produziu cerca de 0,085  $\eta\text{mol}$  de NO, que se elevou para 0,44  $\eta\text{mol}$  na presença de 100  $\mu\text{M}$  nitrito; com 50 e 75  $\mu\text{M}$  de nitrito foram produzidos 0,175 e 0,338  $\eta\text{mol}$  respectivamente.

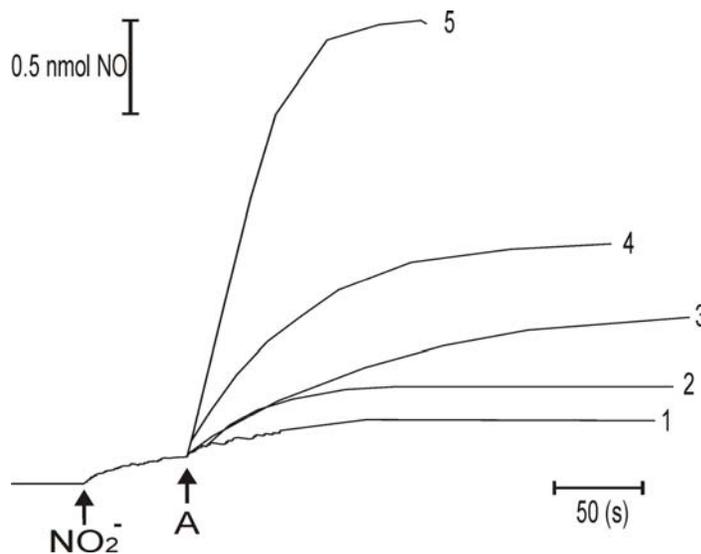


**Figura 13. Efeito do pH e da concentração de nitrito na produção de NO. (A)** Nitrito (50 μM) preparado em tampão fosfato pH 7,0 foi adicionado ao meio de reação (conforme indicado) composto por KCl/HCl (0,1M) pH 2,0 (1); tampão citrato/fosfato (0,1M) pH 3,5 (2) ou tampão fosfato (0,1M) pH 5,0 ou 7,0 (3) num volume final de 1mL. \* Sem diferenças em relação ao controle (sem nitrito). **(B)** Nitrito, nas concentrações indicadas, foi adicionado em meio HCl/KCl pH 2,0. **(C)** Relação dose-resposta entre a concentração de nitrito e a produção de NO em pH 2,0. A produção de NO foi acompanhada com um eletrodo específico e determinada após 5 minutos da adição de nitrito, considerando-se 100 pA = 0,1nmol de NO, a partir de uma curva de calibração.

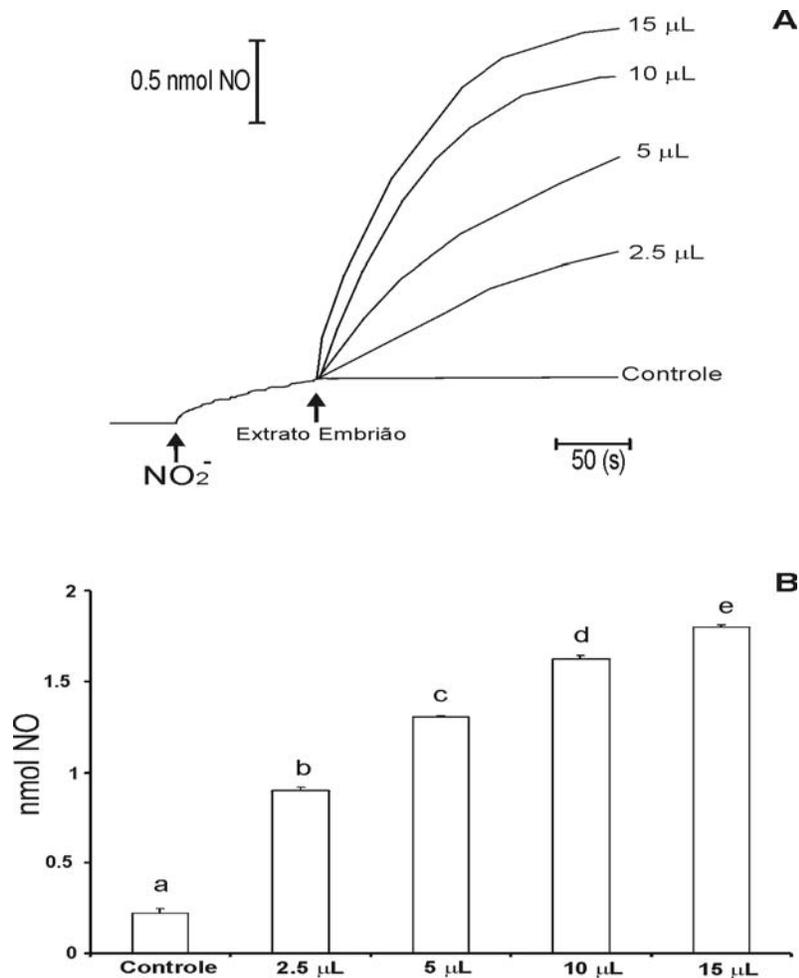
Assim, conforme evidenciado na Figura 13C, a produção de NO se apresentou diretamente proporcional à concentração de nitrito.

Os extratos de soja foram avaliados quanto à capacidade de estimular a redução ácida do nitrito e esta atividade foi comparada com a dos principais isoflavonóides isolados de soja. A luteolina e a quercetina foram também utilizadas como controles positivos, já que estes compostos são capazes de estimular a redução ácida do nitrito (Takahama et al., 2002). A ampla atividade da quercetina em promover a redução de nitrito em pH ácido estaria relacionada ao seu esqueleto molecular, mais precisamente ao grupo hidroxila da região do carbono três do anel central (Peri et al., 2005). Conforme mostra a Figura 14, os extratos de eixo embrionário e cotilédone estimularam a redução de nitrito, levando à produção de 1,4 e 0,9  $\eta$ mol de NO em pH 2,0 quando aplicados no volume de 10  $\mu$ L (350  $\mu$ g extrato), valores que foram 8 vezes e 5,1 vezes maiores quando comparados à redução do controle (apenas nitrito) que foi de 0,175  $\eta$ mol de NO. Os flavonóides quercetina e luteolina apresentaram, na concentração de 50  $\mu$ M, uma ação redutora de nitrito significativa acima da redução espontânea (controle), que foi de 2,5 e 0,5  $\eta$ mol de NO, respectivamente. Esta atividade mais baixa da luteolina quando comparada à da quercetina está de acordo com o avaliado por Takahama et al. (2002). Padrões de flavonóides de soja (daidzeína, genisteína, gliciteína, daidzina, glicitina, genistina, apigenina), testados até 100  $\mu$ M, extratos não tratados de embrião e cotilédone e a solução de SNP (100 mM) não tiveram efeito na redução ácida do nitrito (dados não mostrados).

A atividade redutora de nitrito foi avaliada em função da concentração do extrato (Figura 15). A adição de 2,5, 5 e 10  $\mu$ L de extrato de eixo embrionário geraram respectivamente 0,9, 1,3 e 1,62  $\eta$ mol de NO. A partir de 15  $\mu$ L de extrato não houve diferença significativa em relação ao aumento da atividade redutora, sugerindo saturação do processo na concentração utilizada de nitrito.



**Figura 14. Efeito dos extratos de soja na redução ácida do nitrito.** Extratos ou flavonóides isolados foram adicionados em 1mL de meio de reação contendo 0,1M de HCl/KCl pH 2,0 e nitrito 50  $\mu$ M. A quercetina e a luteolina foram usadas como controle positivo. (1) Nitrito (50  $\mu$ M) foi adicionado e em A: (2) luteolina (50  $\mu$ M) ou (3) 10 $\mu$ L de extrato de cotilédone (35  $\mu$ g de extrato/ $\mu$ L) ou (4) 10 $\mu$ L de extrato de eixo embrionário (35  $\mu$ g de extrato/ $\mu$ L) ou (5) quercetina (50  $\mu$ M), conforme indicado. Padrões de flavonóides de soja (daidzeína, genisteína, gliciteína, daidzina, glicitina, genistina, apigenina), testados até 100  $\mu$ M, extratos não tratados de embrião e cotilédone e a solução de SNP (100 mM) não tiveram efeito na redução ácida do nitrito (dados não mostrados).



**Figura 15. Relação dose-efeito entre o extrato de eixo embrionário e a redução do nitrito. (A)** Alíquotas de extrato (35 μg de extrato/μL) de eixo embrionário (conforme indicado) foram adicionadas em 1mL de meio de reação com 0,1M de HCl/KCl pH 2,0 e nitrito 50 μM. O controle corresponde à produção de NO apenas na presença de nitrito. **(B)** Relação dose-resposta entre a concentração de extrato e a produção de NO em pH 2.0. A quantidade de NO produzido foi determinada após 5 minutos da adição de nitrito. Os dados representam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes (p<0,05).

#### **4.4 - Atividade redutora de nitrito de extratos de soja: quantificação de NO por quimiluminescência**

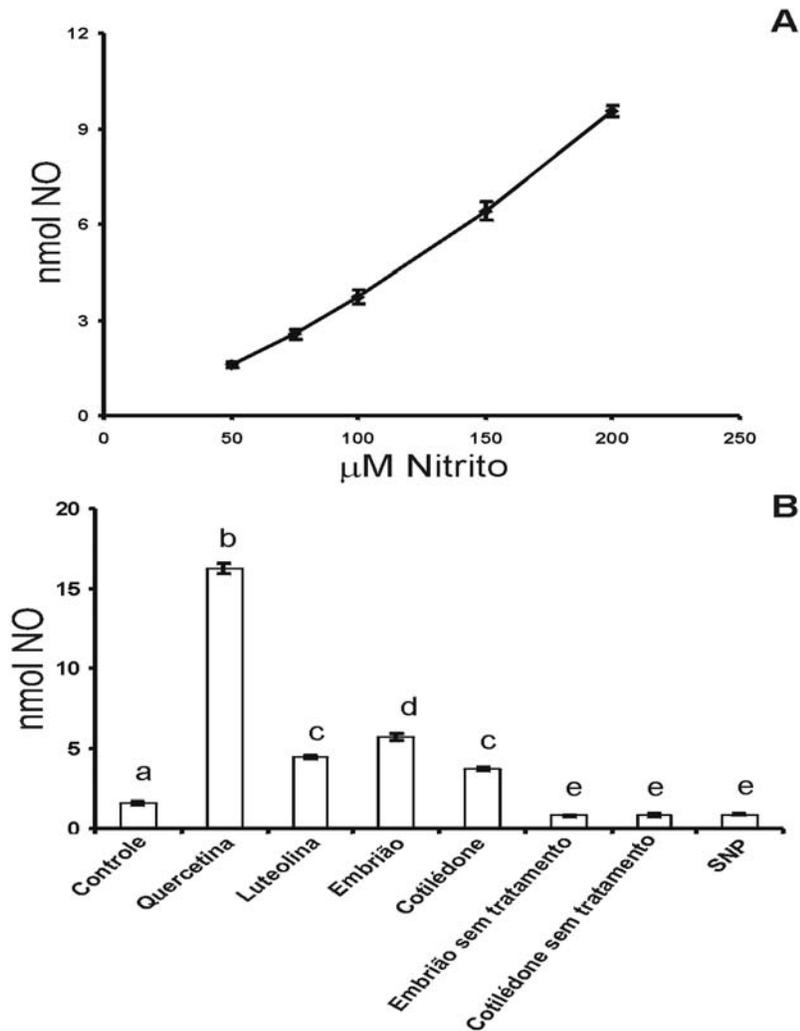
Com o objetivo de confirmar atividade redutora de nitrito dos extratos de soja, detectada com o analisador de radicais, os ensaios foram avaliados utilizando a técnica de determinação de NO por quimiluminescência, ensaios estes que foram conduzidos no Laboratório da Profa. Ohara Augusto, do Instituto de Química da USP. Esta técnica ajudaria a confirmar os resultados anteriores pelo fato da quimiluminescência ser um método bastante sensível e reprodutivo no que diz respeito à quantificação do NO. Além disso, a detecção é realizada em ambiente anaeróbico, o que diminui a interferência do oxigênio, uma vez que, parte do NO gerado em aerobiose se liga ao O<sub>2</sub> molecular formando nitrito (Amano et al., 1995). As análises iniciais foram feitas em pH 2,0, pois foi neste pH que foi verificada a melhor resposta nas análises eletroquímicas. A cinética da geração de NO em função da concentração de nitrito foi avaliada e, conforme esperado, o aumento da concentração de nitrito aumentou proporcionalmente a produção de NO (Figura 16A). A redução espontânea de nitrito em pH 2,0 produziu 1,6 ηmol de NO com 50 μM de nitrito, valor este que se elevou para 9,7 ηmol de NO na presença de 200 μM nitrito.

Os extratos de soja, controle ou tratados com o eliciador SNP foram então avaliados quanto à capacidade de estimular a redução do nitrito. Os extratos tratados de eixo embrionário e cotilédone estimularam a redução de nitrito (50 μM) produzindo-se após 10 min de incubação 5,7 e 3,7 ηmol de NO, respectivamente (Figura 16B). Estes resultados demonstram um significativo efeito na redução ácida do nitrito em relação ao controle (apenas nitrito) e aos extratos de embrião e cotilédone não tratados, que produziram 0,8 e 0,82 ηmol de NO, respectivamente. Para comprovar que o SNP não estaria causando um resultado falso positivo, uma solução eliciadora (SNP 100 mM) foi extraída de maneira semelhante aos extratos e também avaliada na sua capacidade de redução de nitrito. Conforme mostrado na Figura 16B, não houve qualquer atividade redutora da solução de SNP, o que comprova que o tratamento de indução usado nos tecidos conferiu as atividades

redutoras observadas nos extratos tratados com SNP. É interessante observar que a quantidade de NO gerado na presença dos extratos não tratados (~0,8  $\eta$ mol) foi inferior ao controle (1,6  $\eta$ mol de NO). Os flavonóides quercetina e luteolina (50  $\mu$ M), também foram avaliados e apresentaram significativa atividade redutora em pH ácido (16,2 e 4,4  $\eta$ mol de NO respectivamente). Estes resultados confirmam os resultados obtidos através da análise eletroquímica e estão de acordo com dados da literatura que demonstraram uma maior atividade da quercetina, em relação à luteolina, na redução ácida do nitrito (Takahama et al., 2002).

A influência do pH na redução de nitrito foi também avaliada e confirmou os resultados obtidos na determinação eletroquímica, de que a atividade redutora de nitrito dos extratos de soja está relacionada diretamente com o grau de acidez do meio e é maior nos extratos enriquecidos em agliconas. Assim, conforme mostra a Tabela 6, os extratos tratados de cotilédone e eixo embrionário produzem em pH 3,5 aproximadamente 0,7 e 0,9  $\eta$ mol de NO, respectivamente, na presença de 50  $\mu$ M de nitrito. Estes valores são entre cinco e seis vezes menores daqueles encontrados em pH 2,0. Mesmo assim, os extratos tratados de cotilédone e embrião apresentaram aproximadamente reduções de duas a três vezes superiores aos não tratados (0,34 e 0,35  $\eta$ mol de NO, respectivamente), no pH 3,5.

As atividades dos flavonóides luteolina e quercetina foram também avaliadas, para efeito comparativo, e produziram em pH 3,5 aproximadamente 0,6 e 1,1  $\eta$ mol de NO respectivamente, valores estes que se apresentam diminuídos de sete a quatorze vezes, em relação aos valores obtidos no pH 2,0. Nos pHs 5,0 e 7,0 não houve qualquer resposta detectada. A Tabela 6 ainda mostra que, eletroquimicamente os resultados anteriormente verificados são muito semelhantes aos obtidos por quimiluminescência, ou seja, entre os extratos, o de eixo embrionário demonstra a melhor atividade redutora (1,4  $\eta$ mol) quando comparado ao cotilédone (0,9  $\eta$ mol) ou aos extratos não tratados (~ 0,08  $\eta$ mol) e a quercetina é a mais ativa na redução ácida de nitrito (2,5  $\eta$ mol).



**Figura 16. Efeito dos extratos de soja na redução ácida do nitrito, determinada por quimiluminescência. (A)** Produção de NO em pH ácido em função da concentração de nitrito. Total de NO produzido após 10 minutos da adição de nitrito ao meio de reação contendo 0,1M KCl/HCl pH 2,0. A quantidade de NO produzido foi determinada por curvas de calibração a partir da adição de alíquotas de uma solução saturada do gás NO. **(B)** Os extratos foram adicionados ao meio de reação contendo 0,1M de KCl/HCl pH 2,0 e nitrito 50 µM e, após 10 min, o total de NO produzido foi quantificado. A quercetina foi usada como controle positivo. Controle – apenas nitrito 50 µM; Quercetina 50 µM; Luteolina 50 µM; extrato de eixo embrionário (com ou sem tratamento) - 50µL (35 µg de extrato/µL); extrato de cotilédone (com ou sem tratamento) - 50µL (35 µg de extrato/µL); 50 µL de solução de SNP 100 mM. Os dados representam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes (p<0,01).

Na determinação eletroquímica a produção de NO observada é provavelmente menor devido à diferença de sensibilidade das metodologias e presença de O<sub>2</sub> no meio, fato este que influencia diretamente na quantidade de NO gerado (Amano et al., 1995).

**Tabela 6.** Relação de flavonóides e extratos de soja na redução de nitrito em diferentes pHs, determinado por quimiluminescência e com eletrodo de NO. Experimentos realizados nas mesmas condições descritas nas figuras **14 e 16**, nos pHs indicados.

pH	Quimiluminescência		Eletroquímica	
	2,0	3,5	2,0	3,5
Controle	1,59 ηmol	0,44 ηmol	0,27 ηmol	0,09 ηmol
Quercetina	16,23 ηmol	1,06 ηmol	2,5 ηmol	0,3 ηmol
Luteolina	4,39 ηmol	0,62 ηmol	0,5 ηmol	0,01 ηmol
E. embr. <sup>1</sup>	5,67 ηmol	0,87 ηmol	1,4 ηmol	0,27 ηmol
Cotilédone	3,68 ηmol	0,66 ηmol	0,9 ηmol	0,25 ηmol
E. embr. s/tratamento <sup>1</sup>	0,79 ηmol	0,35 ηmol	0,2 ηmol	0,07 ηmol
Cotilédone s/tratamento	0,83 ηmol	0,34 ηmol	0,2 ηmol	0,08 ηmol
SNP	0,86 ηmol	0,44 ηmol	0,26 ηmol	0,09 ηmol

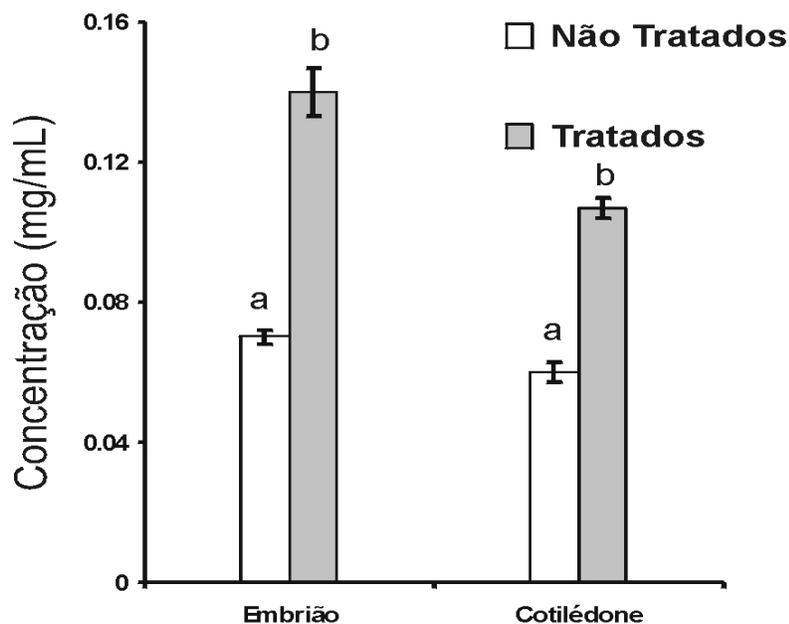
<sup>1</sup>Eixo embrionário. Nos pHs 5,0 e 7,0, não houve efeito na produção de NO.

#### **4.5 - Determinação da quantidade de fenólicos totais nos extratos de soja**

Conforme resultados da detecção de NO com eletrodo específico e por quimiluminescência, os extratos de soja enriquecidos em agliconas apresentaram uma importante atividade redutora de nitrito em meio ácido. Visando investigar quais os componentes presentes nos extratos poderiam justificar os efeitos observados, as principais isoflavonas livres (daidzeína, gliciteína, genisteína), bem como conjugadas (daidzina, glicitina e genistina) presentes nos extratos foram avaliadas quanto a estas atividades. Entretanto, nenhuma destas substâncias apresentou efeito significativo na redução do nitrito. A luteolina e a apigenina, flavonóides da classe das flavonas, muito comum em soja, foram também

avaliadas e a luteolina demonstrou atividade em reduzir o nitrito em pH 2,0 (Figura 14). Entretanto, apesar de trabalhos anteriores do nosso grupo (Modolo et al., 2002) terem relatado a presença de luteolina e apigenina em cotilédones no 8º dia de germinação, sob a ação de um eliciador, não foi encontrado nenhum destes dois flavonóides nos extratos preparados de embrião ou cotilédone, quando estes foram analisados por HPLC para se detectar a presença destas flavonas (resultados não apresentados). Assim, foi investigada a presença de compostos fenólicos (não-flavonóides) nos extratos. Existe na literatura uma vasta descrição de atividades destes compostos contra espécies reativas (Brenna et al., 2001) e, mais recentemente, foram também identificados como facilitadores da redução ácida do nitrito (Peri et al., 2005). Ainda, estes compostos se originam na via dos fenilpropanóides, que também leva à síntese das isoflavonas de soja (Figura 1). O processo de extração foi então modificado para favorecer um maior rendimento de compostos fenólicos. Nesta nova extração, tanto tecido como exsudato foram extraídos com acetona e uma etapa de centrifugação foi incluída depois do período em que as peças teciduais ficaram em contato com o solvente orgânico.

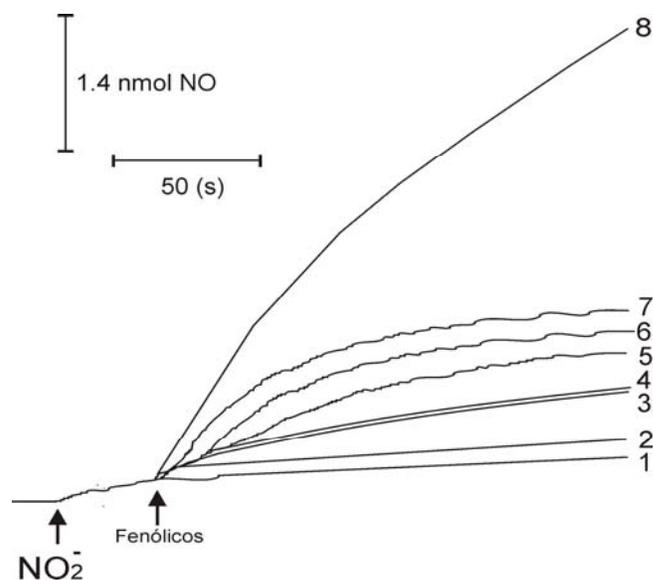
O efeito do tratamento indutor com SNP na quantidade de fenólicos totais nos tecidos de soja é apresentado na Figura 17. Como pode ser avaliado, o tratamento com o eliciador aumentou o número de fenólicos totais em comparação aos extratos dos tecidos não tratados. No caso do eixo embrionário este aumento foi dobrado obtendo-se 0,7 mg/mL de fenólicos totais no extrato não tratado e 1,4 mg/mL no extrato tratado. A concentração de fenólicos no extrato de cotilédone foi também aumentada de 0,6 mg/mL no extrato não tratado para 1,1 mg/mL no extrato tratado. Os resultados também mostram que a quantidade de fenólicos totais no eixo embrionário é maior que a do cotilédone (em mg/mL de extrato), tanto nos tecidos tratados como naqueles não tratados e, poderiam assim, justificar a melhor capacidade redutora de nitrito do eixo embrionário.



**Figura 17. Concentração de fenólicos totais nos extratos de soja: efeito do tratamento com SNP.** Eixos embrionários ou cotilédones de semente de soja foram incubados com uma solução eliciadora de SNP 100mM por 20 horas no escuro, após o que os fenólicos foram extraídos conforme descrito em Materiais e Métodos. Nos controles (não tratados) os tecidos foram incubados em água. As quantificações foram determinadas por curvas de calibração de quercetina e ácido gálico. Os resultados são representativos da média  $\pm$  desvio de três experimentos independentes ( $p < 0,001$ ).

#### **4.6 - Efeito de compostos fenólicos e ácidos orgânicos na redução ácida do nitrito**

Surge a cada dia uma nova gama de trabalhos que relatam à ação de compostos fenólicos e também de alguns ácidos orgânicos na geração de NO a partir de nitrito em meio ácido (Lundberg et al., 2008). Assim, visando justificar o efeito redutor encontrado nos extratos, foram avaliados eletroquimicamente alguns compostos fenólicos e ácidos orgânicos, a saber, ácido caféico, gálico, hidroxibenzóico, *p*-coumárico, rutina, epicatequina e os ácidos málico e ascórbico. Estes compostos foram avaliados nas concentrações de 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL e 1mg/mL. A Figura 18 mostra as concentrações mínimas as quais os compostos avaliados tiveram efeitos significativos na redução de nitrito em pH 2,0. A menor concentração efetiva de epicatequina e rutina que produziu efeito na redução ácida de nitrito foi de 200 µg/mL gerando 3,1 e 0,38 ηmol de NO comparados à quantidade de NO produzida com a redução espontânea do nitrito (0,26 ηmol). Já o ácido gálico e o ácido caféico apresentaram efeitos na redução de nitrito nas menores concentrações testadas (50 µg/mL) gerando 1,3 e 1,1 ηmol de NO respectivamente (Figura 18). O mesmo pode ser verificado com o ácido ascórbico, o qual na concentração de 50 µg/mL apresentou o melhor efeito redutor produzindo 9,6 ηmol de NO. Este resultado está de acordo com a literatura, a qual descreve o ácido ascórbico como um dos mais relevantes agentes redutores de nitrito (Yamasaki, 2000). Já o ácido málico não apresentou atividade redutora do nitrito, nas concentrações testadas (resultados não mostrados). Os fenólicos hidroxibenzóico e *p*-coumárico só apresentaram efeito na maior concentração avaliada (1mg/mL) ambos gerando aproximadamente 0,85 ηmol de NO. Gago e colaboradores (2007) também descreveram o efeito do fenólico *p*-coumárico e do ácido ascórbico presentes no vinho de estimular a redução ácida do nitrito.



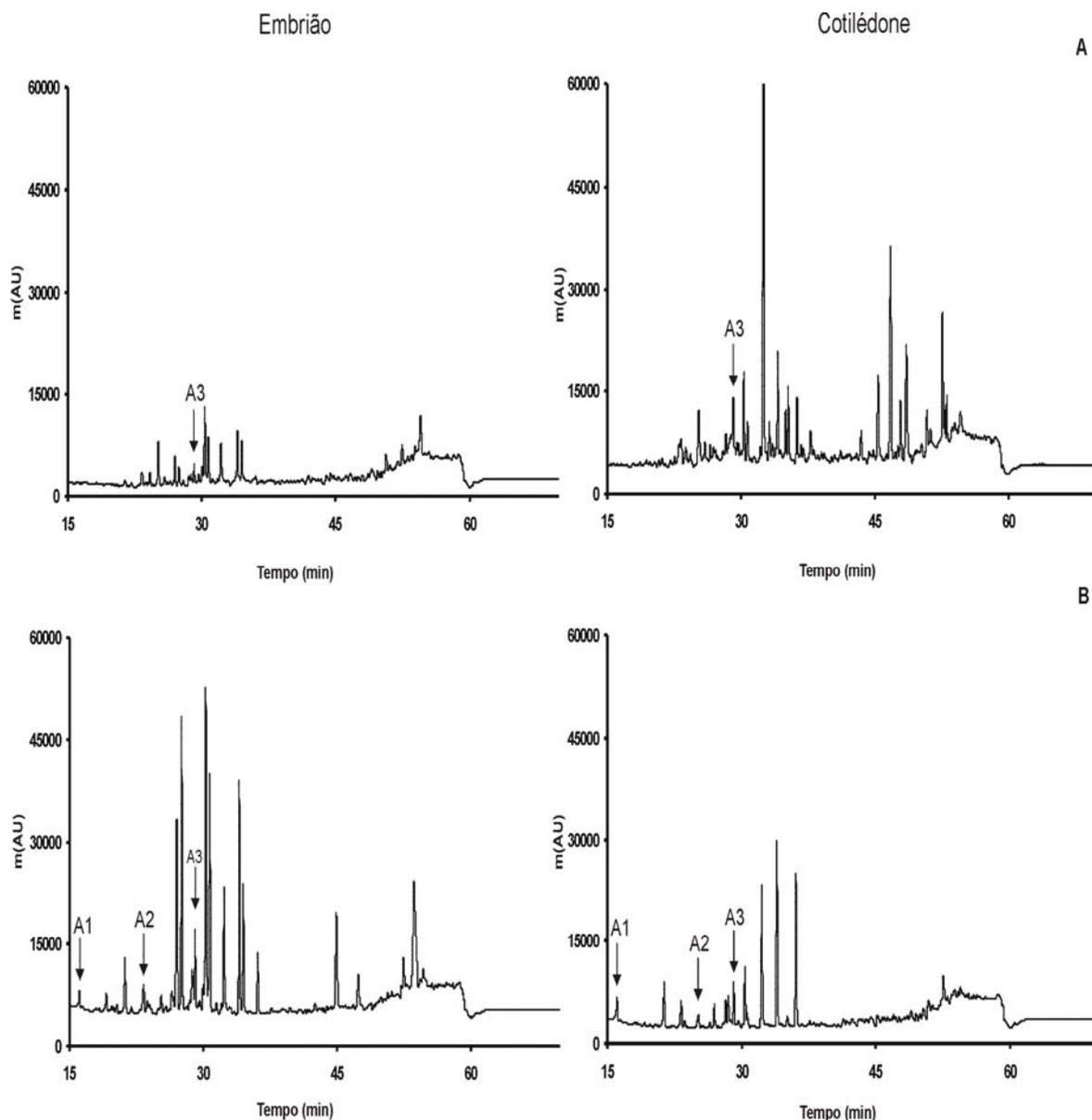
**Figura 18. Efeito de compostos fenólicos e ácidos orgânicos na redução ácida do nitrito.** A produção de NO foi analisada eletroquimicamente em meio de reação composto por KCl/HCl (0,1M) pH 2,0, após a adição de 50  $\mu$ M de nitrito (1) e diferentes compostos fenólicos: (2) rutina (200 $\mu$ g/mL); (3) *p*-coumárico (1 mg/mL); (4) hidroxibenzóico (1 mg/mL); (5) epicatequina (200 $\mu$ g/mL); (6) ácido caféico (50 $\mu$ g/mL); (7) ácido gálico (50 $\mu$ g/mL); (8) ácido ascórbico (50 $\mu$ g/mL). O gráfico apresenta a menor concentração de fenólico em que foi verificado efeito significativo na redução do nitrito. Os resultados são representativos da média de três experimentos independentes.

#### **4.7 - Identificação por HPLC dos compostos fenólicos dos extratos de soja**

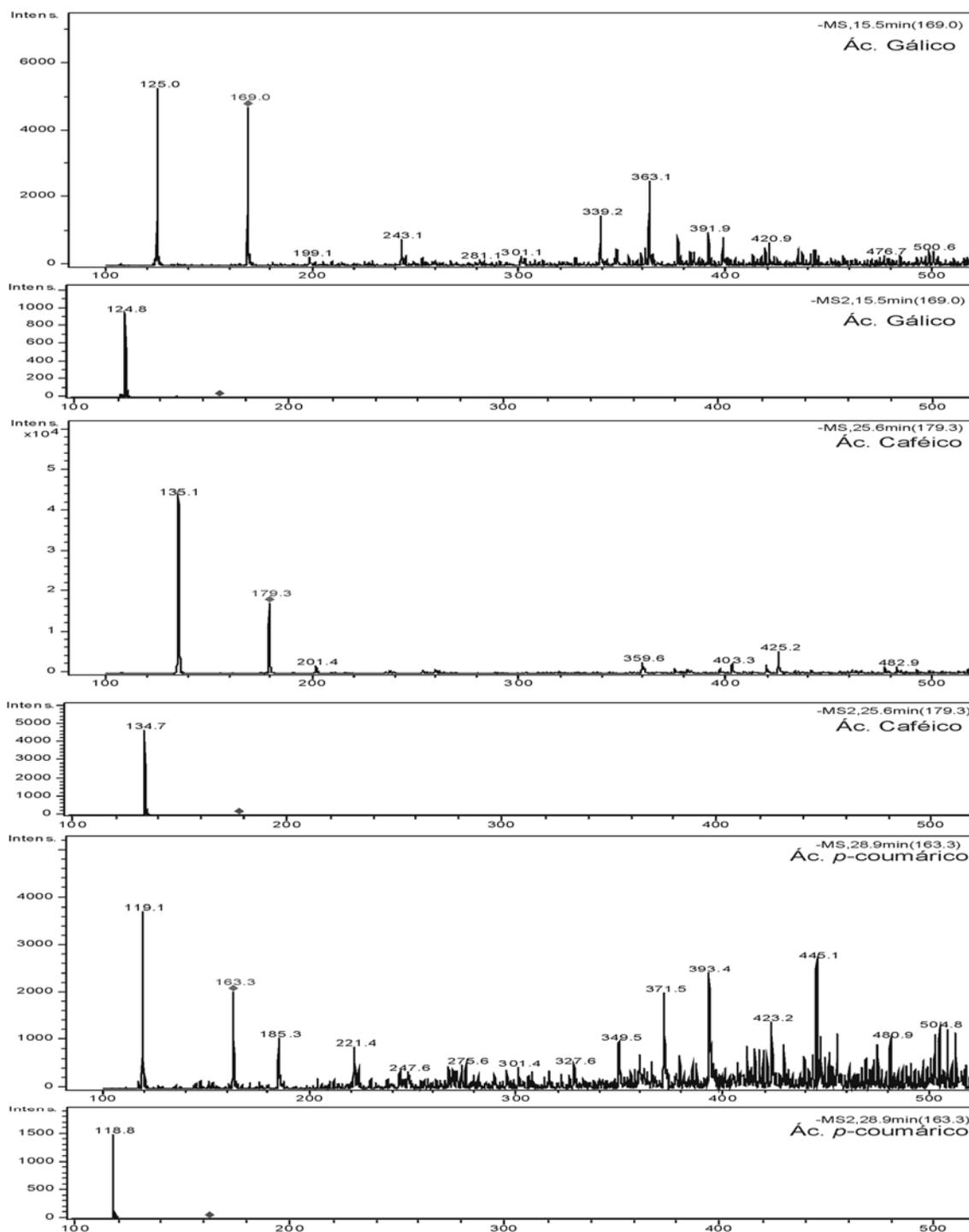
Uma metodologia foi desenvolvida para identificar a presença de fenólicos e ácidos orgânicos nos extratos de soja. Como existem poucas metodologias disponíveis para a análise de ácidos orgânicos e compostos fenólicos simultaneamente, houve a necessidade de adequar às metodologias disponíveis para os extratos de soja. Deste modo, algumas modificações na metodologia de análise por HPLC foram avaliadas para melhorar e otimizar os resultados. Dentre estas, foram variadas as fases móveis como metanol e acetonitrila, o tempo de corrida, os gradientes de solvente orgânico e o fluxo. Com as condições

otimizadas (apresentadas na seção de Materiais e Métodos), foram investigados nos extratos de eixos embrionários e cotilédones (tratados ou não com SNP) a presença dos compostos fenólicos que apresentaram atividade na redução ácida do nitrito, conforme apresentado na Figura 18. Dentre os picos encontrados pela análise por cromatografia líquida dos extratos, baseado nos padrões, foi possível identificar somente três dos compostos fenólicos avaliados, a saber: ácido gálico, ácido caféico e ácido *p*-coumárico (Figura 19). A Figura 20 mostra os padrões de fragmentação dos compostos identificados. Pode-se observar na Figura 19 que o extrato de eixo embrionário apresenta uma maior quantidade de ácido caféico quando comparado com o extrato de cotilédone. Em contrapartida, verifica-se que o extrato de cotilédone apresenta quantidades muito semelhantes de ácido gálico e *p*-coumárico em relação ao eixo embrionário. Nos extratos não tratados de eixo embrionário e cotilédone foi detectado apenas o fenólico *p*-coumárico dentre os compostos testados. Estes resultados sugerem que o tratamento com SNP pode estar ativando outros produtos da via dos fenilpropanóides (ácidos fenólicos) que também apresentam atividades biológicas (Ya-Quin Ma et al., 2008), o que poderia ampliar a potencial bioatividade dos extratos preparados no presente trabalho. Já foi demonstrado que alguns ácidos fenólicos apresentam excelentes atividades antitumorais e antioxidantes (Singh et al., 2009) e podem se encontrar conjugados a diferentes compostos na soja (Romani et al., 2003).

A presença de alguns ácidos orgânicos (ácido málico e ascórbico) nos extratos também foi investigada. Esta análise deu-se pelo fato de que alguns destes ácidos orgânicos como, por exemplo, o ácido ascórbico, ser um excelente agente contra radicais livres e um ótimo redutor em pH ácido (Nie et al., 2001). Realmente, conforme mostrado na Figura 18, o ácido ascórbico estimulou de maneira significativa a redução ácida do nitrito. Entretanto, não foram encontradas quantidades detectáveis dos referidos ácidos nos extratos, com a metodologia utilizada (resultados não mostrados).



**Figura 19. Cromatogramas obtidos por HPLC-PDA da identificação de compostos fenólicos nos extratos de eixos embrionários e cotilédones de soja não tratados (A) e tratados (B) por 20 horas com uma solução aquosa de 100 mM de SNP. Em B os cromatogramas foram realizados com os extratos diluídos 10 vezes em relação à quantidade aplicada em A. Identificação: A1- Ácido gálico; A2- Ácido caféico; A3- *p*-coumárico. Processamento a 278 nm.**

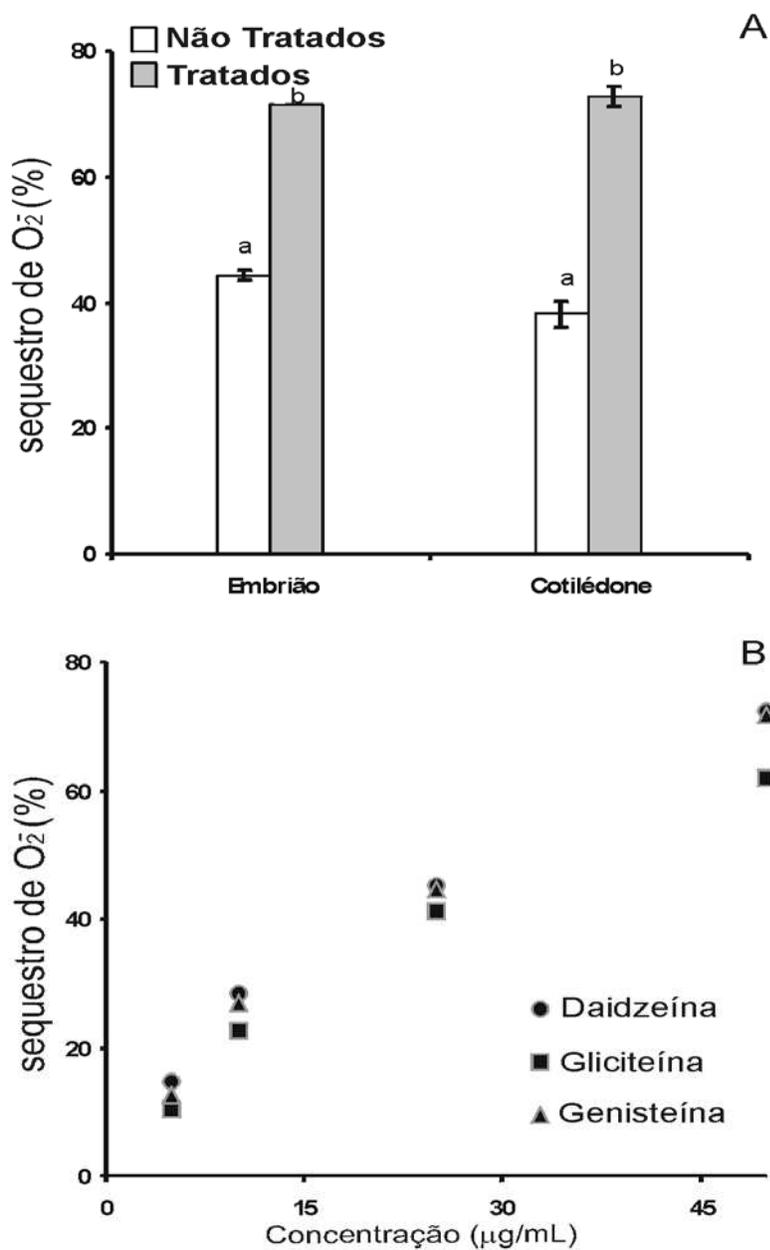


**Figura 20. Análise dos padrões de ácidos fenólicos por HPLC-PDA-MS/MS.** Espectro completo de MS (+MS) e espectro de fragmentação MS-MS (+MS2) dos picos principais que apareceram em amostras puras de ácido gálico, ácido caféico e ácido *p*-coumárico, conforme indicado.

O extrato de eixo embrionário apresentou uma quantidade de fenólicos totais e de ácido caféico maior que aquelas do extrato de cotilédone, enquanto que quantidades equivalentes de ácido gálico foram detectadas (Figuras 17 e 19). Como os ácidos gálico e caféico apresentaram uma boa atividade redutora de nitrito (Figura 18), estes fenólicos poderiam, pelo menos em parte, justificar a atividade verificada dos extratos. Esta atividade também pode estar sendo favorecida pelo fenólico *p*-coumarico, pois este composto também demonstrou alguma atividade redutora (Figura 18) e foi identificado tanto no extrato de eixo embrionário como no de cotilédone (Figura 19). Estes resultados estão de acordo com trabalhos anteriores que relatam a atividade destes fenólicos em reduzir o nitrito a NO em pH ácido (Gago et al., 2007).

#### ***4.8 Atividade seqüestradora de radicais superóxido dos extratos de soja enriquecidos de agliconas***

A atividade dos extratos de soja em seqüestrar o radical ânion superóxido foi avaliada espectrofotometricamente, de acordo com Sun et al. (2007). Como pode ser visto na Figura 21A, tanto os extratos não tratados de cotilédone, como os de eixo embrionário apresentaram atividades, inibindo em 38% e 44%, respectivamente, a produção de radical superóxido. O tratamento eliciador com SNP aumentou as atividades dos extratos de cotilédone e eixo embrionário para 72,7% e 71,6%, respectivamente, em relação ao controle. Também foi investigada a capacidade das agliconas isoladas de soja em seqüestrar o radical superóxido, uma vez que, os extratos são ricos nestes compostos. As agliconas daidzeína, genisteína e gliciteína apresentaram atividade dose-dependente chegando a sequestrar o ânion superóxido em 72%, 72% e 65%, respectivamente, quando utilizadas na concentração de 50 µg/mL (Figura 21B). É interessante ressaltar que os extratos apresentam aproximadamente estas concentrações de agliconas. Assim, as atividades observadas das agliconas isoladas de soja podem ajudar a explicar o efeito de seqüestro de ânion superóxido encontrado nos extratos, principalmente quando se analisa a soma das atividades destas isoflavonas.

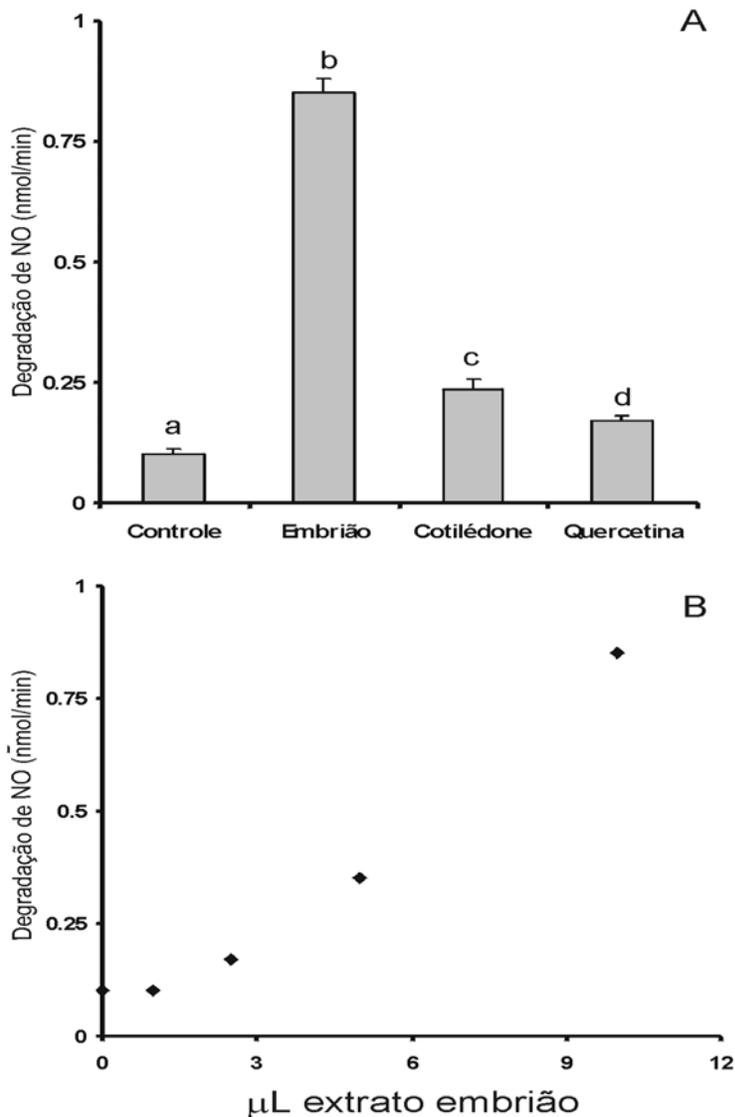


**Figura 21. Atividade sequestrante do radical ânion superóxido dos extratos e das isoflavonas isoladas de soja. (A)** Eixos embrionários ou cotilédones foram tratados com uma solução eliciadora de SNP 100 mM ou incubados em água (não tratados) por 20 horas no escuro. Os resultados são representativos da média  $\pm$  desvio de três experimentos independentes ( $p < 0,001$ ). **(B)** Relação dose-resposta entre a concentração de isoflavonas e a atividade de seqüestro de ânion superóxido. As análises se dão em porcentagem de inibição da coloração do NBT em relação ao controle.

A eficiência das isoflavonas glicosiladas em seqüestrar o ânion superóxido foi também avaliada, apesar de se encontrarem em pequenas concentrações nos extratos preparados. A maior atividade encontrada foi de 82% da genistina, quando utilizada a 80 µg/mL, seguido da glicitina (72%) e da daidzina (70%) na mesma concentração (dados não mostrados). Há na literatura, alguns trabalhos que demonstram as atividades de compostos fenólicos contra o radical superóxido, dentre eles o ácido gálico (Zheng et al., 2009), o caféico e o p-coumárico (Zhao et al., 2006). Estes compostos foram avaliados e o ácido gálico se mostrou bem efetivo na atividade contra o ânion superóxido, com 89 % de inibição na concentração de 10 µg/mL (dados não mostrados). Como estes compostos estão presentes nos extratos, eles podem estar sendo adjuvantes no efeito antioxidante verificado, o que poderia ampliar a bioatividade dos extratos aqui desenvolvidos.

#### ***4.9 Atividade antinitrosativa dos flavonóides de soja e dos extratos enriquecidos de agliconas***

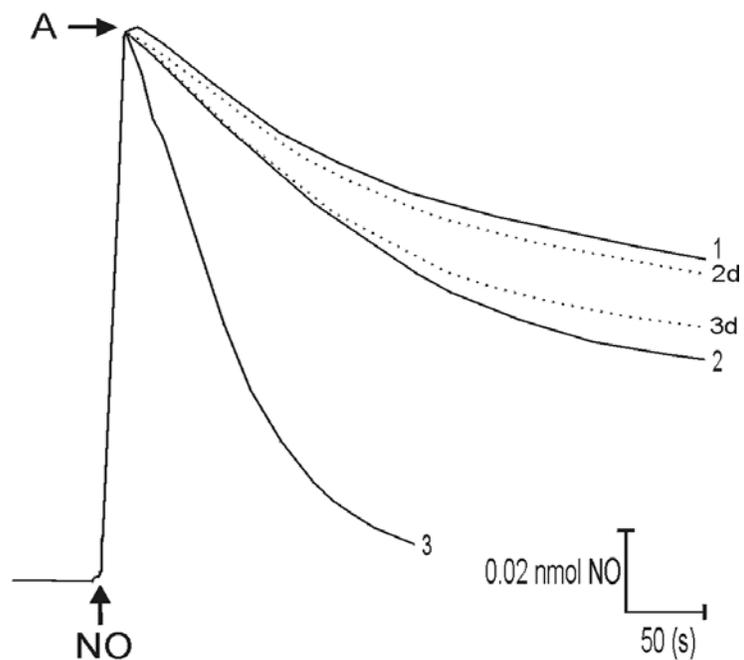
Além de determinar a atividade antioxidante dos extratos, o que já está classicamente relatado na literatura (Havsteen, 2002), no presente trabalho procuramos também avaliar a atividade antinitrosativa dos extratos de soja em pH neutro, acompanhando-se a concentração de NO no meio de reação com eletrodo específico. Conforme mostra a Figura 22, ambos os extratos, mas principalmente o de eixo embrionário apresentou intensa atividade sequestrante de NO, enquanto que, na presença de quercetina o decaimento de NO foi apenas ligeiramente acelerado. A velocidade de captação do NO, apresentada pelo extrato de eixo embrionário, foi de 0,85 ηmol por minuto contra 0,24 ηmol/min do cotilédone, enquanto que a quercetina, na concentração de 50 µM, apresentou uma pequena atividade sequestrante de NO (0,172 ηmol/min) comparada com a degradação espontânea do controle (0,1 ηmol/min) (Figura 22A). Ainda, a avaliação da atividade dos extratos de eixos embrionários de soja mostrou que a capacidade sequestrante de NO é diretamente proporcional à sua concentração (Figura 22B).



**Figura 22. Degradação de NO estimulada por extratos de soja e quercetina.**

Doador de NO - dea nonoato (1µL da solução a 0,6mg/mL) foi adicionado a 1mL de meio de reação composto por tampão fosfato 0,1M e EDTA 1mM em pH 7,0. Após a estabilização do sinal, alíquotas de padrões de flavonóides (50 ηmol) ou de 10µL dos extratos de eixo embrionário (35 µg de extrato/µL) ou cotilédone (35 µg de extrato/µL) de soja foram adicionados ao meio de reação e o consumo de NO foi acompanhado por 5 min. **(A)** Velocidade de degradação de NO calculada pelo coeficiente angular da reta relativa ao início da curva de consumo de NO. Os resultados são representativos da média ± desvio de três experimentos independentes (p<0,01). **(B)** Relação dose-resposta do extrato de eixo embrionário e a velocidade de degradação de NO.

Conforme apresentado na Figura 21, a atividade sequestrante de ânion superóxido dos extratos de soja pareceu estar relacionada ao conteúdo de agliconas dos extratos. Entretanto as isoflavonas de soja isoladas (daidzeína, genisteína, gliciteína, daidzína, glicitina e genistina), os extratos de soja sem tratamento, os ácidos gálico, cafeico e *p*-coumárico além da solução eliciadora de SNP, não tiveram efeito significativo, sendo o decaimento do NO na presença destes compostos semelhante ao do controle (resultados não mostrados). Assim, apesar de alguns trabalhos relatarem uma efetiva ação dos compostos fenólicos contra radicais livres (Ya-Quin Ma et al, 2008), esta atividade não foi detectada quando se analisou eletroquimicamente a atividade de seqüestro de NO. Por outro lado, a atividade verificada nos extratos poderia ser justificada por outros compostos além dos fenólicos, uma vez que, outros autores (Augusto et al., 2004) relatam que o NO por ser uma molécula paramagnética, pode se ligar facilmente a alguns tipos de metais e/ou compostos que contenham grupamento tiol (-SH). Entretanto, a presença de EDTA (1 mM) no meio de reação não alterou a atividade seqüestradora de NO dos extratos (dados não mostrados) indicando que o decaimento de NO do meio provavelmente não seria devido à interferência de metais. Como a soja é uma leguminosa rica em aminoácidos e proteínas, e a presença de proteínas ou peptídeos foi detectada nos extratos pelo método de Bradford (dados não mostrados), foi avaliado se os grupamentos tiol (-SH) poderiam, pelo menos em parte, serem responsáveis pelos efeitos observados. Os extratos recém extraídos foram suplementados com 500 µM de diamida e o efeito deste tratamento na degradação de NO foi analisado. Como pode ser avaliado na Figura 23, a oxidação dos grupamentos -SH pela diamida, diminuiu quase que completamente o efeito sequestrante de NO dos extratos. Isto está de acordo com a literatura já que Fagian et al. (1990) relatou que a diamida diminui o efeito de proteínas cuja função está relacionada ao grupamento tiol. Assim, uma parte representativa do efeito seqüestrador de NO verificado nos extratos de soja pode estar relacionada à presença de grupos tíois, o que caracterizaria mais uma atividade dos extratos aqui preparados, que se refere à proteção contra o estresse nitrosativo.



**Figura 23. Atividade antinitrosativa dos extratos de soja: efeito da diamida.** Doador de NO - dea nonoato (1 $\mu$ L da solução a 0,6mg/mL) foi adicionado a 1mL de meio de reação composto por tampão fosfato 0,1M e EDTA 1mM em pH 7,0. Após a estabilização do sinal (A), 10 $\mu$ L dos extratos (35  $\mu$ g de extrato/ $\mu$ L) de cotilédone (2, 2d) ou eixo embrionário (3, 3d) de soja foram adicionados ao meio de reação. Em (2d) e (3d) os extratos foram previamente tratados com 500  $\mu$ M de diamida.

#### **4.10 Atividade proliferativa/inibitória dos extratos de soja ricos em agliconas em células tumorais de mama (MCF-7)**

A atividade antiproliferativa de flavonóides vem sendo bem documentada em várias linhagens de células tumorais humanas (Kuntz et al., 1999). No entanto, alguns estudos sobre linhagens de células tumorais dependentes de estrogênio vêm mostrando que alguns flavonóides, dependendo da concentração, exibem tanto efeitos proliferativos quanto antiproliferativos (Pedro et al., 2006). Este efeito promotor de crescimento celular tem sido atribuído às isoflavonas, principalmente à genisteína, que pode competir com o estradiol para o receptor de estrogênio (Wang et al., 1996). Enquanto o efeito estimulador das isoflavonas parece ser mediado via receptores de estrogênio, o efeito antiproliferativo parece envolver uma via celular independente do receptor estrogênico, uma vez que este efeito também é observado em células tumorais de mama que não expressam o receptor, como as células MDA-MB-231 (Collins-Burow et al., 2000).

Sendo os extratos de soja preparados uma boa fonte de flavonóides, principalmente das formas bioativas, seus efeitos em linhagem de células de adenocarcinoma de mama humana receptor-positivo para estrógeno foram avaliados. Inicialmente verificou-se o efeito dos extratos de cotilédone e embrião de soja tratados com SNP na atividade mitocondrial (MTT) de células MCF-7. Conforme mostra a Tabela 7, em ambas as densidades celulares testadas inicialmente (3.500 e 7000 células/poço) não houve diferenças significativas entre as concentrações dos extratos (31,25 a 250 µg/mL) e os controles (controle e DMSO) na redução do MTT. Também não foram verificadas diferenças significativas entre os tempos de tratamento (24 e 48 h). Estes resultados poderiam estar refletindo a baixa densidade celular utilizada nos ensaios, fato este que pode alterar os resultados, ou seja, alguns efeitos podem ficar mascarados ou não detectáveis quando avaliados em pequenas quantidades celulares (Han et al., 2009). Assim, em outros testes foram avaliados o efeito dos extratos em maiores densidades celulares ( $10 \times 10^4$  células/poço) e concentrações dos extratos (500 e 1000 µg/mL).

**Tabela 7.** Efeito dos extratos de soja enriquecidos em agliconas na atividade mitocondrial (MTT) de células MCF-7

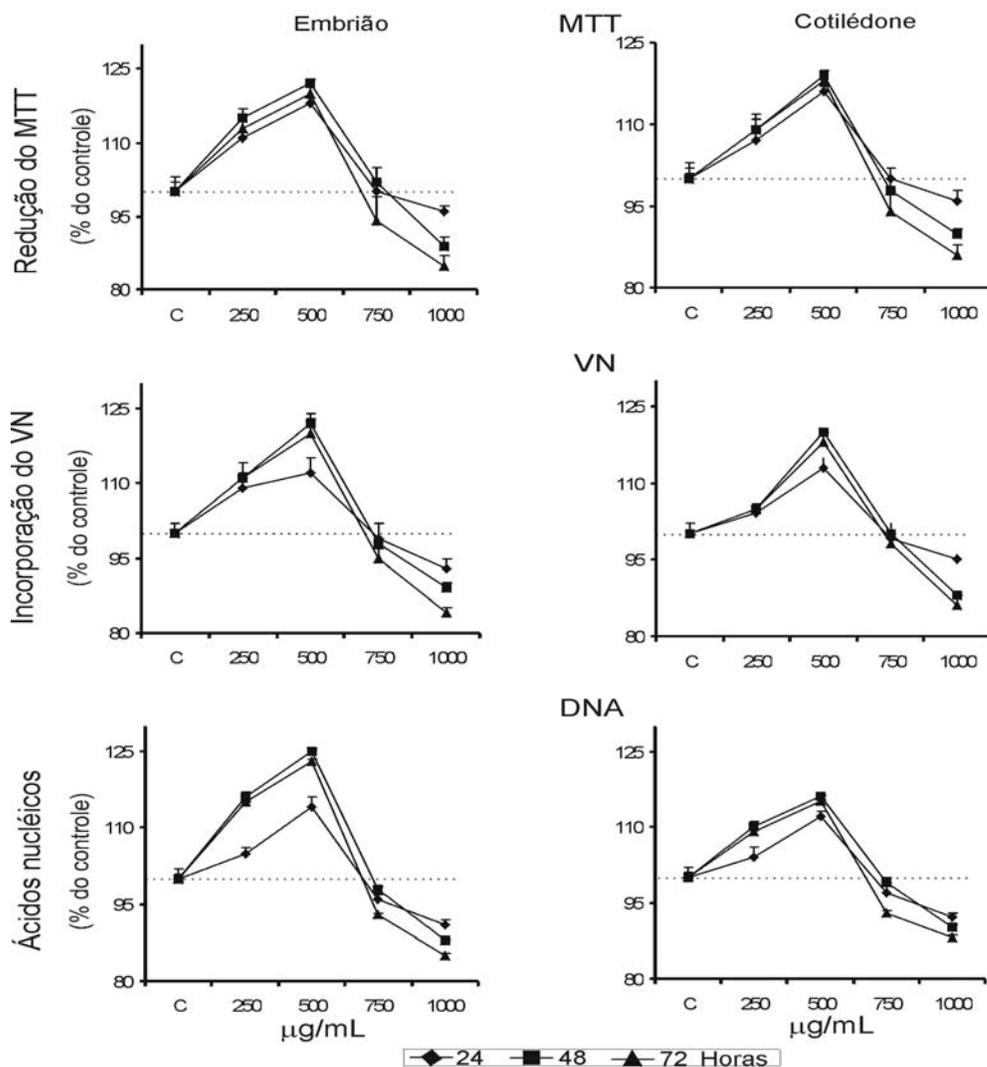
Horas		Eixo embrionário (µg/ml)					Densidade de plaqueamento
	<i>Controle</i>	<i>Controle- DMSO</i>	<i>31.25</i>	<i>62.5</i>	<i>125</i>	<i>250</i>	
24	0,16±0,008	0,14±0,019	0,14±0,012	0,13±0,013	0,16±0,013	0,15±0,011	3500 células/poço
48	0,19±0,012	0,16±0,005	0,17±0,01	0,15±0,013	0,15±0,002	0,15±0,007	3500 células/poço
24	0,33±0,021	0,28±0,15	0,30±0,02	0,31±0,02	0,28±0,02	0,26±0,015	7000 células/poço
48	0,32±0,015	0,39±0,04	0,35±0,034	0,37±0,022	0,39±0,045	0,42±0,051	7000 células/poço
Horas		Cotilédone (µg/ml)					Densidade de plaqueamento
	<i>Controle</i>	<i>Controle- DMSO</i>	<i>31,25</i>	<i>62,5</i>	<i>125</i>	<i>250</i>	
24	0,16±0,008	0,14±0,019	0,14±0,013	0,16±0,023	0,16±0,014	0,15±0,017	3500 células/poço
48	0,19±0,012	0,16±0,005	0,18±0,005	0,17±0,006	0,17±0,011	0,18±0,007	3500 células/poço
24	0,33±0,021	0,28±0,15	0,32±0,032	0,30±0,041	0,30±0,021	0,33±0,019	7000 células/poço
48	0,32±0,015	0,39±0,04	0,34±0,038	0,32±0,011	0,34±0,042	0,36±0,041	7000 células/poço

\* Na mesma linha, não houve diferença significativa entre os tratamentos ( $p < 0,05$ )

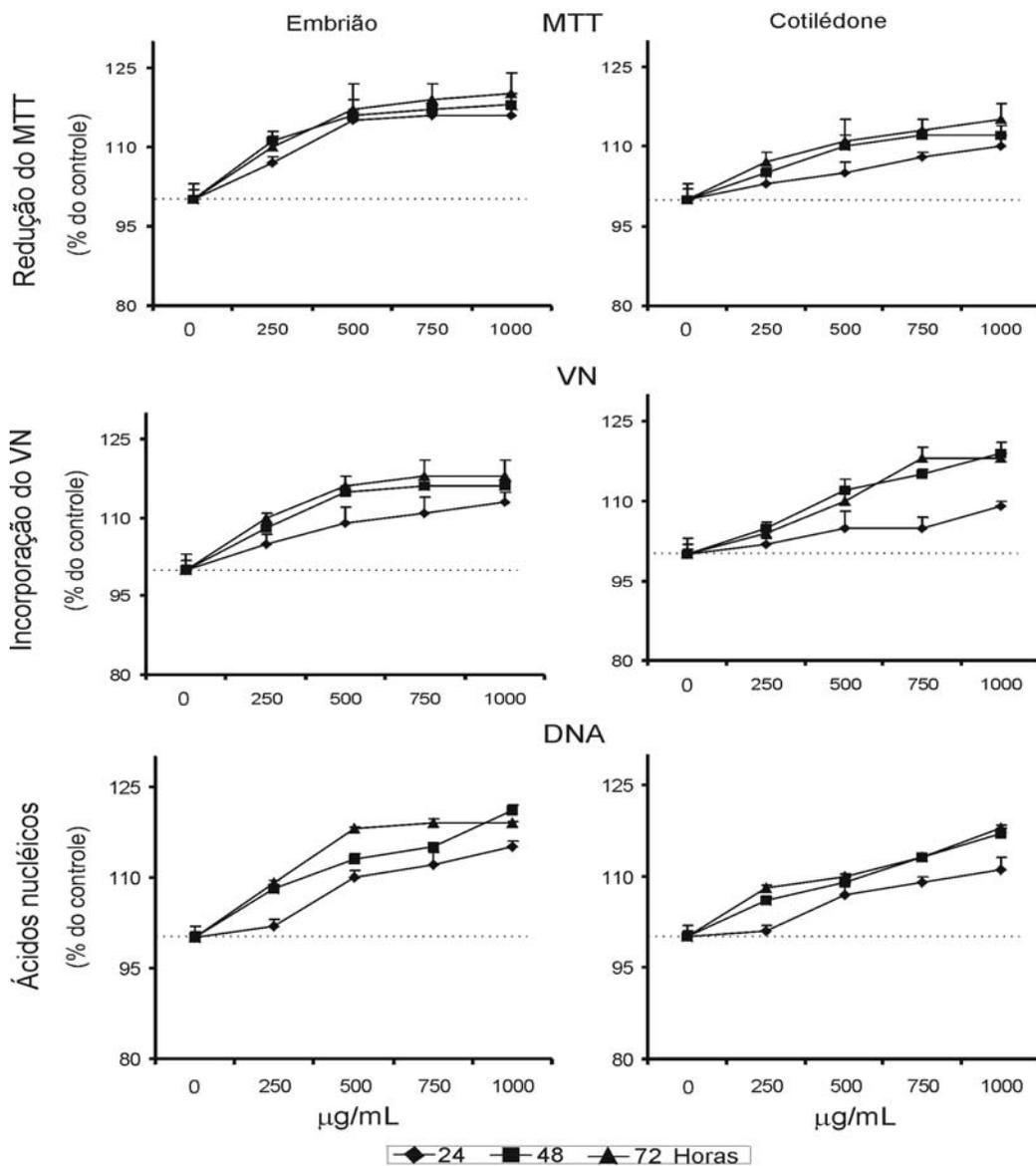
Ainda, além de 24 e 48 horas, também foram avaliados os efeitos dos extratos após 72 horas de tratamento. Nestes testes foram determinadas, além da atividade mitocondrial (redução do MTT), a atividade lisossômica e viabilidade celular (incorporação de VN) e a quantificação de ácidos nucléicos (atividade proliferativa/inibitória). Como mostrado na Figura 24, na concentração de 250 µg/mL os extratos de eixo embrionário apresentaram um efeito proliferativo, que foi mais acentuado em 48 horas, com aumento de 15% nas atividades das desidrogenases (MTT), acompanhado de um aumento da viabilidade celular (VN) de 11% e da concentração de ácidos nucléicos de 16%, em relação ao controle. Com o aumento de concentração do extrato de eixo embrionário para 500 µg/mL, o efeito proliferativo se mostrou mais acentuado e, após 48 horas, a atividade das desidrogenases mitocondriais e a viabilidade celular se elevaram em 22% e a concentração de ácidos nucléicos em 25%. Um efeito semelhante pôde ser também observado quando as células foram tratadas com o extrato de cotilédone, sendo que, após 48 h de tratamento com 250 µg/mL, verificou-se um aumento de 9, 5 e 10% nos testes com MTT, VN e DNA, respectivamente, em relação ao controle. Com 500 µg/mL o efeito proliferativo chegou a um aumento de quase 20%, visto pelos testes de MTT, VN e DNA (Figura 24). Entretanto quando se avaliou concentrações acima de 500 µg/mL foi observada uma diminuição gradual e dose-dependente no crescimento e viabilidade das células MCF-7, o que pode caracterizar um efeito citotóxico e inibitório dos extratos de soja tratados com SNP. Este efeito foi mais evidenciado em 72 horas, quando foi observado 15% de inibição do MTT, VN e DNA com o extrato de eixo embrionário e 14% com o de cotilédone, em relação ao tratamento controle. Estes resultados mostram que os extratos de soja enriquecidos em isoflavonas livres apresentam um efeito bifásico dose-dependente na proliferação de células MCF-7. Diferentemente, este efeito bifásico não foi observado quando as células MCF-7 foram expostas às mesmas doses de extratos que não haviam sido tratados com SNP. Neste caso houve apenas um leve efeito proliferativo em função do tempo de tratamento e dose do extrato. Assim, como pode ser na avaliado na Figura 25, somente a partir de 48 horas de tratamento os extratos, na dose de 500 µg/mL, apresentaram um efeito

proliferativo de 15% nas atividades das desidrogenases (MTT), acompanhado de um aumento da viabilidade celular (VN) de 14% e da concentração de ácidos nucléicos de 10%. Com o aumento de concentração do extrato de eixo embrionário para 750 µg/mL, o efeito proliferativo não mostrou grandes alterações em relação à concentração de 500 µg/mL, chegando a 17% com 1000 µg/mL em 72 horas. Um efeito semelhante pôde ser também observado quando as células foram tratadas com o extrato de cotilédone, sendo que, após 48 h de tratamento com 500 µg/mL, verificou-se um aumento de 10, 11 e 10% nos testes com MTT, VN e DNA, respectivamente. O efeito proliferativo máximo foi verificado com 1000 µg/mL em 72 horas chegando a um aumento de quase 17%, visto pelos testes de MTT, VN e DNA (Figura 25).

A diferença de resposta das células MCF-7 quando expostas aos extratos de soja tratados (Figura 24) e não tratados (Figura 25) com SNP, pode estar relacionada aos diferentes conteúdos de isoflavonas entre as preparações. Assim, como os extratos não tratados com SNP apresentam baixas concentrações de agliconas e de isoflavonas no geral, seus efeitos foram apenas levemente proliferativos, efeito semelhante àquele provocado pelas menores doses dos extratos tratados com SNP. Já estes, por serem enriquecidos em isoflavonas livres, foram capazes de provocar um efeito inibitório na proliferação das células MCF-7 nas doses mais elevadas. A ação bifásica das isoflavonas poderia explicar os resultados aqui obtidos com os extratos de soja e estaria de acordo com resultados de outros trabalhos com células de carcinoma de mama. Na presença de baixas concentrações de estradiol, algumas isoflavonas apresentaram um efeito proliferativo dose-dependente em células MCF-7 (Wang et al., 1998). O mesmo efeito aditivo das isoflavonas ao estradiol na proliferação tumoral foi verificado por Casanova et al. (1999). Em contraste, em ambientes com altas concentrações de estradiol algumas isoflavonas apresentaram modestos efeitos inibitórios (Zava et al., 1997). Ainda, a genisteína estimulou células tumorais de mama na ausência de estradiol e inibiu o efeito proliferativo do estradiol quando este estava em altas concentrações (Miodini et al., 1998).



**Figura 24. Ação dos extratos de soja eliciados com SNP na proliferação de células MCF-7.** As células foram tratadas nos tempos e nas concentrações indicadas de extrato de eixo embrionário ou cotilédone e os efeitos foram comparados com o controle (sem tratamento). Foram avaliadas as atividades das desidrogenases mitocondriais (MTT), a viabilidade celular (VN) e a proliferação/inibição (DNA). Os pontos mostrados representam à média e o desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata.



**Figura 25. Ação dos extratos de soja “*in natura*” (sem tratamento com SNP) na proliferação de células MCF-7.** As células foram tratadas nos tempos e nas concentrações indicadas de extrato de eixo embrionário ou cotilédone e os efeitos foram comparados com o controle (sem tratamento). Foram avaliadas as atividades das desidrogenases mitocondriais (MTT), a viabilidade celular (VN) e a proliferação/inibição (DNA). Os pontos mostrados representam à média e o desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata.

Com o objetivo de verificar se a ação proliferativa/inibitória dos extratos de soja poderia também ser provocada em células normais, a ação dos extratos na toxicidade e viabilidade de células de fibroblasto de camundongo (3T3) foi comparada com a provocada nas células MCF-7. As células 3T3 já estão bem caracterizadas como controles na ação de drogas e substâncias candidatas a fármaco (Cristovam et al., 2008). Como pode ser visto na Figura 26, o efeito proliferativo/inibitório dose-dependente provocado pelos extratos enriquecidos em agliconas nas células MCF-7, não foi observado nas células 3T3. Ambos os extratos de eixo embrionário e cotilédone não demonstraram significativas diferenças na atividade das desidrogenases mitocondriais (MTT) em relação ao controle nos diferentes tempos analisados. Somente com 1000 µg/mL dos extratos em 72 horas houve um leve aumento na atividade das desidrogenases mitocondriais (MTT). Entretanto este aumento não foi superior a 12% e também não houve qualquer diferença em relação ao controle na viabilidade celular (VN) e proliferação/inibição (DNA) nos tempos dos testes (dados não mostrados). Isso demonstra que ambos os extratos de soja tratados com SNP não causam alterações significativas na proliferação de células normais do tipo 3T3, provavelmente por estas células não apresentarem os mesmos receptores de ligação das células MCF-7.

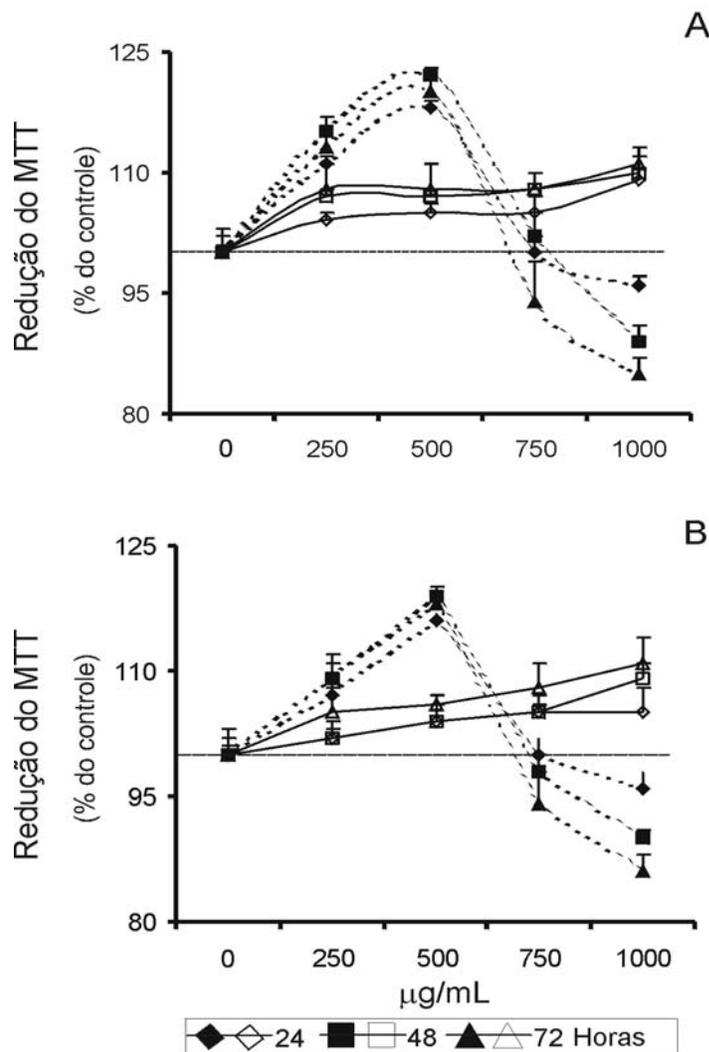
A ação de um extrato de soja comercial (extrato comercial 2) cujo perfil de composição se mostrou bem semelhante aos extratos tratados com SNP, no que se refere à concentração de agliconas (Tabela 5) foi também avaliada. Como pode ser visto na Figura 27, o extrato comercial teve um efeito bem semelhante ao dos extratos de eixo embrionário e cotilédone, no que se refere à atividade proliferativa/inibitória. Entretanto, embora o efeito inibitório tenha sido praticamente o mesmo, o efeito proliferativo foi bem mais acentuado, principalmente em 72 horas de tratamento na dose de 500 µg/mL, quando foi observado um aumento de 72, 37 e 95% no MTT, VN e DNA, respectivamente. Isso corrobora a proposição de que o efeito proliferativo possa estar relacionado ao receptor de estrogênio e o efeito inibitório seja independente deste receptor, uma vez que a quantidade de

agliconas no produto comercial era um pouco superior que a dos extratos produzidos após eliciação dos tecidos de soja com SNP (Tabela 5).

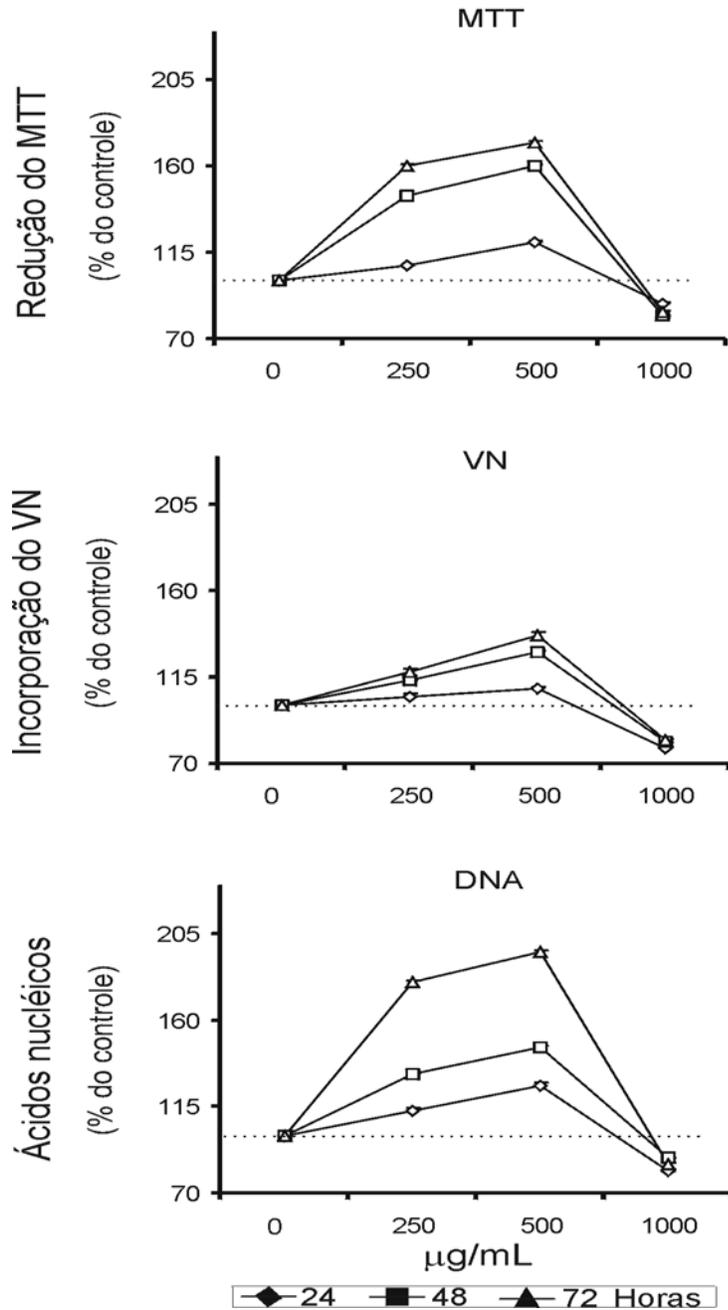
Para verificar se realmente a ação proliferativa dos extratos em células MCF-7 poderia estar relacionada ao conteúdo de isoflavonas, avaliamos o efeito das formas agliconas em um intervalo de concentração (0,125 – 0,5 µg/mL) correspondente àquelas dos extratos com efeito proliferativo. Como pode ser observado na Figura 28, as isoflavonas agliconas apresentaram efeito de proliferação das células tumorais dose-dependente em relação ao controle, principalmente em 72 horas. Houve um aumento das desidrogenases em 49, 18 e 63%, da viabilidade celular em 25, 13 e 30% e da concentração de DNA em 53, 40 e 86%, nas células tratadas com daidzeína, gliciteína e genisteína, respectivamente. Estes resultados estão de acordo com as observações de que a genisteína na dieta (750 mg/g) estimulou o crescimento de células MCF-7 implantadas por via subcutânea, em camundongos cujo útero foi retirado (Hsieh et al., 1998) e que doses de proteína isolada de soja contendo várias concentrações de genisteína (15, 150 e 300 mg/g) estimularam o aumento do tumor da mesma forma que a verificada com a genisteína isolada (Allred, 2001). Isso evidencia os resultados mostrados no presente estudo e que já são amplamente descritos na literatura de que a genisteína é a aglicona de soja com o efeito estrogênico mais acentuado. E, como já discutido anteriormente, em um ambiente de baixa concentração hormonal, como é o caso do nosso delineamento experimental, as isoflavonas tendem a se comportar como o próprio hormônio devido a sua semelhança estrutural, ou seja, aumentando a proliferação do tecido da mama. Entretanto, foi possível também verificar um efeito inibitório moderado dos extratos nas concentrações mais elevadas.

Na tentativa de explicar estes resultados procurou-se avaliar o envolvimento do óxido nítrico no efeito dos extratos enriquecidos em isoflavonas agliconas na proliferação das células MCF-7, uma vez que este radical está amplamente envolvido em diversas ações biológicas, incluindo as tumorais (Loibl et al., 2006). A Figura 29A mostra que nas primeiras 24 horas não há qualquer diferença entre os tratamentos e o controle que esclareça a relação entre o NO e o efeito dos

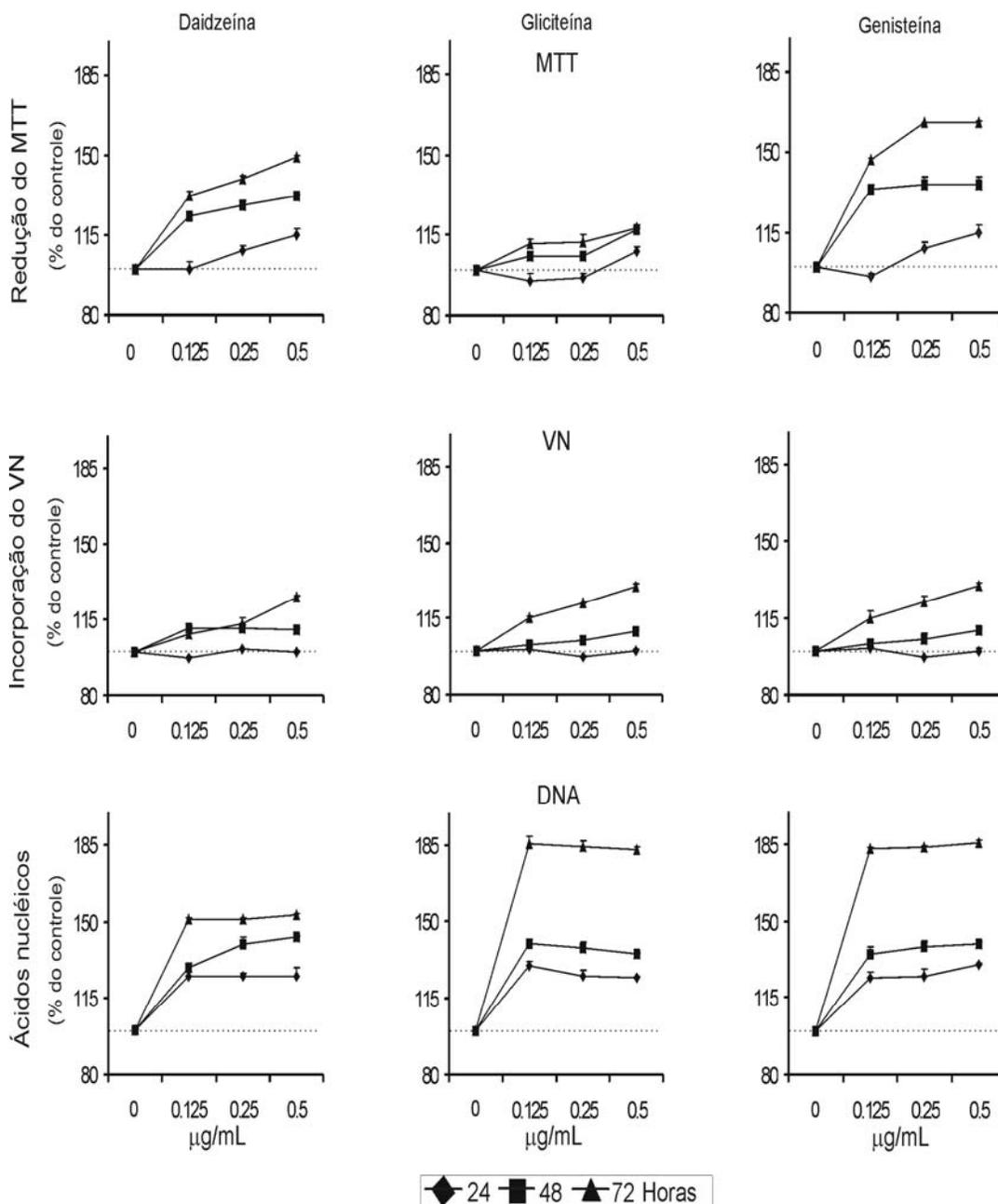
extratos nas células tumorais. Já em 48 e 72 horas pode-se verificar que há um aumento da produção de NO dose-dependente em torno de 15 e 40 % respectivamente, em relação às células controle, indicando que as isoflavonas podem estar estimulando a produção de NO nas células MCF-7. Diferentemente, as células normais (3T3) não mostraram em nenhum dos tempos avaliados qualquer alteração significativa nos níveis de NO produzidos (Figura 29A). Ainda, na presença de L-NAME, um inibidor seletivo da NOS, o efeito dos extratos na emissão de NO pelas células MCF-7 foi revertido (Figura 29B). Estes resultados sugerem que os efeitos bifásicos dos extratos na proliferação das células MCF-7 podem envolver a regulação dos níveis celulares de NO, via NOS. A exata consequência da produção de NO por células tumorais ainda não está bem definida. A pequena meia vida do NO pode ser responsável por esta dificuldade de se avaliar com clareza sua ação no desenvolvimento do câncer (Gattia et al., 2004). Entretanto já está claro que o NO afeta o crescimento, diferenciação e a capacidade de metástase. Isso é devido à grande bioatividade deste radical. Trabalhos recentes têm demonstrado que o estrogênio modula a eNOS e que as isoflavonas podem atuar como agonistas ou antagonistas do estrogênio dependendo da quantidade e de hormônios presentes no meio celular (Pance, 2006; Thonsen et al., 1997). Deste modo as isoflavonas podem tanto exercer efeitos proliferativos como apoptóticos nas células positivas para o receptor estrogênico. Os resultados do presente trabalho dão suporte a estas proposições. Em determinadas concentrações as isoflavonas exercem efeito proliferativo, provavelmente devido a sua ação estrogênica junto ao receptor o que levaria a ativação da eNOS e a produção de níveis citoprotetores e proliferativos de NO. De acordo com outros autores, o estrogênio pode modular o nível de NO e levar a célula a proliferar (Thamrongwittawatpong et al., 2001). Com o aumento da concentração de isoflavonas este efeito é provavelmente revertido, pois o aumento dos níveis de NO, estimulado pelas isoflavonas, passaria a ser deletério para a célula, levando-a a morte.



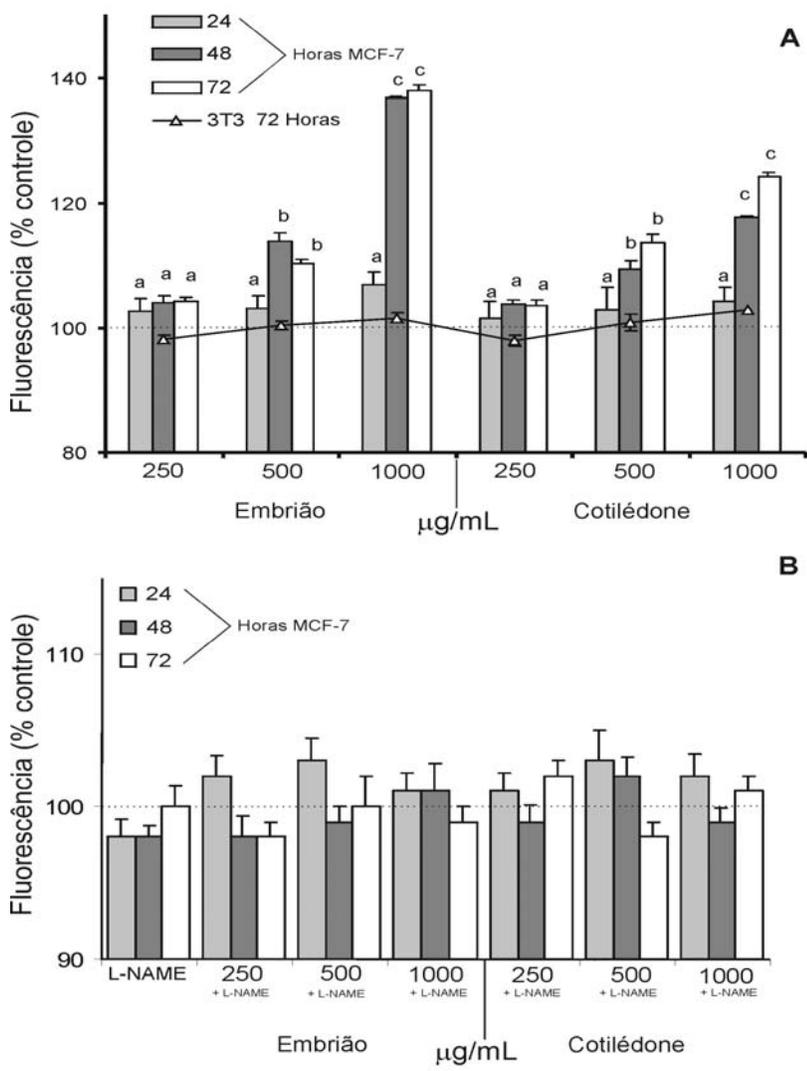
**Figura 26. Ação comparativa dos extratos de soja eliciados com SNP nas atividades das desidrogenases mitocondriais (MTT) de células normais 3T3 (-) e tumorais MCF-7 (...). As células foram tratadas nos tempos e nas concentrações indicadas de extrato de eixo embrionário (A) e cotilédone (B) e os efeitos foram comparados com o controle (sem tratamento). Os pontos mostrados representam à média e o desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata.**



**Figura 27. Avaliação do efeito de um produto comercial rico em agliconas de soja em células MCF-7 em três diferentes tempos de tratamento.** O produto comercial foi avaliado nas mesmas concentrações e condições do experimento descrito na figura 24. Os três experimentos independentes foram realizados em triplicata. Os pontos mostrados representam à média e o desvio padrão.



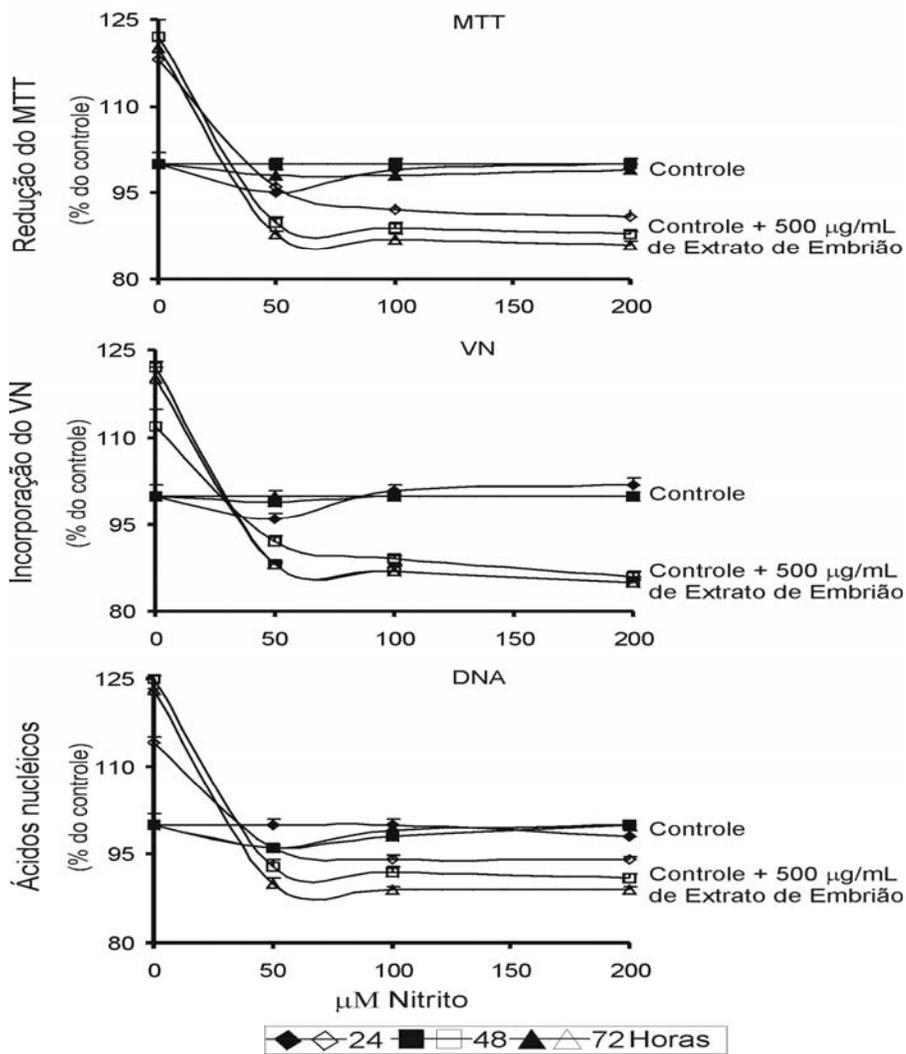
**Figura 28. Efeito das agliconas de soja em células tumorais de mama (MCF-7).** As células foram tratadas com três diferentes concentrações de daidzeína, gliciteína e genisteína (conforme indicado) e os efeitos no MTT, VN e DNA foram comparados com o controle (sem tratamento) em 24, 48 e 72 horas. Os pontos mostrados representam à média e o desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata.



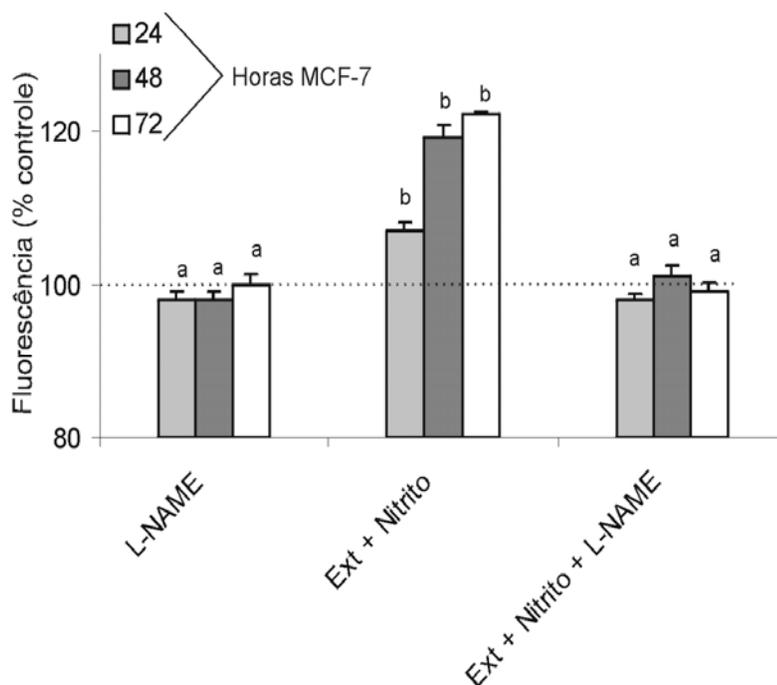
**Figura 29. Efeito dos extratos de soja na emissão de NO em células tumorais de mama (MCF-7) e normais (3T3).** (A) As células foram tratadas com três diferentes concentrações de extrato de eixo embrionário ou de cotilédone eliciados por SNP (conforme indicado) e os efeitos na produção de NO foram comparados com o controle (sem tratamento) em 24, 48 e 72 horas. (B) As células foram tratadas com três diferentes concentrações de extrato de eixo embrionário ou de cotilédone eliciados por SNP (conforme indicado) na presença de 1mM de L-NAME (inibidor seletivo da NOS). Os três experimentos independentes foram realizados em triplicata: para cada tempo de tratamento, médias com letras diferentes são significativamente diferentes ao nível de 0,05.

O efeito aditivo do nitrito à ação dos extratos de soja na proliferação das células MCF-7, também foi avaliado, já que o nitrito é uma das possíveis fontes de NO do organismo humano, além de ser um composto facilmente obtido na dieta, principalmente de produtos vegetais (Lundberg et al., 2008). Como pode ser verificado na Figura 30, o nitrito, nas concentrações testadas de 50, 100 e 200  $\mu\text{M}$ , não apresentou qualquer efeito sobre a proliferação/inibição das células tumorais. Já quando em associação com o extrato de eixo embrionário na concentração de 500  $\mu\text{g/mL}$ , principalmente em 72 horas, provocou um moderado efeito inibitório celular dose-dependente com diminuição de 14, 15 e 11% de MTT, VN e DNA, respectivamente, quando comparado aos valores do controle (sem nitrito). Entretanto, o extrato sozinho na concentração de 500  $\mu\text{g/mL}$  apresentou um efeito proliferativo acentuado verificando-se após 72h, um aumento de 20, 20 e 25% no MTT, VN e DNA, respectivamente (conforme também mostrado na Figura 24). Assim, na presença de nitrito, a ação proliferativa do extrato foi revertida, causando uma inibição de 34, 35 e 36% no MTT, VN e DNA, respectivamente (Figura 30). Na presença de nitrito, as células tratadas com o extrato emitiram mais NO, entretanto este aumento nos níveis de NO foi revertido na presença de L-NAME (Figura 31). Estes resultados sugeriram que o nitrito não estaria atuando como fonte de NO. Isso é bem interessante, pois já foi reportado que o nitrito pode modificar o receptor estrogênico de células e assim atuar com um efeito semelhante ao próprio hormônio (Veselik, 2008). Desta forma, este efeito do nitrito poderia resultar de uma ação sinérgica a das isoflavonas, na ativação do receptor hormonal.

Logo, podemos concluir que os extratos podem exercer um efeito bifásico na fisiologia de células de adenocarcinoma de mama. Os efeitos proliferativos podem estar relacionados à ação destes compostos no receptor estrogênico levando à ativação da NOS resultando numa produção citoprotetora de NO favorecendo a proliferação. Já o estímulo na atividade NOS por elevadas concentrações de isoflavonas tornariam os níveis de NO prejudiciais às células levando-as a morte, principalmente quando associados ao nitrito, que agiria de maneira sinérgica aos extratos na ativação dos receptores estrogênicos.



**Figura 30. Ação sinérgica dos extratos de eixo embrionário com nitrito em células MCF-7.** As células foram tratadas com diferentes concentrações de nitrito (50, 100 e 200µM) na presença ou não de 500 µg/mL de extrato de eixo embrionário eliciado com SNP por 20 horas. Os efeitos no MTT, VN e DNA foram avaliados após 24, 48 e 72 horas. Os três experimentos independentes foram realizados em triplicata. Os pontos mostrados representam à média e o desvio padrão.



**Figura 31. Efeito sinérgico dos extratos de soja com nitrito na emissão de NO em células tumorais de mama (MCF-7) revertido na presença de L-NAME. (B)** As células foram tratadas com 100  $\mu$ M de nitrito e 500  $\mu$ g/mL de extrato de eixo embrionário eliciado com SNP por 20 horas na presença ou não de L-NAME. Controles foram realizados na presença e ausência (pontilhado) de L-NAME em 24, 48 e 72 horas. Os três experimentos independentes foram realizados em triplicata: para cada tempo de tratamento, médias com letras diferentes são significativamente diferentes ao nível de 0,05.

## 5 – CONCLUSÕES

O nitroprussiato de sódio (SNP), um clássico doador do radical óxido nítrico (NO), mostrou efetividade dose-dependente, no aumento da produção de compostos bioativos em sementes de soja. Estes compostos foram predominantemente exudados dos tecidos de soja expostos ao agente indutor, sendo que o eixo embrionário forneceu o melhor rendimento. A presença dos compostos produzidos nos extratos foi confirmada por espectrometria de massas. Considerando que a metodologia desenvolvida apresenta rendimento significativo e de baixo custo, esta pode ser promissora para produção de suplementos à base de soja enriquecidos em compostos bioativos, entre eles, as formas mais ativas das isoflavonas, as agliconas.

Os extratos produzidos após tratamento dos tecidos de soja com o agente indutor SNP apresentaram significativa capacidade de estimular a produção de NO em pH ácido a partir da redução de nitrito e esta atividade foi relacionada à presença de alguns ácidos fenólicos, como gálico, caféico e *p*-coumárico. Também ficaram evidenciadas as ações antioxidante e antinitrosativa dos extratos em meio neutro, que foram atribuídas à presença das isoflavonas agliconas e de grupamentos tióis, respectivamente. Além disso, os extratos mostraram efeitos bifásicos na proliferação de células tumorais, ou seja, uma ação promotora nas menores doses e inibitória nas doses mais elevadas, que foi acentuada na presença de nitrito.

Concluindo, a metodologia aqui desenvolvida tem potencial para ser aplicada na produção de suplementos com ações benéficas ao organismo, além das já descritas na literatura, como, por exemplo, a geração de NO em meio estomacal e atividade contra espécies reativas de nitrogênio, após absorção. Em doses mais elevadas poderão também prevenir a proliferação de células tumorais, principalmente na presença de nitrito, composto normalmente presente na dieta. Logo, os extratos de soja enriquecidos em compostos bioativos se mostraram promissores quanto ao potencial uso como um suplemento nutricional e terapêutico (nutracêutico).

## 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adlercreutz H. (1995) **Phytoestrogens: epidemiology and a possible role in cancer protection.** *Environ. Health Perspect.* **103**: 103-112.

Amano F, Noda T. (1995) **Improved detection of nitric oxide radical (NO.) production in an activated macrophage culture with a radical scavenger, carboxy PTIO and Griess reagent.** *FEBS letters* **368**: 425-428.

Ambs S, Hussain SP, Harris CC. (1997) **Interactive effects of nitric oxide and the p53 tumor suppressor gene in carcinogenesis and tumor progression.** *FASEB J.* **11**: 443-448.

Ascenzi P, Bocedi A, Gradoni L. (2003) **The anti-parasitic effects of nitric oxide.** *IUBMB Life* **55**: 573-578.

Augusto O, Bonini MG, Miyamoto S, Di Mascio P. (2004) **Production of the carbonate radical anion during xanthine oxidase turnover in the presence of bicarbonate.** *J. Biol. Chem.* **279**: 51836-43.

Bajer T, Adam M, Galla L, Ventura K. (2007) **Comparison of various extraction techniques for isolation and determination of isoflavonoids in plants.** *J.Sep.Sci.* **30** (1): 122-7.

Beligni MV, Lamattina L. (2000). **Nitric oxide stimulates seed germination, de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants.** *Planta* **210**: 215–221.

Benjamin N, O'Driscoll F, Dougall H, Duncan C, Smith L, Golden M, McKenzie H. (1994) **Stomach NO synthesis.** *Nature* **368**: 502.

Brenna OV, Pagliarini E. (2001) **Multivariate Analysis of Antioxidant Power and Polyphenolic Composition in Red Wines.** *J. Agric. Food Chem.* **49**: 4841-4844.

Brenner DE. (2000) **Multiagent chemopreventive agent combinations.** *J. Cell. Biochem. Suppl.* **34**: 121–124.

Bryan NS. (2006) **Nitrite in nitric oxide biology: cause or consequence? A systems-based review.** *Free. Rad. Biol. Med.* **41**: 691-701.

Cabanes A, Wang M, Olivo S, DeAssis S, Gustafsson JA, Khan G. (2004) **Prepubertal estradiol and genistein exposures up-regulate BRCA1 mRNA and reduce mammary tumorigenesis.** *Carcinogenesis* **25**: 741–748.

Casanova M, You L, Gaido KW, Archibeque-Engle S, Janszen DB, Heck HA. (1999) **Developmental effects of dietary phytoestrogens in Sprague-Dawley rats and interactions of genistein and daidzein with rat estrogen receptors alpha and beta in vitro.** *Toxicol. Sci.* **51**: 236–244.

Chae CU, Ridker PM, Manson JE. (1997) **Postmenopausal hormone replacement therapy and cardiovascular disease.** *Thromb. Haemost.* **78**: 770-780.

Collins-Burow BM, Burow ME, Duong BN, McLachlan JA. (2000) **Estrogenic and antiestrogenic activities of flavonoid phytochemicals through estrogen receptor binding-dependent and independent mechanisms.** *Nutr. Cancer* **38**: 229–244.

Cornille P, Battesti C, Agnel J-P, Montillet J-L. (1998) **Evidence against a role of lipid peroxidation in the induction of glyceollin biosynthesis in *Glycine max.*** *Plant Physiol. Biochem.* **36**: 525-532.

Coward L, Barnes NC, Setchell KDR, Barnes S. (1993) **Genistein, daidzein, and their  $\beta$ -glycoside conjugates: Antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets.** *J. Agric. Food Chem.* **41**: 1961-1967.

Cristovam PC, Glória MA, Melo, Gustavo BG, José ÁP. (2008) **Importance of 3T3 feeder layer to establish epithelial cultures from cell suspension obtained from corneo-scleral rims.** *Arq. bras. oftalmol.* **71**: 689-694.

Delledonne M, Xia Y, Dixon RA, Lamb C. (1998) **Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance.** *Nature* **394**: 585–588.

Dixon RA, Ferreira D. (2002) **Genistein.** *Phytochemistry* **60**: 205-211.

Durner J, Wendehenne D, Klessig DF. (1998) **Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose.** Proceedings of the National Academy of Sciences **95**: 10328–10333.

Elangovan V, Sekar N, Govindasamy S. (1994) **Chemopreventive potential of dietary bioflavonoids against 20-methylcholanthrene-induced tumorigenesis.** *Cancer Lett.* **87**(1):107-13. Errata em: *Cancer Lett.* **88** (1):119-20.

Fagian MM, Pereira-da-Silva L, Martins IS, Vercesi AE. (1990) **Membrane protein thiol cross-linking associated with the permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca<sup>2+</sup> plus prooxidants.** *J. Biol. Chem.* **265**: 19955-60.

Ferguson DB. (1998) **Salivary electrolytes.** In: Tenovuo JO, editor. *Human saliva: clinical chemistry and microbiology*, vol. 1. Boca Raton: CRC Press; p. 75—100.

Fotsis T, Pepper M, Adlercreutz H, Hase T, Montesano R.; Schweigerer L. (1995) **Genistein, a dietary ingested isoflavonoid, inhibits cell proliferation and in vitro angiogenesis.** *J. Nutr.* **125**: 790S-797S.

Frankel LB, Lykkesfeldt AE, Hansen JB, Stenvang J. (2006) **Protein Kinase C alpha is a marker for antiestrogen resistance and is involved in the growth of tamoxifen resistant human breast cancer cells.** *Breast Cancer Res. Treat.* **104**:165-79.

Freshney RI. (1987) **Culture of animal cells: a manual of a basic technique.** 2 ed. NewYork: Willey-Liss, p.397.

Gago B, Lundberg JO, Barbosa RM, Laranjinha J. (2007) **Red wine-dependent reduction of nitrite to nitric oxide in the stomach.** *Free Radical Biology and Medicine* **43**: 1233-1242.

Gattia G, Simseka S, Zurridda S, Kurnec A, Giannettia I, Demirerd S, Smeetsa A, Caldarella P, Ventoa AR, Giraldo A, Luini A. (2004) **Possible role of nitric oxide in the biology of breast carcinoma: review of the available literature.** *The Breast* **13**: 1–6.

Gauthier N, Arnould L, Chantome A, Reisser D, Beltaieb A, Reveneau S, Jeannin JF. (2004) **To stimulate or to inhibit nitric oxide production in mammary tumors?** *Bull Cancer* **91**: 705-12.

Gotoh T, Yamada K, Ito A, Yin H, Kataoka T, Dohi K. (1998) **Chemoprevention of N-nitroso-N-methylurea-induced rat mammary cancer by miso and tamoxifen, alone and in combination.** *Jpn. J. Cancer Res.* **89**: 487-95.

Griffith AP, Collison MW. (2001) **Improved methods for the extraction and analysis of isoflavones from soy-containing foods and nutritional supplements by reversed-phase high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry.** *Journal of Chromatography A* **913**: 397–413.

Hammerschmidt R. (1999) **Phytoalexins: What Have We Learned After 60 Years?** *Annu. Rev. Phytopathol.* **37**: 285-306.

Hamuro M, Polan J, Natarajan M, Mohan S. (2002) **High glucose induced nuclear factor kappa B mediated inhibition of endothelial cell migration.** *Atherosclerosis.* **162**: 277-87.

Harborne J.B. (1999) **The comparative biochemistry of phytoalexin induction in plants.** *Biochem. System. Ecol.* **27**: 335-367.

Havsteen BH. (2002) **The biochemistry and medical significance of the flavonoids.** *Pharmacol Ther.* **96**: 67-202.

Haynes V, Elfering SL, Squires RJ, Traaseth N, Solien J, Ettl A, Giulivi C. (2003) **Mitochondrial nitric-oxide synthase: role in pathophysiology.** *IUBMB Life* **55**: 599-603.

Hodgin JB, Knowles JW, Kim HS, et al. (2002) **Interactions between endothelial nitric oxide synthase and sex hormones in vascular protection in mice.** *J. Clin. Invest.* **109**: 541-548.

Hsieh CY, Santell RC, Haslam SZ, Helferich WG. (1998) **Estrogenic effects of genistein on the growth of estrogen receptor-positive human breast cancer (MCF-7) cells in vitro and in vivo.** *Cancer Res.* **58**: 3833–3838.

Hsu JT, Ying C, Chen CJ. (2000) **Regulation of inducible nitric oxide synthase by dietary phytoestrogen in MCF-7 human mammary cancer cells.** *Reprod. Nutr. Dev.* **40**: 11-18.

Hvattum E. (2002) **Determination of phenolic compounds in rose hip (*Rosa canina*) using liquid chromatography coupled to electrospray ionisation tandem mass spectrometry and diode-array detection.** *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **16**: 655-62.

Hwang CS, Kwak HS, Lim HJ, Lee SH, Kang YS, Choe TB, Hur HG, Han KO. (2006) **Isoflavone metabolites and their in vitro dual functions: They can act as an estrogenic agonist or antagonist depending on the estrogen concentration.** *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* **101**: 246-253.

Jadeski LC, Hum KO, Chakraborty C, Lala PK. (2000) **Nitric oxide promotes mammary tumor growth and metastasis by stimulating tumour cell migration, invasiveness and angiogenesis.** *Int. J. Cancer* **86**: 30–39.

Jo EH, Kim SH, Ra JC, Kim SR, Cho SD, Jung JW, Yang SR, Park JS, Hwang JW, Aruoma OI, Kim TY, Lee YS, Kang KS. (2005) **Chemopreventive properties of the ethanol extract of chinese licorice (*Glycyrrhiza uralensis*) root: induction of apoptosis and G1 cell cycle arrest in MCF-7 human breast cancer cells.** *Cancer Let.* **230**: 239-247.

Jones DA, Cho JJ, Salamon E, Stefano GB. (2003) **Risk factors for breast cancer and the prognosis of African American women: estrogen's role.** *Med. Sci. Monit.* **9**: 111-119.

Kakizawa H, Matsui F, Tokita Y, Hirano K, Ida M, Nakanishi K, Watanabe M, Sato Y, Okumura A, Kojima S, Oohira A. (2006) **Neuroprotective effect of nipradilol, an NO donor, on hypoxic-ischemic brain injury of neonatal rats.** *Early Hum. Dev.* **83**: 535-40.

Keung WM, Vallee BL. (1993) **Daidzin: A potent, selective inhibitor of human mitochondria aldehyde dehydrogenase.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**: 1247-1251.  
Klus K, Barz W. (1998) **Formation of polyhydroxylated isoflavones from the isoflavones genistein and biochanin A by bacteria isolated from tempe.** *Phytochemistry* **47**: 1045-1048, 1998.

Konopka TE, Barker JE, Bamford TL, Guida E, Anderson RL, Stewart AG. (2001) **Nitric oxide synthase II gene disruption: implications for tumor growth and vascular endothelial growth factor production.** *Cancer Res.* **61**: 3182-7

Kuntz S, Wenzel U, Daniel H. (1999) **Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity and apoptosis in human colon cancer cell lines.** *Eur. J. Nutr.* **38**: 133–142.

Lamartiniere CA, Murrill WB, Manzolillo PA, Zhang JX, Barnes S, Zhang X. (1998) **Genistein alters the ontogeny of mammary gland development and protects against chemically-induced mammary cancer in rats.** *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **217**: 358–64.

Lin L-Z, Harnly, J. (2007) **A Screening Method for the Identification of Glycosylated Flavonoids and Other Phenolic Compounds Using a Standard Analytical Approach for All Plant Materials.** *J. Agric. Food Chem.* **55**: 1084-1086.

Lin L-Z, He X-G, Lindenmaier M, Yang J, Cleary M, Qiu S-X, Cordell GA. (2000) **LC-ESI-MS Study of the Flavonoid Glycoside Malonates of Red Clover (*Trifolium pratense*).** *J. Agric. Food Chem.* **48**: 354-365.

Loibl S, Bratengeier J, Farines V, von Minckwitz G, Spankuch B, Schini-Kerth V, Nepveu F, Strebhardt K, Kaufmann M. (2006) **Investigations on the inducible and endothelial nitric oxide synthases in human breast cancer cell line MCF-7 – estrogen has an influence on e-NOS, but not on i-NOS.** *Pathology – Research and Practice* **202**: 1–7.

Loibl S, Von Minckwitz G, Weber S, Sinn HP, Schini-Kerth VB, Lobysheva I, Nepveu F, Wolf G, Strebhardt K, Kaufmann M (2002) **Expression of endothelial and inducible nitric oxide synthase in benign and malignant lesions of the breast and measurement of nitric oxide using electron paramagnetic resonance spectroscopy.** *Cancer* **95**: 1191–1198.

Loke WM, Hodgson JM, Proudfoot JM, McKinley AJ, Puddey IB, Croft KD. (2008) **Pure dietary flavonoids quercetin and (-)-epicatechin augment nitric oxide products and reduce endothelin-1 acutely in healthy men.** *Am. J. Clin. Nutr.* **88**:1018-25.

Loke WM, Proudfoot JM, Hodgson JM, McKinley AJ, Hime N, Magat M, Stocker R, Croft KD. (2010) **Specific dietary polyphenols attenuate atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice by alleviating inflammation and endothelial dysfunction.** *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**: 749-57.

Lu Q, Pallas DC, Surks HK, Baur WE, Mendelsohn ME, Karas RH. (2004) **Striatin assembles a membrane signaling complex necessary for rapid, nongenomic activation of endothelial NO synthase by estrogen receptor alpha.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**: 17126–31.

Lundberg JO, Weitzberg E, Cole JA, Benjamin N. (2004) **Nitrate, bacteria and human health.** *Nat. Rev. Microbiol.* **2**: 593-602.

Lundberg JO, Weitzberg E, Gladwin MT. (2008) **The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics.** *Nat. Rev. Drug. Discov.* **7**: 156-67.

Matsumura A, Ghosh A, Pope GS, Darbre PD. (2005) **Comparative study of estrogenic properties of eight phytoestrogens in MCF7 human breast cancer cells.** *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* **94**: 431–443.

McCarty MF. (2006) **Isoflavones made simple – Genistein’s agonist activity for the beta-type estrogen receptor mediates their health benefits.** *Medical Hypotheses* **66**:1093–1114.

McCue P, Shetty K. (2004) **Health benefits of soy isoflavonoids and strategies for enhancement: a review.** *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **44**: 361-7.

McKnight GM, Smith LM, Drummond RS, Duncan CW, Golden M, Benjamin N. (1997) **Chemical synthesis of nitric oxide in the stomach from dietary nitrate in humans.** *Gut.* **40**: 211-4.

MerzDemlow BE, Duncan AM, Wangen KE, Xu X, Carr TP, Phipps WiR, Kurzer MS. (2000) **Soy isoflavones improve plasma lipids in normocholesterolemic, premenopausal women.** *Am. J. Clin. Nutr.* **71**: 1462-1469.

Messina M, McCaskill-Stevens W, Lampe JW. (2006) **Addressing the soy and breast cancer relationship: review, commentary, and workshop proceedings.** *J. Natl. Cancer Inst.* **98**: 1275-84.

Miksicek RJ. (1993) **Commonly occurring plant flavonoids have estrogenic activity.** *Mol. Pharmacol.* **44** (1), 37–43.

Ministério da Saúde. (2008) Estimativas de incidência e mortalidade por câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Secretaria Nacional de Assistência à Saúde, Instituto Nacional do Câncer/Conprev. Endereço:<http://www.inca.gov.br/estimativa/2008>. Acessado em 15/03/2009.

Miodini P, Fioravanti L, Di Fronzo G, Cappelletti V. (1999) **The two phytoestrogens genistein and quercetin exert different effects on estrogen receptor function.** *Br. J. Cancer* **80**: 1150–1155.

Modolo LV, Cunha FQ, Braga MR, Salgado I. (2002) **Nitric Oxide Synthase-Mediated Phytoalexin Accumulation in Soybean Cotyledons in Response to the *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *Meridionalis* Elicitor.** *Plant Physiology* **130**: 1288–1297.

Moriya A, Grant J, Mowat C, Williams C, Carswell A, Preston T, Anderson S, Iijima K, McColl KE. (2002) **In vitro studies indicate that acid catalysed generation of N-nitrosocompounds from dietary nitrate will be maximal at the gastro-oesophageal junction and cardia.** *Scand. J. Gastroenterol.* **37**: 253-61.

Morot FS. (1849) **Recherches sur la coloration des vegetaux.** *Ann. Sci. Nat.* **160**: 235.

Murrill WB, Brown NM, Zhang JX, Manzolillo PA, Barnes S, Lamartiniere CA. (1996) **Prepubertal genistein exposure suppresses mammary cancer and enhances gland differentiation in rats.** *Carcinogenesis* **17**: 1451–7.

Neill S, Desikan R, Hancock JT. (2003). **Nitric oxide signalling in plants.** *New Phytol.* **159**: 11–35.

Nie LH, Yu BS, Chen P, Yao SZ. (2001) **Simultaneous determination of nitrate and nitrite in saliva and foodstuffs by non-suppressed ion chromatography with bulk acoustic wave detector.** *Anal Sci.* **17**: 495-8.

Niu X-J, Wang Z-R, Wu S-L, Geng Z-M, Zhang Y-F, Qing L. (2004) **Relationship between inducible nitric oxide synthase expression and angiogenesis in primary gallbladder carcinoma tissue.** *World J. Gastroenterol.* **10**: 725–728.

Pance A. (2006) **Nitric oxide and hormones in breast cancer: allies or enemies?** *Future Oncol.* **2**: 275-88.

Park YK, Alencar SM, Nery IA, Aguiar CL, Sato HH. (2001) **Enrichment of isoflavone aglycones in extracted soybean isoflavones by heat and fungal beta-glucosidase.** *Food Science and Industry* **34**: 14-19.

- Patil BS, Jayaprakasha GK, Chidambara Murthy KN, Vikram A. (2009) **Bioactive compounds: historical perspectives, opportunities, and challenges.** *J. Agric. Food Chem.* **57**: 8142-8160.
- Pedro M, Lourenço CF, Cidade H, Kijjoa A, Pinto M, Nascimento MS. (2006) **Effects of natural prenylated flavones in the phenotypical ER (+) MCF-7 and ER (-) MDA-MB-231 human breast cancer cells.** *Toxicology letters.* **164**: 24-36.
- Peri L, Pietraforte D, Scorza G, Napolitano A, Fogliano V, Minetti M. (2005) **Apples increase nitric oxide production by human saliva at the acidic pH of the stomach: a new biological function for polyphenols with a catechol group?** *Free Radic. Biol. Med.* **39**: 668-81.
- Popiołkiewicz J, Polkowski K, Skierski JS, Mazurek AP. (2005) **In vitro toxicity evaluation in the development of new anticancer drugs-genistein glycosides.** *Cancer Lett.* **229** (1): 67-75.
- Romani A, Vignolini P, Galardi C, Aroldi C, Vazzana C, Heimler D. (2003) **Polyphenolic content in different plant parts of soy cultivars grown under natural conditions.** *J. Agric. Food Chem.* **51**: 5301-6.
- Romero-Puertas MC, Delledonne M. (2003) **Nitric oxide signaling in plant-pathogen interactions.** *IUBMB Life* **55**: 579-583.
- Rusznayk IS, Szent-Gyorgi A. (1936) **Vitamin P: flavonols as vitamins.** *Nature* **138**: 27.
- Sacks FM, Lichtenstein A, Van Horn L, Harris W, Kris-Etherton P, Winston M. (2006) **Soy protein, isoflavones, and cardiovascular health: a summary of a statement for professionals from the american heart association nutrition committee.** *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26**: 1689-92.
- Sadowska-Krowicka H, Mannick EE, Oliver PD, Sandoval M, Zhang XJ, Eloby-Childress S, Clark DA, Miller MJS. (1998) **Genistein and gut inflammation: Role of nitric oxide.** *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **217**: 351-357.
- Sasano H, Suzuki T, Nakata T, Moriya T. (2006) **New development in intracrinology of breast carcinoma.** *Breast Cancer.* **13**: 129-36.
- Setchell KD, Cassidy A. (1999) **Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health.** *J. Nutr.* **129**: 758S-767S.
- Sharma V, Rao LJ. (2009) **A thought on the biological activities of black tea.** *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **49**: 379-404.

Shon YH, Park SD, Nam KS. (2006) **Effective chemopreventive activity of genistein against human breast cancer cells.** *J. Biochem. Mol. Biol.* **39**: 448-51.

Singh U, Sharma K, Vats S, Priyadarsini K, Bhatia A, Kamal R. (2009) **Evaluation of evidenced-based radioprotective efficacy of *Gymnema sylvestre* leaves in mice brain.** *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* **28**: 311-23.

Sokoloff B, Eddy WH, Redd JB. (1951) **The biological activity of a flavonoid (vitamin "P") compound.** *J. Clin. Invest.* **30**: 395.

Steele RG, Long A, Reddy KA, Luhr M, Phipps S. (2003) **Changes in maternal distress and child-rearing strategies across treatment for pediatric cancer.** *J. Pediatr. Psychol.* **28**: 447-52.

Stuehr DJ. (1997) **Structure-function aspects in the nitric oxide synthases.** *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **37**: 339-359.

Sun T, Hou J, Hu J, Chen S, Cai X, Zou G. (2007) **Chemical composition, cytotoxic and antioxidant activity of the leaf essential oil of *Photinia serrulata*.** *Food Chemistry* **103**: 355-358.

Takahama U, Hirota S, Oniki T. (2006) **Quercetin-dependent scavenging of reactive nitrogen species derived from nitric oxide and nitrite in the human oral cavity: interaction of quercetin with salivary redox components.** *Arch. Oral Biol.* **51**: 629-39.

Takahama U, Oniki T, Hirota S. (2002) **Oxidation of Quercetin by Salivary Components. Quercetin-Dependent Reduction of Salivary Nitrite under Acidic Conditions Producing Nitric Oxide.** *J. Agric. Food Chem.* **50**: 4317-4322.

Thamrongwittawatpong L, Sirivatanauksorn Y, Batten JJ, Williamson RC, Kakkar AK, Mathie RT. (2001) **The effect of N (G)-monomethyl-L-arginine and tamoxifen on nitric oxide production in breast cancer cells stimulated by oestrogen and progesterone.** *Eur J Surg.* **167**: 484-9.

Thomsen LL, Scott JM, Topley P, Knowles RG, Keerie AJ, Frend AJ. (1997) **Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase inhibits tumor growth in vivo: studies with 1400W, a novel inhibitor.** *Cancer Res.* **57**: 3300-4.

Trípoli E, La Guardiã M, Giammanco S, Di Majo D, Giammanco M. (2007) **Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review.** *Food Chemistry* **104**: 466-479.

Usui T. (2006) **Pharmaceutical prospects of phytoestrogens.** *Endocr. J.* **53**: 7-20.

Valachovicova T, Slivova V, Sliva D. (2004) **Cellular and physiological effects of soy flavonoids.** *Mini Rev. Med. Chem.* **4**: 881-7.

Veselik DJ . (2008) **Activation of estrogen receptor-alpha by the anion nitrite.** *Cancer Res.* **68**:3950-8.

Wang C, Kurzer MS. (1998) **Effects of phytoestrogens on DNA synthesis in MCF-7 cells in the presence of estradiol or growth factors.** *Nutr. Cancer.* **31**: 90–100.

Wang TT, Sathyamoorthy N, Phang JM. (1996). **Molecular effects of genistein on estrogen receptor mediated pathways.** *Carcinogenesis* **17**: 271–275.

Wei H, Saladi R, Lu Y, Wang Y, Palep SR, Moore J, Phelps R, Shyong E, Lebwohl MG. (2003) **Isoflavone genistein: photoprotection and clinical implications in dermatology.** *J. Nutrition.* **133**: 3811S-3819S.

Whittle BJ. (1993) **Thirteenth Gaddum Memorial Lecture. Neuronal and endothelium-derived mediators in the modulation of the gastric microcirculation: integrity in the balance.** *Br J Pharmacol.* **110** (1): 3-17.

Xu G, Ye X, Chen J, Liu D. (2007) **Effect of Heat Treatment on the Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Citrus Peel Extract.** *J.Agric. Food Chem.* **55**: 330-335.

Xu J, Loo G. (2001) **Different effects of genistein on molecular markers related to apoptosis in two phenotypically dissimilar breast cancer cell lines.** *J. Cell Biochem.* **82**: 78-88.

Yamasaki H. (2000) **Nitrite-dependent nitric oxide production pathway: implications for involvement of active nitrogen species in photoinhibition in vivo.** *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **355**: 1477-88.

Ya-Qin Ma, Xing-Qian Ye, Zhong-Xiang Fang, Jian-Chu Chen, Gui-Hua Xu and Dong-Hong Liu. (2008) **Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Extracts from Ultrasonic Treatment of Satsuma Mandarin (Citrus unshiu Marc.) Peels.** *J. Agric. Food. Chem.* **56**: 5682-90.

Yen GC, Lai HH. (2003) **Inhibition of reactive nitrogen species effects in vitro and in vivo by isoflavones and soy-based food extracts.** *J. Agric. Food Chem.* **51**: 7892-900.

Yoon SY, Lee YJ, Seo JH, Sung HJ, Park KH, Choi IK, Kim SJ, Oh SC, Choi CW, Kim BS, Shin SW, Kim YH, Kim JS. (2006) **uPAR expression under hypoxic conditions depends on iNOS modulated ERK phosphorylation in the MDA-MB-231 breast carcinoma cell line.** *Cell Res.* **16**: 75-81.

Yusof S, Ghazali HM, King GS. (1990) **Naringin content in local citrus fruits** *Food Chemistry* **37**: 113-121.

Zaobornyj T, Gonzales GF, Valdez LB. (2007) **Mitochondrial contribution to the molecular mechanism of heart acclimatization to chronic hypoxia: role of nitric oxide.** *Front Biosci.* **12**: 1247-59.

Zava DT, Duwe G. (1997) **Estrogenic and antiproliferative properties of genistein and other flavonoids in human breast cancer cells in vitro.** *Nutr. Cancer* **27**: 31-40.

Zhang X. (2004) **Real time and in vivo monitoring of nitric oxide by electrochemical sensors--from dream to reality.** *Front Biosci.* **9**: 3434-46.

Zhao YH, Wang SJ, Zhang ZQ, Ruan JX, Li JL. (2006) **Simultaneous quantification of chlorogenic acid and caffeic acid in rat plasma after an intravenous administration of mailuoning injection using liquid chromatography/mass spectrometry.** *Rapid Commun Mass Spectrom.* **20**: 2303-8.

Zheng G, Xu L, Wu P, Xie H, Jiang Y, Chen F, Wei X. (2009) **Polyphenols from longan seeds and their radical-scavenging activity.** *Food Chemistry* **116**: 433-436.

## **Nitric oxide promotes exudation of functional isoflavones from soybean seeds**

Pablo Gomes Ferreira<sup>1</sup>, Veridiana Vera de Rosso<sup>2#</sup>, Adriana Z. Mercadante<sup>2</sup> and  
Ione Salgado<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Plant Biology, Institute of Biology, State University of Campinas  
(UNICAMP), P.O. Box 6109, Campinas - SP - Brazil - CEP 13083-970

<sup>2</sup>Department of Food Science, Faculty of Food Engineering, State University of  
Campinas (UNICAMP), P.O. Box 6121, Campinas - SP - Brazil - CEP 13083-862

\*Corresponding author. Fax: +55 19 3521 6149

E-mail address: [ionesm@unicamp.br](mailto:ionesm@unicamp.br) (I. Salgado)

# Present Address: Department of Health Sciences, Federal University of São  
Paulo (UNIFESP), Santos - SP - Brazil - CEP 11060-001

1 **Abstract**

2 Although soybean isoflavones naturally accumulate in their glyco- and malonyl-  
3 conjugated forms, their aglycones have been credited with the beneficial effects  
4 that soybean containing foods have on human health. Here we evaluated the  
5 effects of a nitric oxide (NO) donor, sodium nitroprusside (SNP), on the  
6 accumulation of non-conjugated isoflavones in soybean seeds. Elicited embryo  
7 and cotyledon tissues as well as their exudates were extracted and analyzed for  
8 isoflavone content by high performance liquid chromatography coupled to  
9 photodiode array and mass spectrometry detectors. SNP elicitation increased the  
10 synthesis of the aglycone forms in a dose-dependent manner. The relative  
11 production of aglycone isoflavones was approximately 75% in the exudates,  
12 compared to the extraction made from only the tissues (34%). Embryo exudate had  
13 a higher concentration of daidzein (49%) and glycitein (22%) compared to the  
14 cotyledon, which had a higher concentration of genistein (26%) and combined  $\beta$ -  
15 forms (28%). These results suggest that SNP promotes the exudation of active  
16 forms of soybean isoflavones, which may be of interest for the production of  
17 functional foods and supplements.

18

19 **Keywords:** Isoflavones; soybean; nitric oxide; sodium nitroprusside; functional  
20 foods; HPLC–PDA–MS/MS.

## 21 **Introduction**

22 Studies in the last two decades have firmly established that the gas free radical  
23 nitric oxide (NO) exerts a broad range of effects on bodily functions including  
24 muscle contractility, platelet aggregation, metabolism, neuronal activity and the  
25 immune response (1). The underlying mechanisms of these processes rely  
26 primarily on the elevated guanosine 3',5'-cyclic monophosphate levels that result  
27 from the stimulation of soluble guanylyl cyclase, inhibition of mitochondrial  
28 respiration by inhibition of cytochrome *c* oxidase activity, and nitrosylation and  
29 nitration of proteins and enzymes (2, 3). More recently, an increasing number of  
30 roles for NO in plant growth, development and defense have emerged. As a  
31 developmental regulator, NO promotes germination, leaf extension and root  
32 growth, and also delays leaf senescence, floral transition and fruit maturation (4).  
33 Some studies support the existence of a NO-mediated signaling pathway in plant  
34 defense responses to pathogens. Administration of NO donors to tobacco plants or  
35 cell suspension cultures was shown to induce the expression of defense-related  
36 genes such as the gene encoding phenylalanine ammonia lyase (PAL), a marker  
37 for phenylpropanoid biosynthesis (5, 6). PAL is the first enzyme that catalyzes the  
38 non-oxidative deamination of phenylalanine to produce cinnamate, the first  
39 compound with a phenylpropanoid skeleton in this biosynthetic pathway (7). Our  
40 group has demonstrated that NO is implicated in the activation of phenylpropanoid  
41 biosynthesis as part of the defense mechanism of soybean plants against the  
42 fungus *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* (Dpm). This fungus is the causal  
43 agent of stem canker disease (8). Glyceollins are the major phytoalexins produced  
44 in soybean plants. Daidzein, a dihydroxylated isoflavone, is the immediate

45 precursor of the glyceollins, and genistein (trihydroxylated isoflavone) is another  
46 antimicrobial isoflavonoid that accumulates in soybean tissue during incompatible  
47 reactions (8).

48         Some of the isoflavonoid intermediates in the phenylpropanoid pathway  
49 have been shown to contribute to the prevention of many human diseases (9).  
50 These metabolites are naturally found mostly in their conjugated forms. However,  
51 several descriptions in the literature indicate that the free forms (aglycones) of  
52 soybean-derived isoflavones (daidzein, glycitein and genistein) exhibit the highest  
53 pharmacotherapeutic activities (10). These isoflavones, have enough estrogenic  
54 activity to significantly affect the reproduction of grazing animals such as cows as  
55 well as sheep and are termed phyto-estrogens (11). There is a significant amount  
56 of epidemiological evidence supporting that diets rich in fruit, seeds, and leafy  
57 vegetables rich in isoflavones, can reduce the incidence of non-communicable  
58 diseases such as cardiovascular diseases, diabetes, cancer and stroke (12). Other  
59 studies have demonstrated a significant correlation between the consumption of  
60 isoflavonoid-rich foods by people in East Asia and a lower incidence of breast,  
61 prostate and large intestine carcinomas, and cardiovascular disease (the so-called  
62 “diseases of western countries”). The three main isoflavones in soybeans exist in  
63 four different forms (Figure 1). In nature, the 6”-O-malonyl- $\beta$ -glucosides of the  
64 isoflavones are the most predominant forms. The 6”-O-acetyl-  $\beta$ -glucoside-,  $\beta$ -  
65 glucoside-, and aglycone forms develop from the 6”-O-malonyl  $\beta$ -glucosides during  
66 processing of soybeans and soy foods or during sample preparation and analysis.  
67 Thus biotechnological and biochemical processes that would induce the production  
68 of aglycone forms may provide both nutritional and economic benefits in the

69 prevention of various diseases in the future. This paper presents an improved  
70 technique to increase the yield of free isoflavones from soybean seeds that can be  
71 useful for the production of foods and supplements enriched in compounds with  
72 beneficial effects to human health.

73

## 74 **Materials and Methods**

75

### 76 2.1 Reagents

77 HPLC-grade methanol (MeOH) and formic acid were acquired from Mallinckrodt  
78 Baker (Phillipsburg, NJ). The two commonly available isoflavone standards  
79 (daidzein, genistein) were obtained from Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, MO).  
80 Standards of glycitein, daidzin, genistin and glycitin were obtained from LC Labs.  
81 (Woburn, MA). Luteolin and apigenin was acquired from Sigma-Aldrich Corp. The  
82 samples and solvents were filtered through Millipore (Billerica, MA) membranes  
83 (0.22 and 0.45  $\mu\text{m}$ ) prior to HPLC analysis.

84

### 85 2.2 Plant Material

86 Soybean (*Glycine max* (L.) Merr) seeds of the cultivar IAC-18, resistant to the  
87 fungus *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* (Dpm), were provided by Dr.  
88 Nelson R. Braga (Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, São Paulo,  
89 Brazil) and kept frozen at 4 °C until analysis. The embryo and cotyledon tissue of  
90 the soybean seeds were manually removed before elicitation.

91

### 92 2.3 Apparatus

93 The analysis was carried out in a Shimadzu HPLC (Kyoto, Japan) equipped with  
94 quaternary pumps (model LC-20AD), an on-line degasser, and a Rheodyne  
95 injection valve (Rheodyne LCC, Rohnert Park, CA) with a 20- $\mu$ L loop. The  
96 equipment included a PDA detector (Shimadzu, model SPD-M20A) and a mass  
97 spectrometer with an ion-trap analyzer (MS/MS) and ESI ionization source from  
98 Bruker Daltonics, model Esquire 4000 (Bremem, Germany) connected in series.

99

#### 100 2.4 Elicitation Assay

101 The production of isoflavones was evaluated as described elsewhere (8), with  
102 some modifications. Soybean seeds were soaked in 0.3% commercial sodium  
103 hypochloride for 10 min and washed thoroughly three times with distilled water. In  
104 each treatment, the amount of sample contained 50 units of soybean seed,  
105 detached embryo or cotyledon. The tissue samples were treated with either 10 mL  
106 of water (control) or different concentrations (10, 25, 100 and 200mM) of sodium  
107 nitroprusside (SNP). SNP (Sigma-Aldrich Corp.) was applied to the tissue samples  
108 as 10mL aqueous solutions. All the experiments were carried out in triplicate at  
109 minimum. The treated tissue samples were kept in an Erlenmeyer flask in the dark  
110 at 25 °C with stirring for four different periods time (5, 10, 15 and 20 h). After the  
111 elicitation time, the samples were filtered to separate the tissue from the exudate,  
112 and a 10mL volume of methanol was added to each sample. They were then  
113 extracted for 20 minutes on a rotary mixer. After 20 minutes on the mixer, the  
114 methanol was evaporated to dryness, and the residue was solubilized in 500  $\mu$ L of  
115 MeOH/5% formic acid (1:1). This mixture was then filtered through a 0.22 $\mu$ m  
116 Millipore membrane for HPLC analysis.

117

118 2.5 Determination of Conjugated and Aglycone Isoflavones

119 The experimental conditions for separation, identification, and quantification by  
120 HPLC–PDA–MS/MS were the same as described elsewhere (13, 14). For all of the  
121 samples, flavonoid separation was carried out on a 4.6 mm x 250 mm column  
122 (ODS C18; Zorbax, Chadds Ford, PA) using a linear gradient of methanol/5%  
123 formic acid from 15:85 to 80:20 over 25 min as the mobile phase. The 80:20  
124 solution was maintained for 15 min. The flow rate was 0.9 mL/min, and the column  
125 temperature was set at 32°C. The flavonoids were identified according to their  
126 elution order on a C18 HPLC column upon cochromatography with authentic  
127 standards, their UV-visible absorbance spectrum ( $\lambda_{\text{max}}$ , spectral fine structure),  
128 and their mass spectrum compared with standards and data available in the  
129 literature (13-15). The chromatograms were processed at 300 nm (glyceollins and  
130 isoflavonoids) and 350 nm (flavones), and the spectra were obtained between 200  
131 and 600 nm. After the sample was passed through the flow cell of the PDA, the  
132 column eluate was split, allowing only a 0.17 mL/min flow rate of sample into the  
133 electrospray ionization (ESI) interface. The MS/MS parameters were set as follows:  
134 positive mode, capillary voltage: -2500 V, plate offset: -500 V, capillary exit: 70 V,  
135 skimmer 1: 20 V, skimmer 2: 10 V, dry gas (N<sub>2</sub>) temperature: 325 °C and flow: 11  
136 L/min, nebulizer: 60 psi, scan range from m/z 50 to 800; negative mode, capillary  
137 voltage: -2500 V, plate offset: -500 V, capillary exit: -74 V, skimmer 1: -36.6 V,  
138 skimmer 2: -6 V. MS/MS was set in automatic mode, applying a fragmentation  
139 energy of 1.2 V. The isoflavonoids were quantified by HPLC, using external  
140 calibration curves for daidzein, genistein and glycitein, and their  $\beta$ -glucosides

141 (daidzin, genistin and glycitin, respectively). The 6"-O-malonyl- $\beta$ -glucosides were  
142 quantified using the curve of the  $\beta$ -glucosides.

143

## 144 **Results and Discussion**

145

### 146 *Physiological response to SNP*

147 Given the well-established pharmacotherapeutic activity of free isoflavones, a  
148 methodology that is simple, inexpensive, fast and efficient for the production of  
149 these compounds can be a great tool in the development of an excellent  
150 commercial product. To increase the proportion of aglycone forms of isoflavones,  
151 soybean tissue was treated with the inducing agent SNP, which was previously  
152 proved to be very effective in activating the production of free isoflavones in  
153 detached soybean cotyledons from 7- to 8-day-old seedlings (8). The efficacy of  
154 this treatment was then evaluated in intact and non-germinated seeds as well as in  
155 the two different tissues that they are comprised of (embryo and cotyledon). To  
156 perform this evaluation we compared the results of the identification and  
157 quantification of the main soybean isoflavones by HPLC-PDA. Figure 2 shows the  
158 chromatographic profile, and Table 1 shows the amount of isoflavones extracted  
159 from the exudates when the soybean tissue was elicited with 10 mM SNP for 15  
160 hours. To increase the reliability of the isoflavone identification in the samples and  
161 to assist in the identification of  $\beta$ -conjugated compounds to sugars and acids, the  
162 peaks detected by HPLC were also subjected to mass spectrometry analysis. As  
163 can be seen on Table 2, the mass spectra of isoflavones showed intense peaks of  
164 protonated molecules ( $[M+H]^+$ ), which are important identifying characteristics of

165 the compound. Moreover, the MS/MS spectra of protonated ( $[M+H]^+$ ) and  
166 deprotonated ( $[M-H]^-$ ) aglycones (peaks 8, 9 and 11) showed characteristic  
167 fragments due to the consecutive loss of water, CO and CO<sub>2</sub> (m/z 237, 268 and  
168 253, respectively). For the glycosylated isoflavones (peaks 2, 3 and 4) the MS/MS  
169 spectra showed fragments corresponding to their aglycones: daidzein (m/z  
170 255/253), glycitein (m/z 285/283) and genistein (m/z 271/269), due to the loss of  
171 hexose (162 u). In the case of acylated isoflavones (peaks 5, 6 and 7), MS/MS also  
172 showed the characteristic fragments of the aglycones due to loss of hexose and  
173 malonic acid (248 u). These results are consistent with those which was previously  
174 reported the fragmentation profile of soybean isoflavones (16). The results show  
175 that the embryo was the tissue that demonstrated the best production of the  
176 aglycone forms per mg of extract (0.5  $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ). Daidzein was the isoflavone that  
177 accumulated at the highest levels in the exudates from the SNP-treated tissues.  
178 Daidzein was found at 0.243, 0.029 and 0.008  $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$  in the embryo, cotyledon  
179 and seed, respectively (Table 1). The relative percentages of daidzein were 52% in  
180 the embryo, 35% in the cotyledon and 30% in the seed. Genistein was produced at  
181 a higher proportion in the cotyledon (14%) compared to in extracts of the seed  
182 (6%) and embryo (4%). However, considering the amount produced per mg of  
183 extract, the best induction of genistein was obtained in the elicited embryo (0.032  
184  $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) followed by cotyledon (0.018  $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) and seed (0.003  $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ).  
185 Regarding the production of isoflavones  $\beta$ -conjugated to sugars, the embryo and  
186 cotyledon had lower relative proportions of these compounds (15%) compared to  
187 the seed (23%). When analyzing the values per mg of extract, the cotyledon

188 produced the highest concentration of isoflavone  $\beta$ -conjugates when compared  
189 with the other tissues. Nevertheless, it is remarkable that the treatment induced a  
190 high proportion of free isoflavones in all tested exudates (from embryo, cotyledons  
191 and seed). It is important to note that the seed mass is two-fold higher than  
192 cotyledon mass, and the embryo mass is 10-fold smaller than that of the cotyledon.  
193 Thus, when the production of isoflavones is quantified per unit of tissue, the  
194 cotyledon shows the best performance for daidzein and genistein synthesis (2.05  
195 and 1.3  $\mu\text{g}\cdot\text{unit of tissue}^{-1}$ , respectively). However, the embryo shows the higher  
196 production of active forms of isoflavones (aglycones), as it provided the largest  
197 concentration of aglycones per mg of tissue, and the best yield in glycitein per unit  
198 of tissue (1.47  $\mu\text{g}$ ).

199 To check whether the treatment with SNP induced the exudation of  
200 aglycone isoflavones in higher amounts than what is present in treated plant tissue,  
201 the extraction process was separately carried out on tissues and exudates. As  
202 shown in Figure 3, when the extraction process involved only the exudate, the yield  
203 of aglycone isoflavones was approximately 75% compared to the conjugated  
204 forms. When the extraction was done only in the tissue, the yield was lower (34%).

205 In general, our results showed that both exudates, but mainly that of the  
206 embryo, demonstrate good production yields of soybean aglycones (phytoalexins  
207 precursors) when elicited by SNP. These data are in agreement with previous  
208 reports which suggested that the production of phytoalexins is regulated at the  
209 level of PAL, chalcone synthase (CHS) and chalcone isomerase (17). Microbial  
210 elicitors were shown to induce gene expression of PAL and CHS in soybean  
211 cultured cells (18) and NO donors were able to induce the gene expression of PAL

212 (5). Thus, the soybean defense response in different tissues can be exploited to  
213 produce soy foods enriched in active compounds with benefits to human health.  
214 Some studies suggest that other reactive species may also be involved in  
215 phytoalexin production (19-21). It is well known that phytoalexins have an  
216 antimicrobial function in soybeans. However, the use of different substances or  
217 reactive species such as NO, which stimulate the synthesis of the precursors of  
218 these phytoalexins can be very promising for the low cost production of isoflavone-  
219 enriched foods. Additionally, the observation that the aglycone forms are the main  
220 exudated compounds from the tissues supports the use of this methodology for the  
221 production of isoflavone-enriched supplements.

222

#### 223 *Effects of elicitation time and NO doses on the yield of Aglicones*

224 The kinetics of isoflavonoid production as a function of the SNP elicitation time was  
225 evaluated in embryo exudates because they showed the best response in terms of  
226 aglycone isoflavone production. As can be seen in Figure 4, by the  
227 chromatographic profile of the extracts, the production of isoflavones increased  
228 with the elicitation time, and the largest amount of aglycones was accumulated  
229 after 20 hours of SNP elicitation. There was no production of isoflavones in the  
230 controls, eliminating the possibility that the imbibition of the embryos with water or  
231 the mechanical stress (shaking) on the embryos could account for the results  
232 observed. In the first five hours of SNP elicitation time, about 7 µg of aglycone per  
233 mL of exudate was obtained. This value increased to 26 µg per mL after 20 hours  
234 of treatment. These amounts, when expressed in µg of produced aglycones per mg  
235 of extract, corresponded to 0.19 µg.mg<sup>-1</sup> (5 h) and 0.74 µg.mg<sup>-1</sup> (20 h) (Figure 5).

236 Figure 4 also shows that SNP treatment almost exclusively favors the  
237 accumulation of aglycone forms in soybean embryo exudates. This confirms  
238 results previously reported (8) that NO is involved in the defense response in  
239 soybeans and the accumulation of isoflavones (at least in the first 20 hours) is  
240 directly proportional to the elicitor treatment time. BRAGA *et al.* (2006) have also  
241 observed that the accumulation of defense-related flavonoids is related to the type,  
242 concentration and elicitation time of the NO donor (22). Kretzschmar *et al.* (2009)  
243 found that S-nitrosoglutathione (GSNO) better stimulated the action of flavanone-3-  
244 hydroxylase (F-3H), an enzyme responsible for the formation of the flavones  
245 luteolin and apigenin, when compared to SNP (23). The same authors identified  
246 these flavones in SNP elicitation of germinated seeds. In contrast, these flavones  
247 were not identified in extracts of embryo exudates during the elicitation time  
248 evaluated in this study (data not shown). As our experimental design was  
249 conducted with non-germinated seeds, it is possible that elicitation with SNP only  
250 produces these flavones after seed germination.

251 The effect of SNP concentration on the exudation of isoflavones from  
252 soybean embryos is show in Figure 6. Concentrations of aglycones per mg of  
253 extract (dried exudate) were 0.34  $\mu\text{g}$  of daidzein. $\text{mg}^{-1}$ , 0.31  $\mu\text{g}$  of glycitein. $\text{mg}^{-1}$  and  
254 0.04 mg of genistein. $\text{mg}^{-1}$ , when the embryos were stimulated with 10 mM SNP.  
255 These concentrations increased to 0.9, 0.91 and 0.11  $\mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ , respectively, when  
256 exposed to 200 mM of SNP (Figure 6A). However, as can be seen in Figure 6B,  
257 although treatment with 200 mM SNP, results in a higher concentration of daidzein,  
258 glycitein, genistein, and total aglycones (1.92  $\mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$  of extract), there is a  
259 decrease in the relative percentage of aglycone levels (69.6%) in relation to their

260 conjugates (30.1%) when compared with the samples treated with 100 mM SNP  
261 (75%) (Figure 6C). At the relative levels of aglycones for our purpose, we conclude  
262 that at the concentration of 100 mM SNP, the soybean embryos gave the best  
263 dose-response ( $1.61 \mu\text{g}$  of aglycone. $\text{mg}^{-1}$  of extract). Based on these analyses and  
264 knowing that different aglycones have different metabolic pathways of production in  
265 the soybean, different concentrations of the inducer could lead to better responses  
266 for each of the different aglycones (24). Thus, as seen in Figure 6A, glycitein had  
267 its best production ( $0.91 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$  of extract) when using 200 mM SNP, whereas  
268 with 100 mM SNP there was a better production of daidzein ( $0.8 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ ).

269         As the elicitation of embryos with 100 mM SNP for 20 hours produced the  
270 best response in terms of aglycone forms, this treatment was used to compare the  
271 responses between embryos and cotyledons. The compounds identified in the  
272 exudate and their levels are shown in Table 3. In relation to the aglycone forms,  
273 cotyledon produced higher amounts of genistein ( $16.3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  of exudate) than the  
274 embryo ( $3.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). However, the embryo was more effective in the production of  
275 the aglycones daidzein ( $27.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) and glycitein ( $26.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). Still, it is  
276 important to note that even in the analysis per unit of tissue, the embryo is more  
277 effective in the production of daidzein ( $5.6 \mu\text{g} \cdot \text{per unit tissue}^{-1}$ ) and glycitein ( $4.9$   
278  $\mu\text{g} \cdot \text{unit tissue}^{-1}$ ). The cotyledon continues to have a better yield of genistein ( $3.3$   
279  $\mu\text{g} \cdot \text{unit tissue}^{-1}$ ). Regarding the proportional quantities of isoflavones, the embryo  
280 also had a higher concentration of daidzein (49%) and glycitein (22%) compared to  
281 the cotyledon. The cotyledon had a higher concentration of genistein (26%) and  $\beta$ -  
282 forms combined (28%) (Table 3). The general analysis of these results shows that  
283 the embryo induced with 100 mM SNP for 20 hours is the best source of soybean

284 tissue for the production of free isoflavones because it showed a better  
285 proportional performance (Table 3). The use of elicitors to produce functional foods  
286 to target health problems is very promising for food science research. Recently, a  
287 new class of foods within functional food research called phytoalexin-enriched  
288 foods was proposed (25). This class of food utilizes induced plant compounds or  
289 phytoalexins created either pre- or postharvest that have been traditionally viewed  
290 only as plant defensive compounds. Phytoalexin-enriched foods would be defined  
291 as foods with health-promoting activities based on phytoalexins and would be a  
292 subclass of functional foods (25). These phytoalexin-enriched functional foods  
293 would benefit the consumer by providing “health-enhanced” food choices and  
294 would also benefit many underutilized crops that may produce phytoalexins that  
295 may not have been considered to be beneficial health-promoting foods. Our results  
296 suggest that elicitation with SNP could represent a simple method to produce  
297 phytoalexin-enriched functional foods and supplements not only in soybeans but  
298 also in non-explored crops.

## Acknowledgments

Thanks are due to FAPESP for the grant (2008/11636-5) and the fellowship of P.G. Ferreira (2007/52765-0), and CNPq for research fellowships of I. Salgado and A.Z. Mercadante.

## Literature Cited

- (1) Weigert, A.; Brüne, B. Nitric oxide, apoptosis and macrophage polarization during tumor progression. *Nitric Oxide* **2008**, *19*, 95-102.
- (2) Gao, Y. The multiple actions of NO. *Pflugers Arch.* **2009** Dec 19. [Epub ahead of print].
- (3) Ischiropoulos, H. Protein tyrosine nitration--an update. *Arch. Biochem. Biophys.* **2009**, *484*, 117-21.
- (4) Romero-Puertas, M.C.; Delledonne, M. Nitric oxide signaling in plant-pathogen interactions. *UBMB Life* **2003**, *55*, 579-83.
- (5) Durner, J.; Wendehenne, D; Klessig, D.F. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1998**, *95*, 10328–10333.
- (6) Delledonne, M.; Xia, Y.; Dixon, R.A.; Lamb, C. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* **1998**, *394*, 585–588.
- (7) Paxton, J.D. Biosynthesis and accumulation of legume phytoalexins. In *Mycotoxins and Phytoalexins*, RP Sharma, DK Shalunke, Eds, CRC Press, Boca Raton, FL. **1991**, pp 485–499.
- (8) Modolo, L.V.; Cunha, F.Q.; Braga, M.R.; Salgado, I. Nitric Oxide Synthase-Mediated Phytoalexin Accumulation in Soybean Cotyledons in Response to

- the Diaporthe phaseolorum f. sp. Meridionalis Elicitor. *Plant Physiol.* **2002**, *130*, 1288–1297.
- (9) Birt, D.F.; Hendrich, S.; Wang, W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacol. Ther.* **2001**, *90*, 157-77.
- (10) Setchell, K.D.; Brown, N.M.; Zimmer-Nechemias, L.; Brashear, W.T.; Wolfe, B.E.; Kirschner, A.S.; Heubi, J.E. Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **2002**, *76*, 447-53.
- (11) Crozier, A.; Jaganath, I.B.; Clifford, M.N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 1001–1043.
- (12) Mennen, L.I.; Walker, R.; Bennetau-Pelissero, C.; Scalbert, A. Risks and safety of polyphenol consumption. *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, *81*, 326S–329S.
- (13) Lin, L.Z.; Harnly, J.M. A Screening Method for the Identification of Glycosylated Flavonoids and Other Phenolic Compounds Using a Standard Analytical Approach for All Plant Materials. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 1084-96.
- (14) Lin, L.Z.; He, X.-G.; Lindenmaier, M.; Yang, J.; Cleary, M.; Qiu, S.-X.; Cordell, G.A. LC-ESI-MS Study of the Flavonoid Glycoside Malonates of Red Clover (*Trifolium pratense*). *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 354–365.
- (15) Griffith, A.P.; Collison, M.W. Improved Methods for the extraction and analysis of isoflavones from soy-containing food and nutritional supplements by reverse-phase high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatography. A.* **2001**, *913*, 397-413.

- (16) Cuyckens, F.; Claeys, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *J. Mass Spectrom.* **2004**, *39*, 1-15.
- (17) Dixon, R.A.; Paiva, N.L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* **1995**, *7*, 1085–1097.
- (18) Tenhaken, R.; Levine, A.; Brisson, L.F.; Dixon, R.A.; Lamb, C. Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1995**, *92*, 4158–4163.
- (19) Gomez, L.D.; Braga, M.R.; Dietrich, S.M.C. Involvement of active oxygen species and peroxidases in phytoalexin production induced in soybean hypocotyls by an elicitor from a saprophytic fungus. *Ciência Cultura.* **1994**, *46*, 153–156.
- (20) Apostol, I.; Heinstejn, P.F.; Low, P.S. Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells: role in defense and signal transduction. *Plant Physiol.* **1989**, *90*, 109–116.
- (21) Degousée, N.; Triantaphylides, C.; Montillet, J.L. Involvement of oxidative processes in the signaling mechanisms leading to the activation of glyceollin synthesis in soybean (*Glycine max*). *Plant Physiol.* **1994**, *104*, 945–952.
- (22) Braga, M.R.; Aidar, M.P.M.; Marabesi, M.A.; Godoy, J.R.L. Effects of elevated CO<sub>2</sub> on the phytoalexin production of two soybean cultivars differing in the resistance to stem canker disease. *Environ. Exp. Bot.* **2006**, *58*, 85–92.
- (23) Kretschmar, F.S.; Aidar, M.P.M.; Salgado, I.; Braga, M.R. Elevated CO<sub>2</sub> atmosphere enhances production of defense-related flavonoids in soybean elicited by NO and a fungal elicitor. *Environ. Exp. Bot.* **2009**, *65*, 319–329.

- (24) Hsieh, M.-C.; Graham, T.L. Partial purification and characterization of a soybean  $\beta$ -glucosidase with high specific activity towards isoflavone conjugates. *Phytochemistry* **2005**, *58*, 995–1005.
- (25) Boue, S.M.; Thomas E. Cleveland, T.E.; Carter-Wientjes, C.; Shih, B. Y.; Bhatnagar, D.; Mclachlan, J. M.; Burow, M. E. Phytoalexin-Enriched Functional Foods. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 2614–2622.

## Figure Legends

**Figure 1.** The main structure of soybean flavonoids. Soy isoflavones daidzein, genistein and glycitein are naturally found predominantly in malonyl, acetyl and  $\beta$ -glucosyl conjugated forms by binding at position 7 of the aglycones.

**Figure 2.** Phenylpropanoids extracted from soybean tissues treated with sodium nitroprusside (SNP). Profile obtained by HPLC/MS with a C18 column reverse phase. (A) Embryo, (B) cotyledon and (C) seed, treated with 10 mM SNP for 15 hours. Processing at 300 nm with diode array detector (PDA). The chemical structures of the numbered compounds are shown in Table 1.

**Figure 3.** Relative percentage of aglycone isoflavones to total isoflavones analyzed in the different extractions: only tissue and only exudate. Embryos elicited with 100 mM SNP for 20 hours. After this period the tissues and exudate were extracted with 80% methanol for 20 minutes under agitation, followed by filtration and drying. The samples were re-suspended, filtered again and analyzed by HPLC at 300 nm.

**Figure 4.** Isoflavones produced by soybean embryos in response to treatment with SNP: effect of elicitation time. The embryos were elicited with an aqueous solution (control) or with 10 mM SNP (50 embryo units/10 mL). After the elicitation times, the tissues were discarded and the exudates were extracted with 80% methanol

and analyzed at 300 nm by HPLC. (MC) Malonyl-Conjugate isoflavones, (8) Daidzein, (9) and Glycitein (11) Genistein, numbered according to Table 1.

**Figure 5.** Quantification of aglycone isoflavones produced from soybean embryo in response to elicitor for different periods of time. The amount of aglycone produced per mg of exposed tissue to 10 mM SNP (50 embryos/10 mL solution) was determined from calibration curves for daidzein, glycitein and genistein. The mean and standard deviations of the analysis in triplicate are presented.

**Figure 6.** Quantification of aglycone isoflavones produced from embryo extracts in response to different concentrations of SNP. The treatment was carried out with 50 embryos immersed in 10 ml of elicitor solution for 20 hours under agitation in the absence of light. (A) Concentration of aglycone isoflavones, (B) Total concentration of aglycones and glycosyl-conjugated, (C) Relative percentage of aglycone isoflavones and glycosyl-conjugated in the total isoflavones analyzed (free + combined). The mean and standard deviations of the analysis in triplicate are presented.

**Table 1.** Chromatographic parameters and concentrations of isoflavonoids in three different soybean extracts treated with SNP.

Peak	Compound	R <sub>t</sub> (min) <sup>b</sup>	λ <sub>max</sub> (nm) <sup>c</sup>	Concentration (µg.mg <sup>-1</sup> of dry weight)		
				Embryo	Cotyledon	Seed
1	not identified	–	279, 308	n.d.	n.d.	n.d.
2	daidzin	14.1	260, 300	0.013	0.008	0.003
3	glycitin	15.1	260, 317	0.015	0.013	0.013
4	genistin	16.3	260, 330	0.010	0.005	0.003
5	malonyl-daidzin <sup>a</sup>	17.4	260, 300	0.060	0.001	n.d.
6	malonyl-glycitin <sup>a</sup>	18.3	262, 318	0.045	0.007	n.d.
7	malonyl-genistin <sup>a</sup>	19.2	261, 330	0.054	0.006	n.d.
8	daidzein	20.1	260, 302	0.243	0.029	0.008
9	glycitein	21.0	260, 319	0.210	0.014	0.003
10	not identified	–	288, 335	n.d.	n.d.	n.d.
11	genistein	22.2	262, 330	0.032	0.018	0.003

<sup>a</sup>The concentrations were estimated using the calibration curves of compounds 2, 3 and 4; n.d. – not detected; R<sub>t</sub>: retention time; <sup>b</sup>Eluate in the C18 column in oven at 32°C; <sup>c</sup>Linear gradient of methanol/5% formic acid. Data are in µg isoflavone.mg<sup>-1</sup> of dry weight extract (exudates). Soybean tissues were treated with 10 mM of SNP for 15 hours (50 tissue units/10 mL) and the exudates extracted for 20 minutes by methanol 80% following of HPLC-PDA-MS/MS analysis at 300 nm.

**Table 2.** Mass spectra of isoflavonoids from soybean extracts analyzed by HPLC-PDA-MS/MS.

peak <sup>a</sup>	Compound	[M+H] <sup>+</sup> ( <i>m/z</i> )	[MS/MS] <sup>+</sup> ( <i>m/z</i> )	[M-H] <sup>-</sup> ( <i>m/z</i> )	[MS/MS] <sup>-</sup> ( <i>m/z</i> )
1	not identified	561	369, 207	559	517, 499, 427, 367, 205
2	Daidzin	417	255	415	253
3	Glycitin	443	285	445	283
4	Genistin	433	271	431	269
5	malonyl-daidzin	503	255	501	253
6	malonyl-glycitin	533	285	531	283
7	malonyl-genistin	519	271	517	269
8	daidzein	255	237, 227, 199, 137	253	237, 225, 209, 181
9	glycitein	285	267, 225, 197, 145	283	268, 241
10	not identified	n.d.	n.d.	271	253, 227, 177, 151
11	genistein	271	253, 243, 215, 153	269	253, 227, 196, 181

<sup>a</sup>numbered in accordance to Table 1

**Table 3.** Analysis of the compounds present in extracts of soybean from embryo and cotyledons tissues treated with 100 mM SNP for 20 hours and analyzed by HPLC-PDA.

peak	Compounds	% composition of treated tissues <sup>a</sup>		Concentration $\mu\text{g.mL}^{-1}$	
		Embryo	Cotyledon	Embryo	Cotyledon
1	not identified	*	*	**	**
2	daidzin	2 ± 0,9	0.5 ± 0,1	2.15 ± 0,96	0.34 ± 0.07
3	glycitin	1 ± 0,6	4 ± 0,2	2.0 ± 1,14	4.4 ± 0.22
4	genistin	1 ± 0,7	3 ± 0,5	1.7 ± 1.2	3.8 ± 0.63
5	malonyl-daidzin	*	*	**	**
6	malonyl-glycitin	*	*	**	**
7	malonyl-genistin	*	*	**	**
8	daidzein	49 ± 4	40 ± 3	27.1 ± 2,21	16.48 ± 1.23
9	glycitein	22 ± 2	5 ± 1	26.1 ± 2.3	4.34 ± 0.09
10	not identified	*	*	**	**
11	genistein	4 ± 1	26 ± 3	3.2 ± 0.84	16.34 ± 1.9

<sup>a</sup>Relative percentage average. \*The approximate percentage of these compounds (1, 5, 6, 7 and 10) in extracts of embryo and cotyledon is 21 and 21.5%, respectively. \*\*The sum of the calculated values (1, 5, 6, 7 and 10) as a function of daidzin is in  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ : 22.5 for the embryo and 17.15 for the cotyledon. The values are equivalent to 50 embryos or 50 cotyledons treated with 100 mM SNP for 20 hours which extraction was carried out for 20 minutes in methanol 80% and analyzed by HPLC-PDA. The mean and standard deviations of the analysis in triplicate are presented.

Figure 1

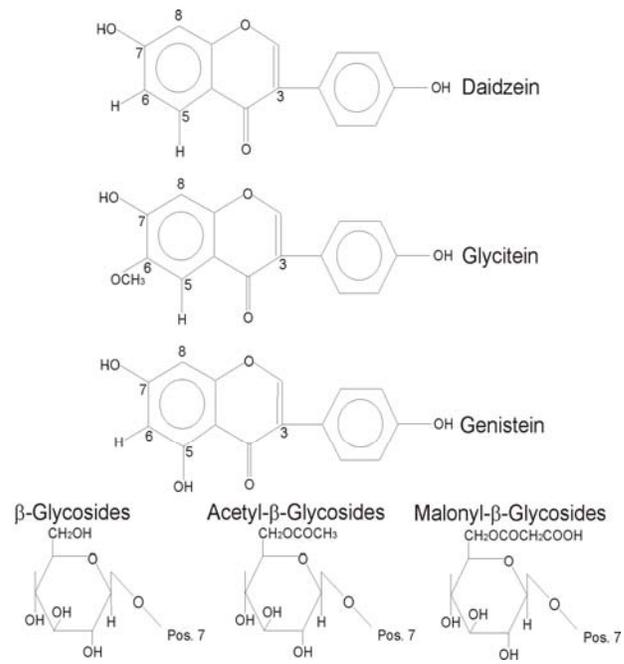
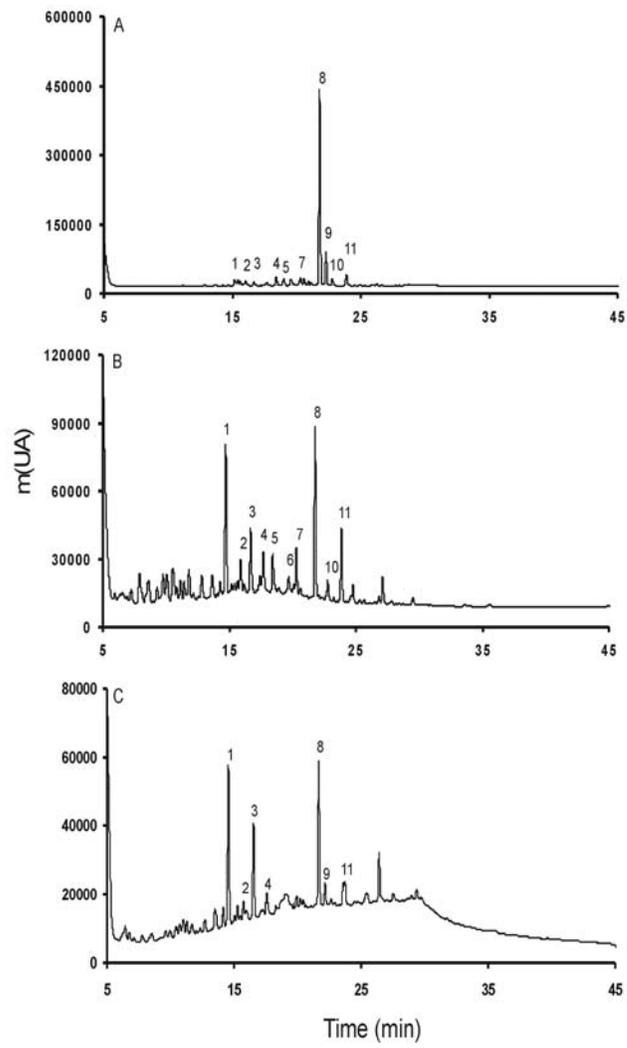


Figure 2



**Figure 3**

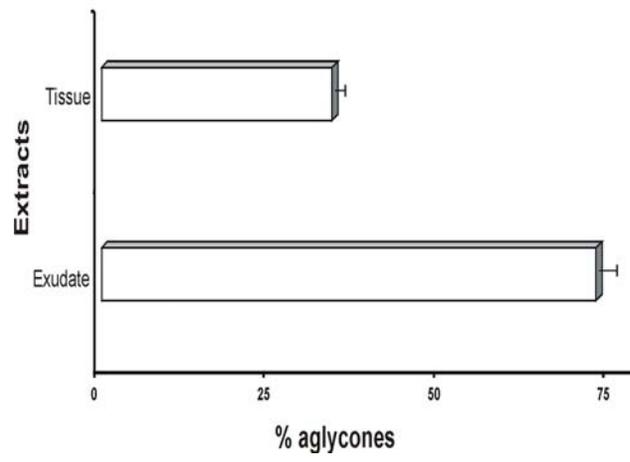


Figure 4

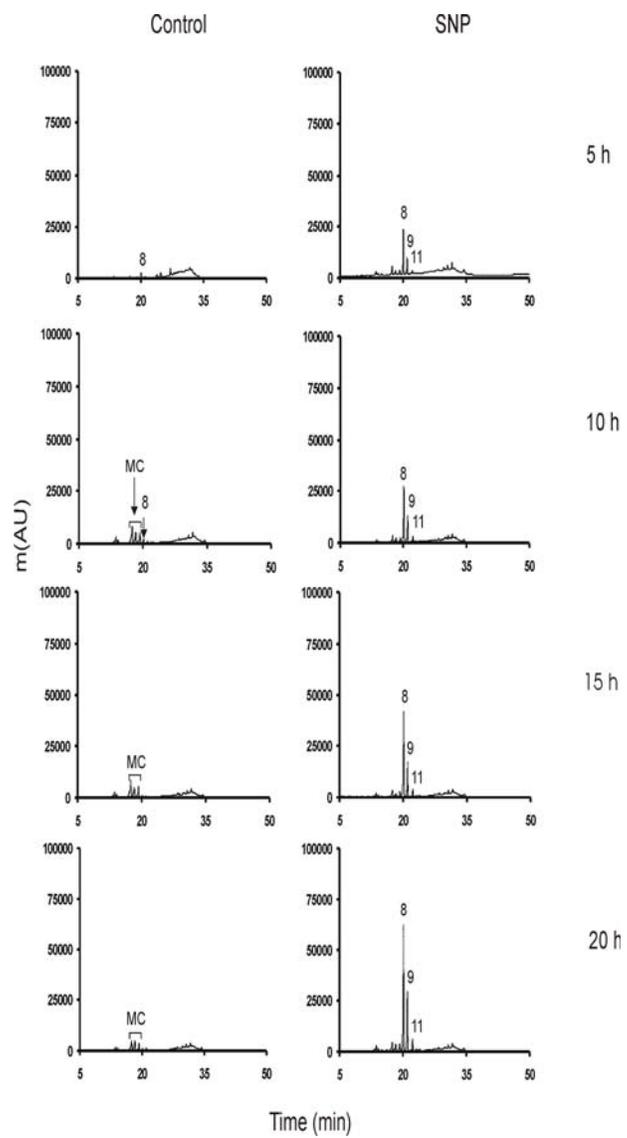


Figure 5

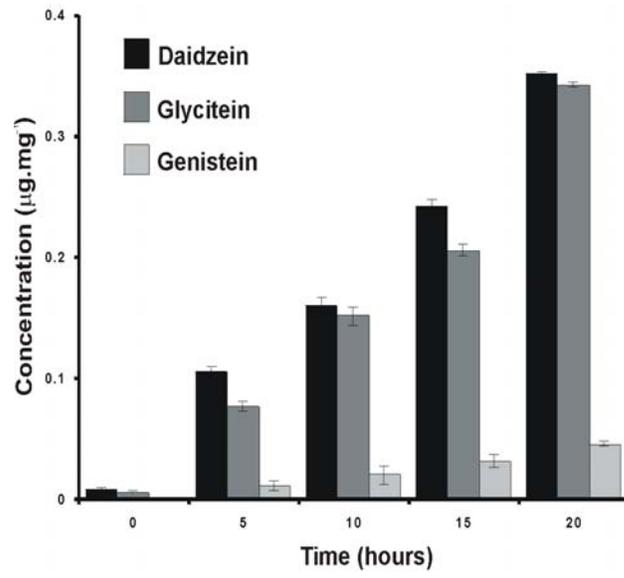


Figure 6

