



DESEMPENHO DA QUANTIFICAÇÃO DE β - GLICOSIDASE UTILIZANDO VOLUMES REDUZIDOS DE AMOSTRA

Ana Lúcia Miranda (PIBIC/Araucária-UEL), Luciane Yuri Yoshiara (doutoranda/CNPQ), Elza Louko Ida (orientadora)
elida@uel.br

Universidade Estadual de Londrina /Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos/Londrina,PR

Ciências agrárias / ciência de alimentos

Palavras-chave: β -D-glicosídeo glicohidrolase, aglicona, determinação da atividade enzimática

Resumo

As formas agliconas das isoflavonas de soja são as que apresentam melhor biodisponibilidade no organismo. As β -glicosidases, provenientes do metabolismo de microorganismos ou do grão da soja, convertem as formas glicosiladas das isoflavonas em agliconas. Na metodologia usual para a determinação da atividade dessas enzimas são utilizadas alíquotas de 0,5 mL de amostra e para determinação de proteínas solúveis são utilizadas alíquotas de 1,0 mL. Ambos os volumes são elevados em relação à amostra total obtida durante uma extração. Com isso, o objetivo desta pesquisa foi adequar à metodologia usual utilizando volumes reduzidos de 0,1 mL, 0,2 mL, 0,25 mL e 0,3 mL de amostra para atividade enzimática e volumes de 0,2mL e 0,3 mL e 0,5mL de amostra para proteínas solúveis. Para a determinação da atividade de β - glicosidase foi utilizado o substrato p-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo (p-NPG) e para determinação de proteínas solúveis foi utilizado a albumina de soro bovino como padrão. Para avaliar o desempenho da adequação do método, foi utilizado teste de tukey ($p < 0,05$). Para as análises de atividade enzimática, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as amostras de volumes 0,1 mL, 0,2 mL, 0,25 mL e 0,3 mL. Já na determinação de proteínas solúveis houve diferença significativa ($p < 0,05$) nas amostras de 0,2mL e 0,3 mL e somente o volume de 0,5mL não demonstrou interferência na metodologia usual.

Introdução

As isoflavonas agliconas são as formas que possuem maior efeito biológico no organismo e por isso, muitos estudos são direcionados à biotransformação das formas glicosiladas em agliconas por meio da enzima β -glicosidase. Esta enzima é resultado do metabolismo de microorganismos (fúngico ou bacteriano) ou pode ser encontrada no próprio grão de soja (PARK et al,2001).



Para determinação da atividade da enzima β -glicosidase, utiliza-se a metodologia descrita por Matsuura e Obata (1993). Nesta metodologia utilizam-se alíquotas de 0,5mL de amostra, que são relativamente elevadas em relação à amostra total obtida em uma extração, principalmente se for aplicado para acompanhar um processo de purificação da enzima que envolve várias etapas e quantificações.

Assim, o objetivo deste estudo foi adequar a metodologia de determinação de atividade da enzima β -glicosidase utilizando volumes reduzidos de amostras e avaliar também o desempenho do método.

Materiais e métodos

Matéria prima

Foram utilizados grãos de soja *Glycine max L*, cultivar BRS-257, desenvolvida na Vitrine Tecnológica da Fazenda Experimental da Embrapa Soja em Londrina-PR.

Preparo da amostra

Os grãos foram selecionados, para a remoção dos danificados ou manchados e de matérias estranhas. Em seguida, foram separadas as cascas, os cotilédones e os hipocótilos. Os cotilédones foram moídos e utilizados para a extração da enzima β -glicosidase.

Extração

Para extração de β -glicosidase foi utilizado tampão fosfato de sódio, 0,1 M pH 6,6 na proporção 1:10 (peso/volume), com agitação por 1 hora. Em seguida a mistura foi centrifugada a 4000 g por 15 minutos. O sobrenadante foi acidificado com HCl 0,1 N até atingir o pH 5 e novamente centrifugado nas mesmas condições. O sobrenadante obtido foi denominado de extrato bruto de β -glicosidase.

Determinação da atividade de β -glicosidase

A determinação da atividade de β -glicosidase foi feita conforme o procedimento descrito por Matsuura e Obata (1993). Para reduzir o volume da amostra utilizada durante as análises foi testado o desempenho do método utilizando volumes reduzidos de amostra (0,1 mL ; 0,2 mL; 0,25 mL e 0,3 mL). Proporcionalmente, foram reduzidos também os volumes das outras soluções utilizadas durante a análise (p-NPG e Na_2CO_3). Foi feita a análise da atividade enzimática utilizando o volume usual (0,5 mL) para comparação. Os resultados foram expressos como nível de atividade de β -glicosidase, ou seja, unidade de atividade (UA) por gramas de cotilédones moídos em base seca.

Determinação de proteínas solúveis

A determinação de proteínas solúveis foi feita segundo a metodologia descrita por Lowry, et al. (1951) utilizando volumes reduzidos de amostra de 0,2 mL; 0,3 mL e 0,5 mL; comparando-os com o volume original do método (1,0 mL). Os resultados foram expressos em mg de proteína solúvel por g de amostra em base seca.

Procedimentos analíticos

Para avaliação da metodologia, foram realizadas 5 repetições em triplicata para todas as análises de proteínas solúveis em dias diferentes, totalizando 15 repetições de cada volume reduzido. Já para determinação de atividade enzimática, foram realizadas 4 análises em triplicata em dias diferentes, totalizando 16 repetições para cada volume e uma análise em triplicata para confirmação dos resultados. Os reagentes utilizados foram de grau analítico.

Análise Estatística

Os dados foram analisados e a comparação das médias foi feita através do teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade utilizando o software Statistica 8.0 (StatSoft, 2007).

Resultados e Discussão

A Tabela 1 apresenta a atividade de β -glicosidase utilizando volumes reduzidos. As amostras de volumes reduzidos utilizadas na determinação da atividade de β -glicosidase, não apresentaram diferença significativa entre si ($p > 0,05$), portanto, mostra-se vantajoso utilizar o menor volume e de 0,1 mL de amostra para essa determinação.

Tabela 1: Atividade de β -glicosidase utilizando volumes reduzidos

Volume de amostra (mL)	β -glicosidase (UA/g bs)
0,1	44,83 \pm 3,75 ^a
0,2	44,93 \pm 1,54 ^a
0,25	44,45 \pm 1,81 ^a
0,3	43,71 \pm 3,14 ^a
0,5	44,26 \pm 3,34 ^a

Valores representam média \pm desvio padrão de unidade de atividade enzimática por miligrama de proteína (UA/g bs). Médias seguidas da mesma letra, não diferem significativamente ($p > 0,05$)

As amostras utilizadas para determinação de proteínas solúveis, mostraram variação significativa ($p < 0,05$) (Tabela 2), demonstrando interferência do volume de amostra utilizado no resultado da metodologia usual para volumes de 0,3 mL e 0,2 mL. Porém, para a amostra de volume de 0,5 mL, não houve interferência no resultado da metodologia usual e portanto, vantajoso o uso de volume menor.

Tabela 2: Teor de Proteínas solúveis utilizando volumes reduzidos.

Volume de amostra (mL)	Proteínas solúveis (mg/g bs)
0,2	53,6±4,64 ^{b,c}
0,3	51,74±2,95 ^c
0,5	55,54±3,66 ^{a,b}
1	58,04±2,55 ^a

Valores representam média ± desvio padrão de unidade de atividade enzimática por miligrama de proteína (mg/g bs) Médias na mesma coluna seguidas de letras diferentes diferem significativamente ($p < 0,05$)

Os resultados da Tabela 3 confirmam que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os 5 volumes testados.

Tabela 3: Confirmação de resultados de atividade de β -glicosidase utilizando volumes reduzidos.

Volume de Amostra (mL)	β -glicosidase UA/g bs
0,1	43,81±1,41 ^a
0,2	44,98±1,44 ^a
0,25	43,85±1,08 ^a
0,3	44,4±1,79 ^a
0,5	43,99±1,60 ^a

Valores representam média ± desvio padrão de unidade de atividade enzimática por miligrama de proteína (UA/g bs) Médias com a mesma letra ,não diferem significativamente ($p > 0,05$)

Conclusões

É vantajoso utilizar os volumes reduzidos de 0,1 mL para determinação de atividade de β -glicosidase e de 0,5 mL para determinação de proteínas solúveis, os quais não demonstraram interferência no resultado da metodologia usual.

Agradecimentos

Agradeço a Universidade Estadual de Londrina e a Fundação Araucária pela concessão da bolsa de iniciação científica.

Referências

- Lowry, O.H.; et al. Protein measurement with folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 1951, 193, 265-275.
- Matsuura, M.; Obata, A. β -glicosidase from soybeans hydrolyse daidzeína and genistina. **J. food sci.** 1993, 58, p 1623-1627.
- Park, Y.K.; Aguiar, C.L.; Alencar, S.M.; Mascarenhas, H.A.A&; Scamparini, A.R.P. Avaliação do teor de isoflavonas em soja brasileira. **Ciência e Tecnologia de alimentos**, v3, n.3p.156-160, 2001.