



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS
VOLTAMÉTRICOS DE ANÁLISE PARA A
DETERMINAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS
EM AMOSTRAS DE SOJA**

Jonatas Gomes da Silva

Tese de Doutorado apresentado ao programa de Pós – Graduação do Instituto de Química da Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor

Orientador: Jurandir Rodrigues de Souza

BRASÍLIA, 2012



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS
VOLTAMÉTRICOS DE ANÁLISE PARA A
DETERMINAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS
EM AMOSTRAS DE SOJA**

Jonatas Gomes da Silva

Tese de Doutorado apresentado ao
programa de Pós – Graduação do Instituto
de Química da Universidade de Brasília,
como requisito parcial à obtenção do título
de Doutor

Orientador: Jurandir Rodrigues de Souza

BRASÍLIA , 2012



COMUNICADO

Comunicamos a aprovação da Defesa de Tese de Doutorado do aluno **Jonatas Gomes da Silva**, intitulada **Desenvolvimento e Validação de Métodos Voltamétricos de Análise para a determinação de Metabólitos Secundários em amostras de soja**, apresentada no Instituto de Química da Universidade de Brasília em 22 de março de 2012.

Prof. Dr. Jurandir Rodrigues de Souza
Presidente (IQ – UnB)

Prof. Dr. Joel Camargo Rubim
Membro Titular (IQ – UnB)

Profª. Drª. Ilana Felberg
Membro Titular (CTAA)

Prof. Dr. Alexandre Fonseca
Membro Titular (IQ – UnB)

Prof. Dr. Leonardo Giordano Paterno
Membro Titular (IQ-UnB)

Brasília, 22 de março de 2012.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo.

Aos meus pais Pompeu e Naíde, ao meu irmão Márcio, à minha cunhada Élica, à minha sobrinha Lara e à minha prima Janneane, pelo apoio.

Ao Prof. Dr. Jurandir Rodrigues de Souza, pela orientação prestada no desenvolvimento deste trabalho.

À Dr^a. Clarissa Silva Pires de Castro da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Carlos Manoel Pedro Vaz da Embrapa Instrumentação, pela colaboração no desenvolvimento dos métodos voltamétricos de análise.

À Dr^a. Mercedes Concórdia Carrão Panizzi da Embrapa Soja, pela doação das amostras de diferentes cultivares de soja.

À Prof^a. Dr^a. Aline Carlos de Oliveira da Universidade Federal de Uberlândia, pela colaboração no desenvolvimento dos métodos voltamétricos de análise.

À Prof^a. Dr^a. Lucia Helena Mascaro da Universidade Federal de São Carlos, pela colaboração no desenvolvimento dos métodos voltamétricos de análise.

À Dr^a. Maria Carolina Blassioli Moraes da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

À Dr^a. Luzia Helena Corrêa Lima da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pela colaboração no plantio de soja e no preparo das amostras.

À Dr^a. Ieda de Carvalho Mendes e ao assistente Lucas Ferreira Lima Sobreira Rolim da Embrapa Cerrados, pela colaboração no plantio de soja.

Ao Eduardo Ferreira, pela assistência prestada no Laboratório de Química Analítica Ambiental na Universidade de Brasília.

À Gabriella Magarelli e ao Jorge Alex Taquita Melo, pela assistência prestada no Laboratório de Tecnologias para a Segurança Alimentar na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Aos alunos de Iniciação Científica e estagiários Caroline Luchtenberg Ribeiro, Idio Alves de Sousa Filho, Inayan Séphora Dourado Lopes, Mariana Rodrigues Lopes e Silva e Thiago Viana de Freitas, pelo auxílio nos experimentos.

À Prof^a. Dr^a. Silvia Keli de B. Alcanfor, pela amizade, incentivo e apoio desde a graduação.

Aos amigos Ana Paula, Cíntia, Luciana, Karine, Rafael e Sheila pelo incentivo, pelo apoio e principalmente pela amizade.

Aos demais colegas e amigos que contribuíram para minha formação acadêmica.

Ao IQ/UnB e à Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

À CAPES e CNPq, pelo suporte financeiro.

RESUMO

A voltametria cíclica (CV) foi utilizada para estudar o processo de oxidação/redução de metabólitos secundários da soja, na forma livre ou complexada com o Cu(II), nos eletrodos de carbono vítreo (GC) e de mercúrio de gota pendente (HMDE). Três eletrodos (HMDE, eletrodos sólidos de GC e grafite) e três diferentes técnicas voltamétricas (voltametria adsortiva de redissolução catódica (CAdSV), voltametria adsortiva de redissolução (AdSV) e voltametria de pulso diferencial (DPV)) foram utilizados no desenvolvimento de dez métodos de análise de metabólitos secundários de soja. Dois destes métodos desenvolvidos foram selecionados para a análise de comprimidos à base de extrato de soja, quatro amostras preparadas de isoflavonas e folhas e grãos de soja de cinco cultivares. No estudo do processo de oxidação/redução das isoflavonas no eletrodo de GC foram observados picos irreversíveis, correspondentes a oxidação do 4'-hidróxi do anel B. Para a rotina no eletrodo de GC, observou-se um pico reversível, correspondente à oxidação do 3',4'- dihidróxi do anel B e um pico irreversível correspondente à oxidação do 5,7-dihidróxi do anel A. No estudo do processo de oxidação/redução do complexo Cu(II)-rutina no HMDE foi observado um pico de redução quasi-reversível. O primeiro método voltamétrico desenvolvido e selecionado para as análises, baseado na acumulação do complexo Cu(II)-rutina no HMDE, utilizando-se a CAdSV, apresentou limite de detecção da ordem de 10^{-9} mol L⁻¹ e foi aplicado na determinação de rutina em grãos e folhas de soja. Nos grãos das cultivares P98R62, BRQ 96-3065 e Dowling e nas folhas da cultivar Dowling não foi detectada rutina. No entanto, para as folhas da cultivar IAC 100, este flavonóide foi detectado com concentração média de 0,197 mg g⁻¹. A recuperação de rutina adicionada variou de 94 a 105%, indicando ausência de efeito de matriz. O segundo método voltamétrico desenvolvido e selecionado para as análises, baseado na oxidação das isoflavonas no eletrodo de GC, utilizando-se a DPV, apresentou limite de detecção da ordem de 10^{-7} mol L⁻¹ e foi aplicado na determinação de isoflavonas totais em: quatro amostras preparadas de isoflavonas, comprimidos a base de extrato soja e grãos da cultivar Flora. Nas análises das amostras preparadas, observou-se que os menores valores de erros relativos foram obtidos na amostra de composição semelhante aos produtos à base de soja fermentados. Estes resultados indicam a necessidade do processo de hidrólise ácida na preparação das amostras de grãos de soja, com o objetivo de minimizar a interferência das formas glicosiladas na quantificação de isoflavonas totais. A concentração média de isoflavonas totais no comprimido à base de extrato de soja foi 31,44 mg comprimido⁻¹, com erro relativo menor que 10% em relação ao indicado no rótulo. Na determinação de isoflavonas totais em grãos de soja da cultivar Flora, foi realizada uma extração em fase sólida para a remoção dos interferentes, e foi obtida uma concentração média de isoflavonas totais de 0,184 mg g⁻¹. Este valor é próximo ao encontrado em grãos de soja de três genótipos cultivados em Londrina (PR). A recuperação de daidzeína ou genisteína adicionada indica ausência de efeito de matriz. Os estudos realizados com o primeiro método, quanto à concentração de rutina, e com o segundo método, quanto à identificação e quantificação de isoflavonas totais, em cultivares de soja, poderão ser aplicados no manejo integrado de pragas e em programas de melhoramento genético; contribuindo para a sustentabilidade de sistemas agrícolas baseados na produção de soja.

ABSTRACT

Cyclic voltammetry (CV) was used to study the oxidation/reduction process of soybean secondary metabolites, free or complexed with Cu (II), at a hanging mercury drop electrode (HMDE) and at a glassy carbon electrode (GC). Three electrodes (HMDE, GC and graphite electrodes) and three different voltammetric techniques (adsorptive cathodic stripping voltammetry (CAAdSV), adsorptive stripping voltammetric (AdSV) and differential pulse voltammetry (DPV)) were used to develop ten methods of soybean secondary metabolites analysis. Two of these developed methods were used to analyze a soybean pharmaceutical formulation, four isoflavone known samples and leaves and seeds of four soybean cultivars. In the study of the oxidation/reduction process of isoflavones at GC electrode, irreversible peaks, which correspond to the oxidation of 4'-hydroxy group of B ring, were observed. For rutin, two peaks were observed at GC electrode, a reversible one which corresponds to the oxidation of 3', 4'-dihydroxy group of B ring and a irreversible one which corresponds the 5,7-dihydroxy group of A ring. A quasi-reversible reduction peak was observed in the study of the oxidation/reduction process of Cu²⁺-rutin complex at HMDE. The first developed method, which is based on the accumulation of the Cu(II)-rutin complex at HMDE, presented a detection limit in the order of 10⁻⁹ mol L⁻¹ and it was applied on the determination of rutin in seeds and leaves of four soybean cultivars. Rutin was not detected in the seeds of P98R62, BRQ 96-3065 and Dowling and in the leaves of Dowling. However, for IAC 100 soybean cultivar, this flavonoid was detected with a concentration value of 0.197 mg g⁻¹. The recovery of added rutin ranged from 94 to 105%, indicating the absence of matrix effect. The second developed method, which is based on the oxidation of isoflavones at GC electrode, presented a detection limit in the order of 10⁻⁷ mol L⁻¹ and it was applied on the determination of total isoflavones in four known samples, in a soybean pharmaceutical formulation and in the seeds of a soybean cultivar (Flora). For known samples, the smallest error was obtained for those in which isoflavone composition are similar to soybean fermented products. These results indicate that it is necessary to have an acid hydrolysis process during the preparation of soybean samples, in order to minimize the interference of glycosylated forms. The total concentration of isoflavones in pharmaceutical soybean formulation was found to be 31.44 mg tablet⁻¹, with relative error of less than 10% when compared to the label value. In the determination of total isoflavones in Flora, a solid phase extraction was performed in order to remove interfering compounds and an average concentration of total isoflavones was found to be 0.184 mg g⁻¹. This obtained value is close to that found for three soybean genotypes which were grown in Londrina (PR). The recovery of added daidzein or genistein indicates the absence of matrix effect. The results obtained in the determination of rutin and total isoflavones in soybean cultivars using the developed voltammetric methods may be applied in integrated pest management and breeding programs, contributing for the sustainability of agricultural systems based on soybean production.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas e Acrônimos	xi
Lista de Tabelas	xiii
Lista de Figuras	xvi
I – Introdução	1
1. Soja	1
2. Metabólitos secundários em soja	2
3. Identificação e quantificação de metabólitos secundários	7
4. Voltametria	9
4.1 Técnicas voltamétricas	10
4.1.1 Polarografia clássica ou de corrente contínua	11
4.1.2 Voltametria de pulso	13
4.1.2.1 Voltametria de pulso normal	14
4.1.2.2 Voltametria de pulso diferencial	15
4.1.2.3 Voltametria de onda quadrada	16
4.1.3 Voltametria de redissolução	18
4.1.4 Voltametria adsortiva de redissolução	20
4.1.5 Voltametria cíclica	22
5. Identificação e quantificação de metabólitos secundários por técnicas voltamétricas	24
6. Preparação de amostras de soja para a identificação e quantificação de metabólitos secundários	30
II – Objetivos do Trabalho	33
III - Experimental	35
1. Material	35
1.1 Reagentes	35
1.2 Soluções	36
1.3 Amostras de soja	38
1.4 Vidraria	38
1.5 Aparelhagem utilizada na preparação das amostras e das soluções	39
1.6 Aparelhagem utilizada nos experimentos voltamétricos	39

2. Metodologia	40
2.1 Eletrodos	40
2.2 Avaliação da aplicabilidade do HMDE e de eletrodos sólidos para a detecção e quantificação de metabólitos secundários em amostras de soja por técnicas voltamétricas	40
2.3 Otimização dos parâmetros e condições experimentais para a detecção e quantificação de metabólitos secundários em amostras de soja por técnicas voltamétricas (Estudos Qualitativos)	43
2.3.1 Estudo do processo de oxidação/redução dos metabólitos secundários no eletrodo de GC por CV	44
2.3.2 Estudo do processo de oxidação/redução do complexo Cu ²⁺ -rutina no HMDE por CV	45
2.3.3 Otimização dos parâmetros e condições experimentais para a determinação de rutina por DPAdSV utilizando-se o HMDE	46
2.3.3.1 Eletrólito suporte e pH	46
2.3.3.2 Potencial de acumulação, tempo de acumulação, amplitude de pulso e velocidade de varredura	47
2.2.3.3 Concentração de Cu ²⁺	49
2.3.4 Otimização dos parâmetros e condições experimentais para a detecção e quantificação de metabólitos secundários por DPV e DPAdSV	51
2.4 Obtenção das figuras analíticas de mérito	52
2.4.1 Curvas analíticas	52
2.5 Análise de amostras preparadas de isoflavonas	53
2.6 Preparação de amostras de soja para a identificação e quantificação de metabólitos secundários	55
2.6.1 Comprimidos à base de extrato soja	55
2.6.2 Folhas e Grãos de soja	56

2.7 Análise dos comprimidos à base de extrato de soja e de grãos de soja da cultivar Flora utilizando-se a DPV e o eletrodo de GC	56
2.8 Análise de amostras de grãos e folhas de soja das cultivares P98R6, BRQ 96-3065, IAC-100 e Dowling, utilizando-se a DPAdSV e o HMDE	58
IV – Resultados e Discussão	60
1. Avaliação da aplicabilidade do HMDE e eletrodos sólidos para a detecção e quantificação de metabólitos secundários em amostras de soja por técnicas voltamétricas	61
2. Otimização dos parâmetros e condições experimentais para a detecção e quantificação de metabólitos secundários em amostras de soja por técnicas voltamétricas (Estudos Qualitativos)	63
2.1 Estudo do processo de oxidação/redução dos metabólitos secundários no eletrodo de GC por CV	63
2.2 Estudo do processo de oxidação/redução do complexo Cu^{2+} -Rutina no HMDE por CV	65
3. Obtenção das figuras analíticas de mérito (Estudos Quantitativos)	67
3.1 Determinação de metabólitos secundários utilizando-se a DPAdSV e o HMDE	67
3.2 Determinação de metabólitos secundários utilizando-se a DPV e o HMDE	69
3.3 Determinação de metabólitos secundários utilizando-se a DPV e o eletrodo de Grafite	72
3.4 Determinação de metabólitos secundários utilizando-se a DPV ou a DPAdSV e o eletrodo de GC	76
3.5 Resumo dos métodos analíticos desenvolvidos para a determinação de metabólitos secundários	82
4. Análise de amostras preparadas de isoflavonas	84
5. Análise de comprimidos à base de extrato soja	85
6. Análise de folhas e Grãos de soja	87

7. Estudos preliminares de determinação de isoflavonas totais em grãos de soja da cultivar Flora, utilizando-se a DPV e o eletrodo de GC	88
V – Conclusão	90
VI – Perspectivas Futuras	92
VII – Referências Bibliográficas	93
VIII – Anexo I - Otimização dos Parâmetros Voltamétricos e das Condições Experimentais Ótimas para a Determinação de Metabólitos Secundários em Amostras de Soja	98
1. Otimização dos parâmetros voltamétricos e das condições experimentais ótimas para a determinação de metabólitos secundários em amostras de soja, utilizando-se a DPV e o eletrodo de HMDE	99
2. Otimização dos parâmetros voltamétricos e das condições experimentais ótimas para a determinação de metabólitos secundários em amostras de soja, utilizando-se a DPV e o eletrodo de HMDE	100
3. Otimização dos parâmetros voltamétricos e das condições experimentais ótimas para a determinação de metabólitos secundários em amostras de soja, utilizando-se a DPV e o eletrodo de grafite	102
4. Otimização dos parâmetros voltamétricos e das condições experimentais ótimas para a determinação de metabólitos secundários em amostras de soja, utilizando-se a DPV ou a DPAdSV e o eletrodo de GC	105
IX – Anexo II - Trabalhos Publicados e/ou Submetidos a Periódicos Indexados, Resumos em Congresso ou Outros Tipos de Produção Bibliográfica no Período	109

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS

AdSV	– Voltametria adsortiva de redissolução
ASV	– Voltametria de redissolução anódica
CAdSV	– Voltametria adsortiva de redissolução catódica
CSV	– Voltametria de redissolução catódica
CTAB	– Brometo de cetiltrimetilamônio
CV	– Voltametria cíclica
DC	– Corrente contínua
DME	– Eletrodo gotejante de mercúrio
DPAAdSV	– Voltametria adsortiva de redissolução de pulso diferencial
DPASV	– Voltametria de redissolução anódica de pulso diferencial
DPCAAdSV	– Voltametria adsortiva de redissolução catódica de pulso diferencial
DPV	– Voltametria de pulso diferencial
$E^{0'}$	– Potencial padrão de redução formal
E_{ac}	– Potencial de acumulação
E_d	– Potencial de deposição
E_f	– Potencial final
E_i	– Potencial inicial
E_{pa}	– Potencial do pico anódico
E_{pc}	– Potencial do pico catódico
E_w	– Potencial de inversão
GC	– Carbono vítreo
GPU	– Grafite poliuretana
HMDE	– Eletrodo de mercúrio de gota pendente
HPLC	– Cromatografia líquida de alta eficiência
i_d	– Corrente de difusão
I_{pa}	– Corrente de pico anódico
I_{pc}	– Corrente de pico catódico
LD	– Limite de detecção
LQ	– Limite de Quantificação
MS	– Espectrometria de massas
NPV	– Voltametria de pulso normal

PC	– Cromatografia em papel
PU	– Poliuretana
SCE	– Eletrodo de calomelano saturado
SPE	– Extração em fase sólida
SWV	– Voltametria de onda quadrada
t_{ac}	– Tempo de acumulação
t_d	– Tempo de deposição
TLC	– Cromatografia em camada delgada
Φ	– Diâmetro
v	– Velocidade de varredura
τ	– Período do pulso

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Principais isoflavonas encontradas na soja	4
Tabela 2.	Preparação de amostras de soja para a determinação de isoflavonas utilizando a HPLC	31
Tabela 3.	Reagentes	35
Tabela 4.	Parâmetros utilizados nos testes para avaliar o perfil voltamétrico dos metabólitos secundários com o HMDE e diferentes eletrodos sólidos	43
Tabela 5.	Condições experimentais utilizadas nos testes para avaliar o perfil voltamétrico dos metabólitos secundários com o HMDE e diferentes eletrodos sólidos	43
Tabela 6.	Parâmetros utilizados no estudo do processo de oxidação/redução dos metabólitos secundários no eletrodo de GC por CV	44
Tabela 7.	Condições experimentais utilizadas no estudo do processo de oxidação/redução dos metabólitos secundários no eletrodo de GC por CV	44
Tabela 8.	Parâmetros utilizados no estudo do processo de oxidação/redução do complexo Cu^{2+} -rutina no HMDE por CV	45
Tabela 9.	Condições experimentais utilizadas no estudo do processo de oxidação/redução do complexo Cu^{2+} -rutina no HMDE por CV	45
Tabela 10.	Parâmetros utilizados no estudo da influência do eletrólito suporte e do pH na corrente do complexo Cu^{2+} -rutina por DPCAdSV utilizando-se o HMDE	47
Tabela 11.	Condições experimentais utilizadas no estudo da influência do eletrólito suporte e do pH na corrente do complexo Cu^{2+} -rutina por DPCAdSV utilizando-se o HMDE	47
Tabela 12.	Parâmetros utilizados no estudo da influência do potencial de acumulação, tempo de acumulação, amplitude de pulso e velocidade de varredura na corrente do complexo Cu^{2+} -rutina por DPCAdSV utilizando-se o HMDE	48
Tabela 13.	Condições experimentais utilizadas no estudo da influência do potencial de acumulação, tempo de acumulação, amplitude de pulso e velocidade de varredura na corrente do complexo Cu^{2+} -rutina por DPCAdSV utilizando-se o HMDE	49

Tabela 14.	Parâmetros utilizados no estudo da influência da concentração de cobre na corrente do complexo Cu^{2+} -rutina por DPAdSV utilizando-se o HMDE	50
Tabela 15.	Condições experimentais utilizadas no estudo da influência da concentração de cobre na corrente do complexo Cu^{2+} -rutina por DPAdSV utilizando-se o HMDE	50
Tabela 16.	Parâmetros utilizados nos estudos de otimização por DPV e DPAdSV, utilizando-se o HMDE e os eletrodo de GC e grafite	52
Tabela 17.	Condições experimentais utilizadas nos estudos de otimização por DPV e DPAdSV, utilizando-se o HMDE e os eletrodo de GC e grafite	52
Tabela 18.	Parâmetros utilizados na análise das amostras preparadas de isoflavonas por DPV utilizando-se o eletrodo de GC ou HMDE	54
Tabela 19.	Condições experimentais utilizadas na análise das amostras preparadas de isoflavonas por DPV utilizando-se o eletrodo de GC ou HMDE	55
Tabela 20.	Condições experimentais utilizadas na preparação das amostras dos comprimidos à base de extrato de soja	56
Tabela 21.	Parâmetros utilizados na determinação de isoflavonas totais em comprimidos à base de extrato de soja e de grãos de soja da cultivar Flora, por DPV, utilizando-se o eletrodo de GC	58
Tabela 22.	Condições experimentais utilizadas na determinação de isoflavonas totais em comprimidos à base de extrato de soja e de grãos de soja da cultivar Flora, por DPV, utilizando-se o eletrodo de GC	58
Tabela 23.	Parâmetros utilizados na determinação de rutina em grãos e folhas de soja das cultivares P98R6, BRQ 96-3065, IAC-100 e Dowling, por DPAdSV, utilizando-se o HMDE	60
Tabela 24.	Condições experimentais utilizadas na determinação de rutina em grãos e folhas de soja das cultivares P98R6, BRQ 96-3065, IAC-100 e Dowling, por DPAdSV, utilizando-se o HMDE	60
Tabela 25.	Parâmetros voltamétricos e condições experimentais otimizadas para a determinação de rutina, utilizando-se a DPAdSV e o HMDE	67
Tabela 26.	Parâmetros voltamétricos e condições experimentais otimizadas para a determinação de metabólitos secundários totais por meio da daidzeína e daidzina, utilizando-se o HMDE com a DPV	70

Tabela 27.	Parâmetros voltamétricos e condições experimentais otimizadas para a determinação de metabólitos secundários totais por meio da daidzeína, genisteína e rutina, utilizando-se o eletrodo de grafite com a DPV	74
Tabela 28.	Parâmetros voltamétricos e condições experimentais otimizadas para a determinação de metabólitos secundários totais por meio da daidzeína, genisteína e rutina, utilizando-se o eletrodo de GC com a DPV	78
Tabela 29.	Parâmetros voltamétricos e condições experimentais otimizadas para a determinação de genisteína, utilizando-se a DPAdSV com o eletrodo de GC	81
Tabela 30.	Figuras analíticas de mérito dos métodos analíticos desenvolvidos para a determinação de metabólitos secundários	82
Tabela 31.	Resultados obtidos nas análises das quatro amostras preparadas de isoflavonas	84
Tabela 32.	Determinação das isoflavonas totais em comprimidos à base de extrato de soja	86
Tabela 33.	Determinação de rutina em amostras de grãos e folhas de soja	87

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Cultura de Soja.	1
Figura 2.	Fórmula estrutural básica dos flavonóides e sua numeração.	2
Figura 3.	Fórmulas estruturais dos subgrupos dos flavonóides.	3
Figura 4.	Percevejo <i>Nezara viridula</i> .	6
Figura 5.	a) Estrutura química da rutina; b) Lagarta da soja <i>Anticarsia gemmatalis</i> .	6
Figura 6.	a) Pulgão <i>Aphis glycines</i> ; b) <i>Coccinella septempunctata</i> .	7
Figura 7.	Célula eletroquímica utilizada para a realização de uma análise voltamétrica com três eletrodos.	10
Figura 8.	Polarografia: aparelhagem básica.	11
Figura 9.	a) Sinal de excitação da polarografia clássica, varredura linear; b) Polarograma característico.	13
Figura 10.	Variação da corrente faradáica e da corrente capacitiva com o tempo do pulso, em técnicas de pulso.	14
Figura 11.	a) Sinal de excitação da voltametria de pulso normal; b) Voltamograma característico da NPV.	15
Figura 12.	Sinal de excitação da voltametria de pulso diferencial. a) usado em equipamentos analógicos; b) usado em equipamentos digitais.	15
Figura 13.	Voltamograma característico da DPV.	16
Figura 14.	a) Escada de potencial; b) Onda quadrada c) Sinal de excitação da voltametria de onda quadrada.	17
Figura 15.	Voltamograma característico da SWV.	17
Figura 16.	Sinal de excitação para a determinação do M^{2+} por redissolução anódica.	19
Figura 17.	Voltamograma DPASV do zinco, cádmio, chumbo e do cobre.	19
Figura 18.	Sinal de excitação para a determinação do M^{n+} por voltametria adsortiva de redissolução catódica.	21
Figura 19.	Voltamograma característico da DPCAdSV.	21

Figura 20.	Sinal de excitação para a CV. a) usado em equipamentos analógicos; b) usado em equipamentos digitais.	22
Figura 21.	Voltamograma característico da voltametria cíclica.	23
Figura 22.	Voltamogramas característicos para processos redox: a) reversíveis; b) quasi - reversíveis; c) irreversíveis.	24
Figura 23.	Reação de oxidação da genisteína.	25
Figura 24.	Mecanismo proposto para a redução da genisteína no HMDE.	26
Figura 25.	Voltamogramas de onda quadrada das isoflavonas daidzeína, genistina e daidzina na presença de $4,5 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ de genisteína em tampão fosfato-metanol (8:2, v/v, pH 7,5) + $2,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ do surfactante CTAB: a) $4,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ de daidzeína; b) $3,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de genistina; e c) $6,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de daidzina.	27
Figura 26.	Voltamogramas cíclicos para eletrodos compósitos: a) 30; b) 40; c) 50; d) 60; e) 70% (grafite, m/m); e (f) GC em $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ em solução de KCl $0,500 \text{ mol L}^{-1}$.	29
Figura 27.	Reação de oxidação da rutina.	30
Figura 28.	Esquema das hidrólises básica e ácida das isoflavonas.	31
Figura 29.	Analizador voltamétrico 797 VA Computrace (Metrohm).	39
Figura 30.	Diagramas esquemáticos dos procedimentos adotados nos testes para avaliar o perfil voltamétrico dos metabólitos secundários com o HMDE (a) e diferentes eletrodos sólidos (b) por DPV e no estudo do processo de oxidação/redução dos metabólitos secundários no eletrodo de GC por CV (b).	41
Figura 31.	Diagrama esquemático do procedimento adotado nos testes para avaliar o perfil voltamétrico dos metabólitos secundários com o HMDE por DPCAdSV e no estudo do processo de oxidação/redução do complexo Cu^{2+} -rutina no HMDE por CV.	42
Figura 32.	Diagrama esquemático do procedimento adotado no estudo da influência do eletrólito suporte e do pH na corrente do complexo Cu^{2+} -rutina por DPCAdSV utilizando-se o HMDE.	46
Figura 33.	Diagrama esquemático do procedimento adotado no estudo da influência do potencial de acumulação, tempo de acumulação, amplitude de pulso e velocidade de varredura na corrente do complexo Cu^{2+} -rutina por DPCAdSV utilizando-se o HMDE.	48

Figura 34.	Diagrama esquemático do procedimento adotado no estudo da influência da concentração de cobre na corrente do complexo Cu^{2+} -rutina por DPAdSV utilizando-se o HMDE.	49
Figura 35.	Diagrama esquemático do procedimento adotado na otimização dos parâmetros e condições experimentais para a detecção e quantificação de metabólitos secundários por DPV e DPAdSV, utilizando-se o HMDE e os eletrodo de GC e grafite.	51
Figura 36.	Diagrama esquemático do procedimento adotado na obtenção da curva analítica. a) por DPV e DPAdSV utilizando-se o HMDE e os eletrodo de GC e grafite; (b) por DPAdSV utilizando-se o HMDE.	53
Figura 37.	Diagrama esquemático do procedimento adotado na análise das amostras preparadas de isoflavonas.	54
Figura 38.	Diagrama esquemático do procedimento adotado na preparação das amostras dos comprimidos à base de extrato de soja.	55
Figura 39.	Diagrama esquemático do procedimento adotado na preparação de grãos e folhas de soja.	56
Figura 40.	Diagrama esquemático do procedimento adotado na determinação de isoflavonas totais em comprimidos à base de soja e de grãos de soja da cultivar Flora, por DPV, utilizando-se o eletrodo de GC.	57
Figura 41.	Diagrama esquemático do procedimento adotado na determinação de rutina em de grãos e folhas de soja das cultivares P98R6, BRQ 96-3065, IAC-100 e Dowling, por DPAdSV, utilizando-se o HMDE.	59
Figura 42.	a) Voltamogramas adsorptivos de redissolução catódica de pulso diferencial para a daidzeína $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e rutina $2,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ na presença de Cu^{2+} $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em 10 mL de tampão fosfato pH 6,0 utilizando o HMDE; b) Voltamogramas de pulso diferencial para o metabólito secundário $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em 10 mL de tampão fosfato pH 3,0 utilizando o HMDE; e voltamogramas de pulso diferencial para o metabólito secundário $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em 10 mL de tampão fosfato pH 5,0. c) Eletrodo de ouro; d) Eletrodo de platina; e) Eletrodo de carbono vítreo; f) Eletrodo de grafite.	62
Figura 43.	Voltamogramas cíclicos para as soluções de daidzeína (a), daidzina (b), genisteína (c), genistina (d), gliciteína (e) e glicitina (f) $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (---) em tampão fosfato pH 6,0 (—). Inserções: Curva I_{pc} vs v .	64

Figura 44.	Voltamogramas cíclicos para a solução de rutina $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (---) em tampão fosfato pH 6,0 (—). Inserção: Curva I_{pc} vs v.	65
Figura 45.	Voltamogramas cíclicos para a solução de Cu^{2+} $4,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ na ausência (curva B) e na presença de rutina $4,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (curva C) em tampão fosfato pH 6,0 (curva A). Inserção: Curva I_{pc} vs v.	66
Figura 46.	Voltamogramas adsortivos de redissolução catódica de pulso diferencial obtidos para o Cu^{2+} $1,6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em 10 mL de tampão fosfato pH 6,0 em diferentes concentrações de rutina. Inserção: Curva analítica.	68
Figura 47.	Voltamogramas adsortivos de redissolução catódica de pulso diferencial obtidos para o Cu^{2+} $1,6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em 10 mL de tampão fosfato pH 6,0 em diferentes concentrações de isoflavonas.	69
Figura 48.	Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para o metabólito secundário $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em 10 mL de tampão fosfato pH 3,0.	70
Figura 49.	Voltamogramas de pulso diferencial em 10 mL de tampão fosfato pH 3,0 com adições sucessivas de 10 μL de daidzeína $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.	71
Figura 50.	Voltamogramas de pulso diferencial em 10 mL de tampão fosfato pH 3,0 com adições sucessivas de 5 μL de daidzina $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.	72
Figura 51.	Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para o metabólito secundário $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em 10 mL de tampão fosfato pH 3,0.	73
Figura 52.	Voltamogramas de pulso diferencial em 10 mL de tampão fosfato pH 3,0 com adições sucessivas de 40 μL de daidzeína $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.	74
Figura 53.	Voltamogramas de pulso diferencial em 10 mL de tampão fosfato pH 3,0 com adições sucessivas de 40 μL de genisteína $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.	75
Figura 54.	Voltamogramas de pulso diferencial em 10 mL de tampão fosfato pH 4,0 com adições sucessivas de 20 μL de rutina $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.	76
Figura 55.	Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para o metabólito secundário $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em 10 mL de tampão fosfato pH 6,0.	77
Figura 56.	Voltamogramas de pulso diferencial em 10 mL de tampão fosfato pH 6,0 com adições sucessivas de 10 μL de daidzeína $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.	78

Figura 57.	Voltamogramas de pulso diferencial em 10 mL de tampão fosfato pH 6,0 com adições sucessivas de 10 μ L de genisteína $1,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ .	79
Figura 58.	Voltamogramas de pulso diferencial em 10 mL de tampão fosfato pH 6,0 com adições sucessivas de 20 μ L de rutina $1,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ .	80
Figura 59.	Voltamogramas adsortivos de pulso diferencial em 10 mL de tampão fosfato pH 4,0 com adições sucessivas de 5 μ L de genisteína $1,0 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ .	81
Figura 60.	Voltamogramas de pulso diferencial em 10 mL de tampão fosfato pH 6,0 com 1500 μ L da amostra de grão de soja da cultivar flora com adições sucessivas de 10 μ L de genisteína $1,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ .	89
Figura 61.	Otimização dos parâmetros voltamétricos e das condições experimentais ótimas utilizando-se a DPCAdSV para a rutina $1,0 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹ em 10 mL de eletrólito suporte. a) Estudo do pH; b) Estudo do potencial de acumulação (E_{ac}); c) Estudo do tempo de acumulação (t_{ac}); d) Estudo da concentração de Cu ²⁺ ; e) Estudo da amplitude de pulso; f) Estudo da velocidade de varredura (v).	99
Figura 62.	Otimização dos parâmetros voltamétricos e das condições experimentais ótimas utilizando-se a DPV para a daidzeína $2,0 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ . a) Estudo do pH; b) Estudo da amplitude de pulso; c) Estudo da velocidade de varredura (v); d) Repetibilidade.	100
Figura 63.	Otimização dos parâmetros voltamétricos e das condições experimentais ótimas utilizando-se a DPV para a daidzina $2,0 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ . a) Estudo do pH; b) Estudo da amplitude de pulso; c) Estudo da velocidade de varredura (v); d) Repetibilidade.	101
Figura 64.	Otimização dos parâmetros voltamétricos e das condições experimentais ótimas utilizando-se a DPV para a daidzeína $1,0 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ . a) Estudo do pH; b) Estudo da amplitude de pulso; c) Estudo da velocidade de varredura (v); d) Repetibilidade.	102
Figura 65.	Otimização dos parâmetros voltamétricos e das condições experimentais ótimas utilizando-se a DPV para a genisteína $1,0 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ . a) Estudo do pH; b) Estudo da amplitude de pulso; c) Estudo da velocidade de varredura (v); d) Repetibilidade.	103
Figura 66.	Otimização dos parâmetros voltamétricos e das condições experimentais ótimas utilizando-se a DPV para a rutina $1,0 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ . a) Estudo do pH; b) Estudo da amplitude de pulso; c) Estudo da velocidade de varredura (v); d) Repetibilidade.	104

- Figura 67. Otimização dos parâmetros voltamétricos e das condições experimentais ótimas utilizando-se a DPV para a daidzeína $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. a) Estudo do pH; b) Estudo da amplitude de pulso; c) Estudo da velocidade de varredura (v); d) Repetibilidade. 105
- Figura 68. Otimização dos parâmetros voltamétricos e das condições experimentais ótimas utilizando-se a DPV para a genisteína $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. a) Estudo do pH; b) Estudo da amplitude de pulso; c) Estudo da velocidade de varredura (v); d) Repetibilidade. 106
- Figura 69. Otimização dos parâmetros voltamétricos e das condições experimentais ótimas utilizando-se a DPV para a rutina $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. a) Estudo do pH; b) Estudo da amplitude de pulso; c) Estudo da velocidade de varredura (v); d) Repetibilidade. 107
- Figura 70. Otimização dos parâmetros voltamétricos e das condições experimentais ótimas utilizando-se a DPAdSV para a genisteína $6,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. a) Estudo do pH; b) Estudo do potencial de acumulação (E_{ac}); c) Estudo do tempo de acumulação (t_{ac}); d) Estudo da amplitude de pulso; e) Estudo da velocidade de varredura (v); f) Repetibilidade. 108

I - INTRODUÇÃO

1. Soja

A cultura da soja (*Glycine max*) (Figura 1) no Brasil e no resto mundo, apresentou nas últimas décadas, um crescimento de mais de 100% de área cultivada quando comparado à década de 70. No Brasil, a soja inicialmente cultivada apenas na Região Sul, expandiu-se para o Cerrado e posteriormente para a Região Norte e Nordeste do País.¹ Isto se deve à importância da soja, sendo a principal fonte de proteínas e óleo vegetal para consumo humano e animal e à alta tecnologia de produção.



Figura 1. Cultura de Soja. [Retirado de <http://keetsa.com/blog/activism>]

Uma das consequências das grandes áreas cultivadas com soja está relacionada ao aumento de pragas que atacam essa oleaginosa, causando danos crescentes à produção.² Os percevejos são considerados as principais pragas do cultivo da soja, pois se alimentam sugando, preferencialmente, os grãos, afetando o rendimento, a qualidade das sementes e seu potencial germinativo. Além destes danos diretos, o ataque de percevejos pode ocasionar, na soja, produção de sementes com baixo vigor e menor conteúdo de óleo e proteínas e distúrbios fisiológicos.

A interação de plantas com insetos herbívoros induz mudanças fisiológicas que levam à síntese e emissão de substâncias químicas com funções diferentes nos insetos, por exemplo, atraentes, repelentes, inibidoras de oviposição, entre outras. Há vários estudos sobre defesa indireta (recrutamento de inimigos naturais desses herbívoros) e direta (afeta diretamente o desempenho do herbívoro) de plantas quando estas são danificadas por insetos mastigadores.³⁻⁸ No entanto, a produção de defesas induzidas quando as plantas são atacadas por insetos sugadores é menos conhecida, com exceção de alguns trabalhos.⁹⁻¹¹

A soja quando comparada à outras famílias de plantas, apresenta um baixo potencial alelopático, ou seja, pouca capacidade de provocar um dano em outro organismo pela liberação no meio ambiente de metabólitos secundários tóxicos. No entanto, vários estudos vêm demonstrando que algumas variedades de soja apresentam uma defesa direta e indireta eficiente contra insetos herbívoros. No geral, a soja, apresenta alto teor de isoflavonas,¹²⁻¹⁴ que são metabólitos secundários que podem ter importantes funções defensivas contra microorganismos e pestes.¹⁵

2. Metabólitos secundários em soja

Os flavonóides constituem um grupo importante de compostos polifenólicos complexos que apresenta uma estrutura comum caracterizada por dois anéis aromáticos (A e B) e um heterociclo oxigenado (anel C) (Figura 2). Estes compostos, presentes em relativa abundância entre os metabólitos secundários de vegetais, são encontrados em frutas, sementes, cascas de árvores, raízes, talos, flores e em seus produtos de preparação, tais como os chás e vinhos.¹⁶⁻¹⁷

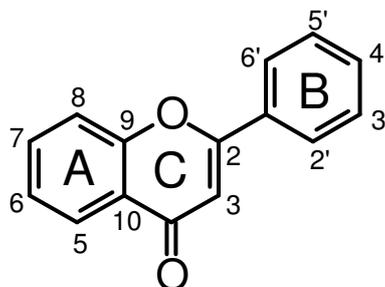


Figura 2. Fórmula estrutural básica dos flavonóides e sua numeração.

Nas plantas os flavonóides podem desempenhar diversas funções, entre elas: (1) proteção dos vegetais contra a incidência de raios ultravioleta e visível; (2) proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias; (3) atração de animais com finalidade de polinização; (4) antioxidantes; (5) controle da ação de hormônios vegetais; (6) agente alelopático; e (7) inibição de enzimas. Em uma mesma planta flavonóides diferentes podem ser encontrados nas folhas, nas flores, nos galhos, raízes ou no fruto, e o mesmo composto ainda pode apresentar diferentes concentrações, dependendo do órgão vegetal em que se encontra.¹⁸

A diversidade de formas estruturais dos flavonóides pode ser atribuída ao nível de oxidação e às variações na estrutura básica, promovidas por reações de alquilação, glicosilação ou oligomerização. Os flavonóides podem ser encontrados como agliconas ou sob a forma de glicosídeos e/ou derivados metilados e/ou acilados. As modificações no anel central desses compostos levam à diferenciação em subgrupos distintos, como: chalconas, flavanonas, flavanonóis, flavonas, flavonóis, isoflavonas, flavan-3-ols e antocianidinas.^{16,18} As fórmulas estruturais dos subgrupos dos flavonóides são mostradas na Figura 3.

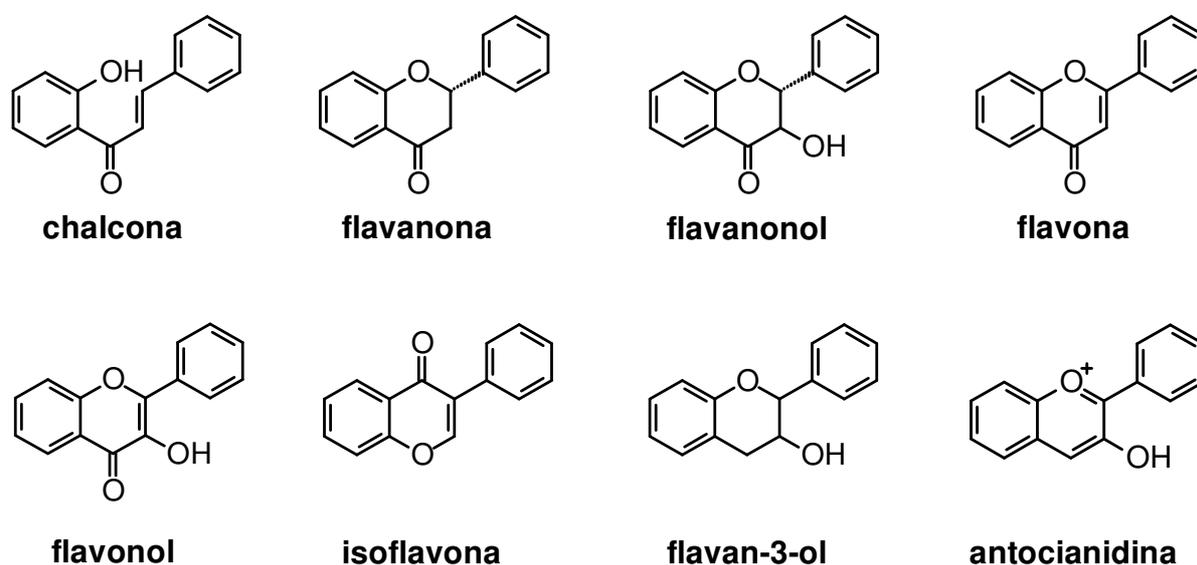
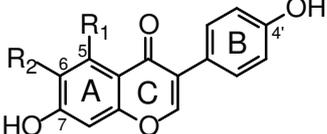
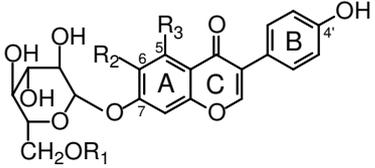


Figura 3. Fórmulas estruturais dos subgrupos dos flavonóides.

As isoflavonas são compostos orgânicos, presentes principalmente na soja e em seus derivados, que estão sendo associadas importantes propriedades biológicas, benéficas à saúde humana, como: (1) atividade antioxidante; (2) atividade antifúngica; (3) atividade antibacteriana; (4) propriedades estrogênicas; e (5) atividade anticancerígena (câncer de mama e próstata).¹⁹ As isoflavonas compreendem as agliconas (daidzeína, genisteína e gliciteína), as glicosiladas (daidzina, genistina e glicitina) e seus conjugados malonil e acetil.²⁰ As principais isoflavonas encontradas na soja estão listadas na Tabela 1.

Tabela 1. Principais isoflavonas encontradas na soja

Isoflavonas agliconas				
	R₁	R₂		
	Daidzeína	H	H	
	Genisteína	OH	H	
	Gliciteína	H	OCH ₃	
Isoflavonas glicosiladas				
	R₁	R₂	R₃	
	Daidzina	H	H	H
	6''-O-acetil-daidzina	COCH ₃	H	H
	6''-O-malonil-daidzina	COCH ₂ CO ₂ H	H	H
	Genistina	H	H	OH
	6''-O-acetil-genistina	COCH ₃	H	OH
	6''-O-malonil-genistina	COCH ₂ CO ₂ H	H	OH
	Glicitina	H	OCH ₃	H
	6''-O-acetil-glicitina	COCH ₃	OCH ₃	H
	6''-O-malonil-glicitina	COCH ₂ CO ₂ H	OCH ₃	H

As concentrações de isoflavonas nos grãos de soja variam dependendo da parte morfológica de onde é extraída (cotilédone, hipocótilo e casca),²¹ da variedade (fatores genéticos) e das condições ambientais (temperatura e umidade) de cultivo.

Carrão-Panizzi e colaboradores,^{13,22} no estudo com grãos de diferentes cultivares de soja (IAS-4, IAS 5, BA/BR-31, GO/BR-33, IAC-8, IAC-100, BR-8, BR-15, BR-16, BR-30, BR-36, BR-37, BR-38, Davis, FT-Abyara, FT-Estrela e FT-Cristalina) de diferentes locais do Brasil, observaram que a variabilidade genética e fatores ambientais afetam as concentrações de isoflavonas em soja. Temperaturas mais baixas durante o período de enchimento de grãos aumentam as concentrações de isoflavonas.²³

Park e colaboradores,¹⁹ utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), avaliaram a concentração de isoflavonas em diferentes cultivares de soja, provenientes do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC 15-1, IAC 15-2, IAC-22 e IAC-Foscarim 31-1), e o efeito da temperatura na extração de isoflavonas. Neste estudo, foi observada uma grande variação na concentração de isoflavonas entre as diferentes cultivares e o tratamento térmico (aquecimento a 121°C durante 40 min) na extração de isoflavonas provocou uma redução na concentração de malonil-isoflavonas e um aumento na concentração de glicosil-isoflavonas. Portanto, as temperaturas da localidade do cultivo e da extração são fatores determinantes da composição das diferentes formas das isoflavonas na soja.

As isoflavonas presentes na soja parecem ter importantes funções defensivas contra microorganismos e pestes.

Piubelli e colaboradores²⁴ avaliaram os efeitos deletérios de cinco cultivares de soja (BR-16 (suscetível), IAC-100, PI 227687, PI 229358 e PI 274454 (resistentes) nos estádios de desenvolvimento R5/R6) no desenvolvimento ninfal do percevejo *Nezara viridula* (Figura 4). Os genótipos resistentes afetaram negativamente o ganho de peso do percevejo, confirmando-se como alimentos inadequados para *Nezara viridula* e como genótipos promissores para serem usados em programas de melhoramento como fonte de resistência a percevejos. Em outro estudo, Piubelli e colaboradores²⁵ verificaram a capacidade dos percevejos para induzir e/ou aumentar a produção de isoflavonas (defesa química) em grãos das cinco cultivares de soja citadas no estudo anterior. No geral, os grãos atacados pelo percevejo apresentaram maior concentração de isoflavonas (daidzina e genistina) em comparação aos controles.



Figura 4. Percevejo *Nezara viridula*.

[Retirado de <http://insects.tamu.edu/images/insects/color/sgstink1.html>]

Piubelli e colaboradores,¹² utilizando a técnica de HPLC, identificaram e quantificaram os flavonóides genistina e rutina (Figura 5a), em folhas de diferentes cultivares de soja (PI 274454, PI 227687 e IAC 100), e estudaram seus efeitos sobre a lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis* (Figura 5b). As cultivares analisadas apresentaram características acentuadas de resistência e foram consideradas fontes inadequadas para o desenvolvimento da lagarta. Considerando as concentrações de rutina e genistina nessas cultivares, sugere-se que estes flavonóides são importantes fatores que conferem resistência à *Anticarsia gemmatalis*. O efeito da dieta contendo rutina no comportamento e na nutrição da *Anticarsia gemmatalis* foi avaliado por Hoffmann-Campo e colaboradores.²⁶ A rutina afetou negativamente o crescimento do inseto, por efeitos pré-ingestivos, indicados pela redução no consumo, e pós-ingestivos, indicados por baixas conversões do alimento ingerido em biomassa e assimilação de alimentos.

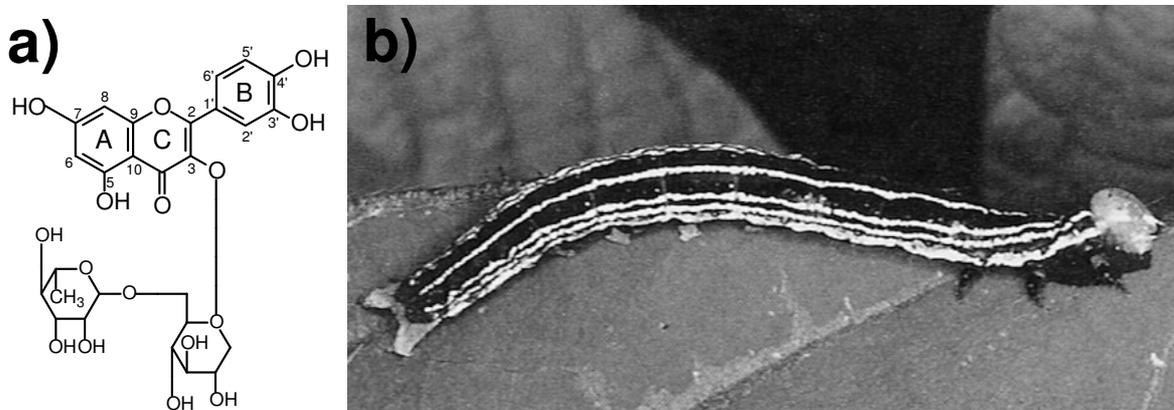


Figura 5. a) Estrutura química da rutina; b) Lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis*. [Retirado de <http://www.dowagro.com/br/lorsban/pragas/lagartasoja>]

Além dos flavonóides que são compostos não voláteis (defesa direta sobre o herbívoro), alguns estudos mais recentes mostraram que a soja também apresenta defesa indireta. Zhu e Park ²⁵ mostraram que plantas de soja infestadas pelo pulgão, *Aphis glycines* (Figura 6a), induziram a defesa das plantas, que liberaram maior quantidade de uma série de compostos, incluindo o metil salicilato. Este composto elicitou a resposta eletrofisiológica no predador do pulgão, a *Coccinella septempunctata* (Figura 6b). Desta maneira o estudo das defesas constitutivas e induzidas apresenta grande interesse e potencial para sua utilização no manejo de pragas,³ que poderá ser realizado tanto na identificação e quantificação de possíveis metabólitos secundários que possam ser usados no campo em armadilhas, bem como no desenvolvimento de plantas melhoradas geneticamente.

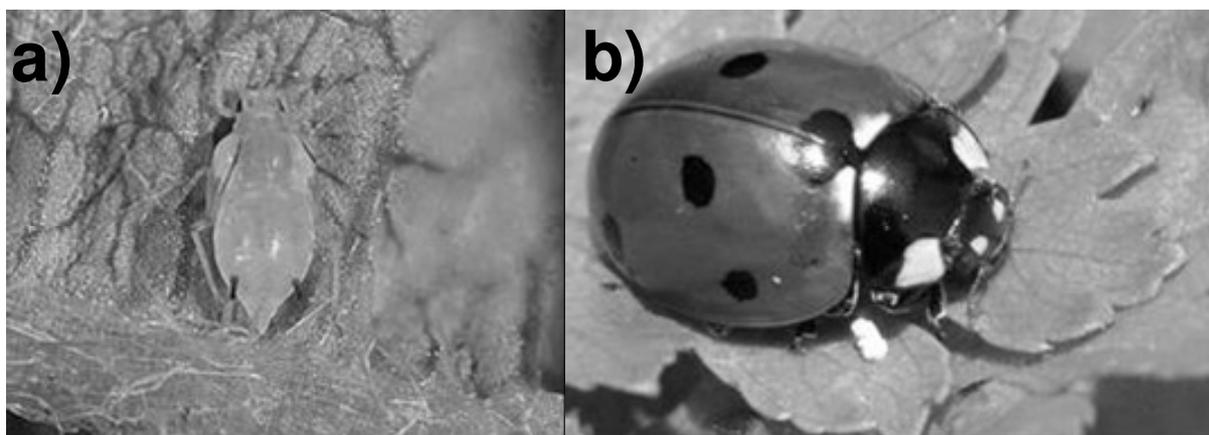


Figura 6. a) Pulgão *Aphis glycines*; b) *Coccinella septempunctata*.
[Retirado de <http://www.ag.ndsu.edu/pubs/plantsci/pests/e1232w.htm> e <http://www.commanster.eu/commanster/Insects>]

3. Identificação e quantificação de metabólitos secundários

Na literatura, vários métodos analíticos têm sido propostos para a identificação e quantificação de metabólitos secundários, em particular os flavonóides e ácidos fenólicos, em diversas matrizes (frutas, verduras, produtos industrializados).²⁷ Os métodos enzimáticos²⁸ e os espectrofotométricos²⁹ diretos e indiretos (colorimetria, espectros de primeira e segunda derivada) foram os primeiros a serem utilizados para a determinação da concentração total de fenólicos. No entanto, as dificuldades experimentais associadas às medidas (apenas a fração

solúvel é considerada na medida, dificuldade na seleção de reagentes colorimétricos e comprimentos de onda em função do grande número de compostos) e a falta de especificidade destes métodos têm gerado resultados questionáveis (superestimativa da concentração dos fenólicos). Com o advento dos métodos cromatográficos, os flavonóides e ácidos fenólicos passaram a ser identificados pela cromatografia em papel (PC).²⁷ Vários trabalhos foram desenvolvidos nos anos 1950 e 1960, porém a maior parte tem apenas um valor histórico, uma vez que a PC foi rapidamente substituída pela cromatografia em camada delgada (TLC), devido a sua rapidez e simplicidade.³⁰⁻³¹ Vários flavonóides foram separados e identificados por TLC, usando diferentes fases estacionárias (celulose,³² poliamida,³³ sílica³⁴) e solventes (benzeno³⁴ e acetato de etila³⁵). No entanto, a precisão baixa para quantificar esses compostos, tornaram o uso da TLC limitado e abriram espaço para a cromatografia gasosa, que passou a ser utilizada para a análise de flavonóides.³⁶ A principal desvantagem deste método é a volatilidade limitada de muitos flavonóides, especialmente os glicosídeos, que precisam ser derivatizados antes da análise por cromatografia gasosa. Devido a esta limitação, a cromatografia gasosa abriu espaço para a HPLC, a qual combina separação e quantificação simultâneas sem a necessidade de derivatização. Muitos foram os trabalhos desenvolvidos para a análise de flavonóides e ácidos fenólicos em diversas matrizes (plantas, verduras, frutas, sucos de frutas) por HPLC, onde foram utilizadas uma variedade de fases estacionárias (diversos tipos de colunas) e móveis (solventes de diferentes polaridades) e diferentes tipos de detecção (ultravioleta-visível, fluorescente, colorimétrica, eletroquímica).²⁷ Com o advento, dos métodos combinados e a possibilidade de uma análise mais seletiva, sensível e rápida, a cromatografia gasosa e a cromatografia líquida acopladas ou não a espectrometria de massas, se tornaram os métodos mais aplicáveis para a identificação e quantificação dos flavonóides e ácidos fenólicos.³⁷⁻⁴¹ Vários trabalhos⁴²⁻⁵² têm sido publicados com uso destes métodos, porém ambos requerem etapas laboriosas de extração e purificação da amostra e demandam alto consumo de solventes e gases e técnicos especializados para a condução das análises. Além disso, são métodos de grande porte (difíceis de serem adaptadas ao campo) e de alto custo (manutenção dos equipamentos), cujas respostas podem ser bastante influenciadas por interferentes. Pode-se ainda destacar que nas análises por cromatografia gasosa e cromatografia gasosa-MS, os flavonóides são identificados e quantificados na forma aglicona.

Uma alternativa para superar as limitações dos métodos cromatográficos e de espectrometria de massas na determinação de metabólitos secundários em amostras de soja é o desenvolvimento de novos métodos de análise, baseados em técnicas voltamétricas, pois são: (1) técnicas de alta sensibilidade; (2) técnicas que permitem a determinação rápida, simultânea e precisa de diversos analitos em uma única varredura; (3) técnicas com teoria bem desenvolvida; (4) técnicas que permitem a análise em material colorido ou com partículas sólidas dispersas; (5) técnicas cujos sinais de resposta sofrem uma menor influência de interferentes; (6) técnicas que podem ser adaptadas ao campo por meio da construção de ultra-microeletrodos e biossensores. Os métodos voltamétricos,⁵³⁻⁵⁶ além de permitirem a análise de amostras de soja com custos e tempos reduzidos, quando comparados aos métodos convencionais (cromatografia e espectrometria de massas), poderão ser aplicados em estudos agrônômicos e de ecologia química, visando o uso de metabólitos secundários no monitoramento de pragas, para a redução do uso de inseticidas em lavouras de soja e no melhoramento genético da soja bem como na avaliação da qualidade da soja sob o ponto de vista sensorial e nutricional, para a seleção de soja destinada à nutrição humana e animal.

4. Voltametria

A voltametria é uma técnica eletroquímica que estuda as relações entre o potencial, a corrente e o tempo, durante a eletrólise da espécie de interesse (analito). Nesta técnica, um potencial variável (sinal de excitação) é aplicado sobre uma célula eletroquímica e uma resposta de corrente, que é proporcional à concentração do analito, se desenvolve em função do sinal de excitação. A voltametria é amplamente utilizada em análises químicas de rotina e de pesquisa.⁵⁷⁻⁵⁸

A célula eletroquímica utilizada para a realização de uma análise voltamétrica consiste em três eletrodos (de trabalho, de referência e auxiliar) imersos em uma solução contendo o analito e o eletrólito suporte (Figura 7). O eletrodo de trabalho é um eletrodo polarizável que geralmente é um metal como mercúrio, platina ou ouro, mas também pode ser de carbono vítreo (GC). O eletrodo de referência pode ser o eletrodo de calomelano saturado (SCE) ou o eletrodo de

prata/cloreto de prata (Ag/AgCl) e o eletrodo auxiliar geralmente é de platina. O potencial é aplicado entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência em forma de varredura, e a curva obtida de corrente *versus* a diferença de potencial gerada entre esses eletrodos é chamada de voltamograma.

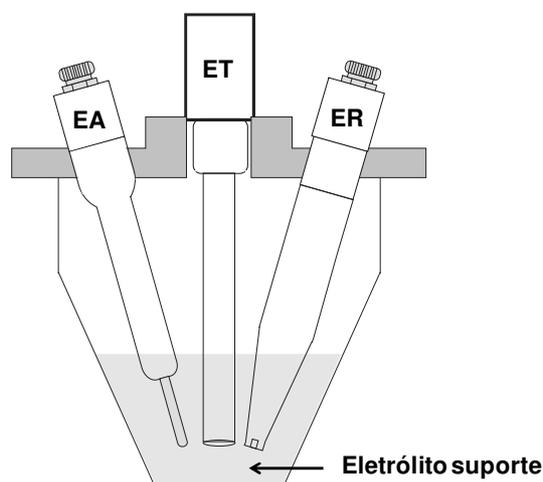


Figura 7. Célula eletroquímica utilizada para a realização de uma análise voltamétrica com três eletrodos. ET = Eletrodo de Trabalho; ER= Eletrodo de Referência; EA = Eletrodo Auxiliar.

O eletrodo de mercúrio é amplamente utilizado em voltametria, pois possui um intervalo de potencial negativo relativamente amplo, até -1,800 V vs SCE, que se deve a sobrevoltagem (grau de polarização do eletrodo) para a redução do íon H^+ na superfície do mercúrio. No entanto, para potenciais positivos, o intervalo é menor, até + 0,250 V vs SCE, devido à oxidação do mercúrio. Para estudos em potenciais positivos é mais apropriado o uso dos eletrodos de platina, de ouro ou de carbono vítreo. Outra vantagem para o uso do eletrodo de mercúrio é o fato de que a superfície do eletrodo é renovada pela produção de uma nova gota, reduzindo os efeitos de contaminação ou de envenenamento da superfície do eletrodo.

4.1 Técnicas voltamétricas

As diversas técnicas voltamétricas são discutidas a seguir.

4.1.1 Polarografia clássica ou de corrente contínua

Os primeiros estudos voltamétricos foram realizados por Heyrovsky em 1922 usando uma célula eletroquímica de dois eletrodos, sendo um eletrodo gotejante de mercúrio (DME) como eletrodo de trabalho e o sistema Hg^0 (poço de mercúrio/ Hg_2Cl_2) como eletrodo de referência e eletrodo auxiliar.⁵⁹⁻⁶⁰ A área superficial grande do eletrodo de referência possibilita que apenas o eletrodo de trabalho seja polarizado durante a varredura de potencial.

Quando o eletrodo de trabalho consiste em mercúrio gotejante é utilizado o termo polarografia para a técnica.⁶¹ A aparelhagem básica utilizada nas análises polarográficas é mostrada na Figura 8.

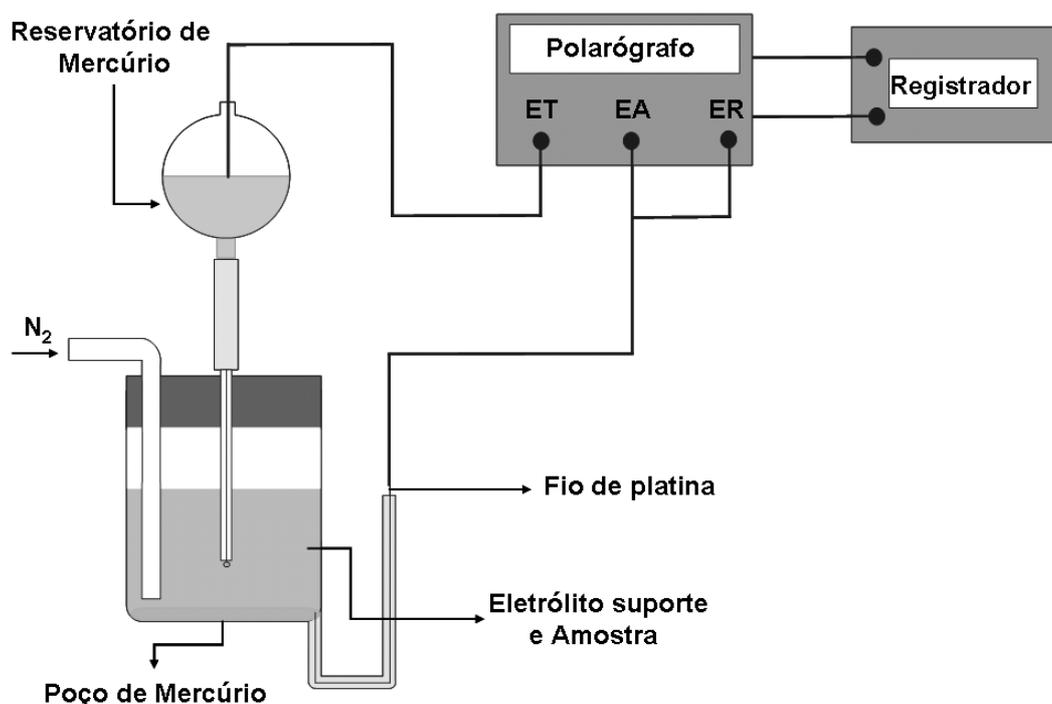


Figura 8. Polarografia: aparelhagem básica.

ET = Eletrodo de Trabalho; ER = Eletrodo de Referência; EA = Eletrodo Auxiliar.

Em análises polarográficas é necessária a remoção do O_2 atmosférico dissolvido nas soluções, pois o O_2 é eletroativo e produz duas ondas polarográficas na região catódica (-0,050 V e -1,000 V vs SCE). A remoção do O_2 é feita por meio do borbulhamento (purga) com um gás inerte (N_2), diretamente na solução por alguns minutos.

Para a análise quantitativa, a informação mais importante do polarograma é a obtenção do valor da corrente de difusão (i_d), pois esta corrente é proporcional à concentração do analito. A difusão é um processo de transferência de massa entre a solução e a superfície do eletrodo, no qual o movimento de espécies químicas ocorre sob a influência de um gradiente de concentração, ou seja, as substâncias deslocam-se de regiões de concentrações altas para regiões de concentrações baixas.

A relação entre a i_d (corrente do tipo faradáica) e a concentração do analito é dada pela equação de Ilkovic (Equação 1).

$$i_d = 607 n D^{1/2} m^{2/3} t^{1/6} C \quad (1)$$

onde:

i_d = corrente de difusão (μA);

n = número de elétrons;

D = coeficiente de difusão da espécie eletroativa ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$);

m = velocidade de fluxo de Hg (mg s^{-1})

t = tempo de gota (s);

C = concentração (mmol L^{-1}).

Além da difusão, mais dois processos de transferência de massa entre a solução e a superfície do eletrodo podem ocorrer. Um desses processos é a migração, que é provocada pela diferença de potencial que existe entre a superfície do eletrodo e a solução. A corrente originada deste processo pode ser minimizada pela adição de um eletrólito inerte, em uma concentração pelo menos 100 vezes maior que a substância eletroativa. O outro processo é a convecção, no qual o transporte de massa da espécie eletroativa para o eletrodo é por meio do movimento físico da solução. A convecção resultante da diferença de temperatura e densidade também contribui para o transporte de massa. A corrente de convecção pode ser minimizada mantendo-se a solução sem agitação.⁵⁷

Na polarografia clássica é utilizada, como sinal de excitação, uma rampa linear de potencial (Figura 9a), no qual o potencial é aplicado de positivo para negativo a uma velocidade constante. A corrente é medida continuamente durante o tempo de vida da gota de mercúrio, obtendo-se o polarograma mostrado na Figura 9b.

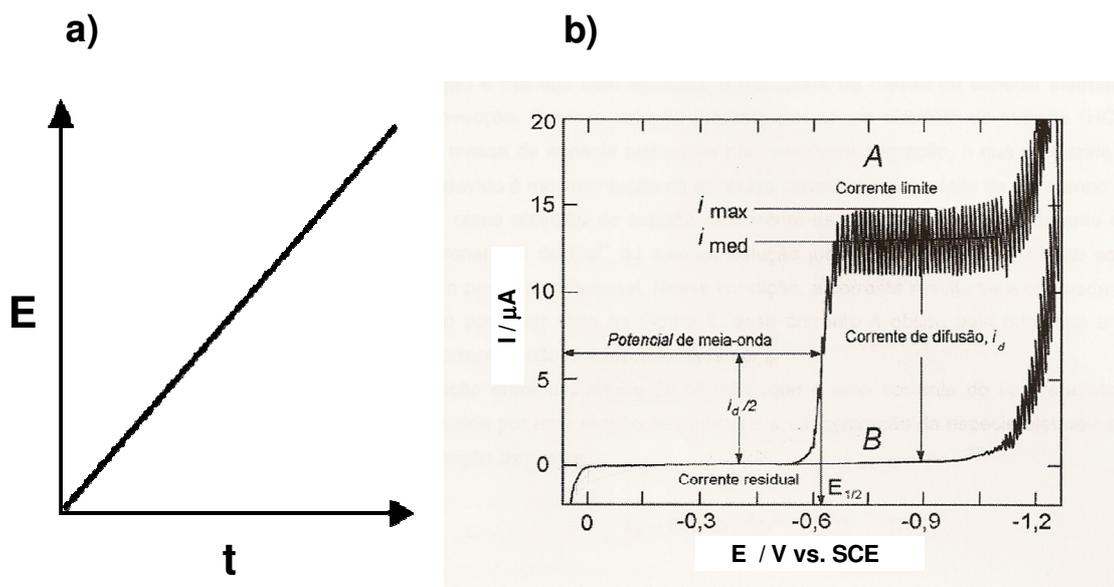


Figura 9. a) Sinal de excitação da polarografia clássica, varredura linear; b) Polarograma característico. [Retirado de Skoog, D. A.; Holler, F.J.; Nieman, T. A.; *Princípios de Análise Instrumental*, 6ª ed., Bookman: Porto Alegre, 2009.]

A técnica de corrente contínua é muito limitada do ponto de vista analítico, devido ao seu alto limite de detecção (da ordem de $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). Esta limitação se deve principalmente a corrente capacitiva (não faradáica), que é uma das componentes da corrente residual mostrada no polarograma da Figura 9b. Essa corrente é proveniente de fenômenos relacionados à dupla camada elétrica, que possui comportamento semelhante ao de um capacitor (interface eletrodo/eletrólito suporte).⁶⁰

4.1.2 Voltametria de pulso

A melhoria instrumental na diferenciação entre a corrente faradáica e a corrente capacitiva, foi conquistada com o desenvolvimento das técnicas de pulso, principalmente a de pulso diferencial. A instrumentação foi desenvolvida de tal modo que as medidas de corrente e aplicações de potencial e pulsos de potencial são realizadas em intervalos de tempo muito pequenos durante o período de tempo de cada degrau do sinal de excitação.⁶² Nas técnicas de pulso o decaimento da corrente capacitiva, após a aplicação do pulso de potencial, é muito mais rápido que o da corrente faradáica. Portanto, as medidas de corrente somente são realizadas após a contribuição da corrente capacitiva ter sido minimizada. A Figura 10 mostra

as dependências das correntes faradáica e capacitiva com relação ao período do pulso (τ) e com o ponto onde a medida de corrente é realizada, nas técnicas de pulso.⁶³

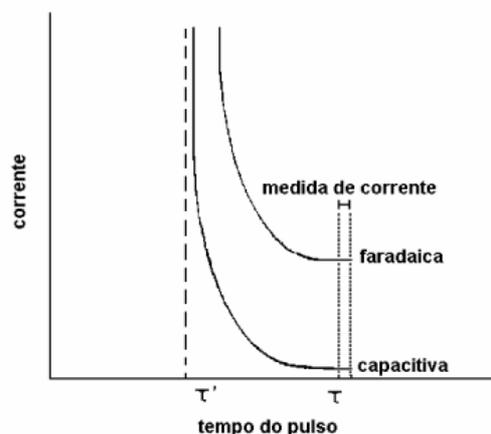


Figura 10. Variação da corrente faradáica e da corrente capacitiva com o tempo do pulso, em técnicas de pulso. [Retirado de Souza, D.; Machado, S. A. A.; Avaca, L. A. *Quim. Nova* 2003, 26, 81.]

As técnicas de pulso se baseiam na cronoamperometria, ou seja, na medida da corrente em função do tempo de aplicação de um determinado pulso de potencial. A corrente medida está relacionada com a largura do pulso e com o degrau de potencial que é aplicado nos eletrodos de trabalho e de referência.⁶³⁻⁶⁴ A diferença na maneira de aplicar os pulsos de potencial é que caracteriza as diferentes técnicas de pulso.

4.1.2.1 Voltametria de pulso normal

Na voltametria de pulso normal (NPV), o eletrodo de trabalho é mantido em um potencial inicial constante durante a maior parte do tempo, porém nos últimos 50 a 60 ms do período de tempo de cada degrau do sinal de excitação, um pulso de potencial mais elevado é aplicado. A corrente é medida durante os últimos 20 ms do período de tempo de cada degrau do sinal de excitação (Figura 11a). O potencial aplicado a cada degrau do sinal de excitação sucessivo é aumentado gradualmente para dar a varredura de voltagem necessária. A corrente medida no fim do degrau do sinal de excitação é devida essencialmente ao processo de Faraday e é proporcional a concentração do analito. O voltamograma resultante é semelhante a um polarograma DC (Figura 11b).⁶⁵

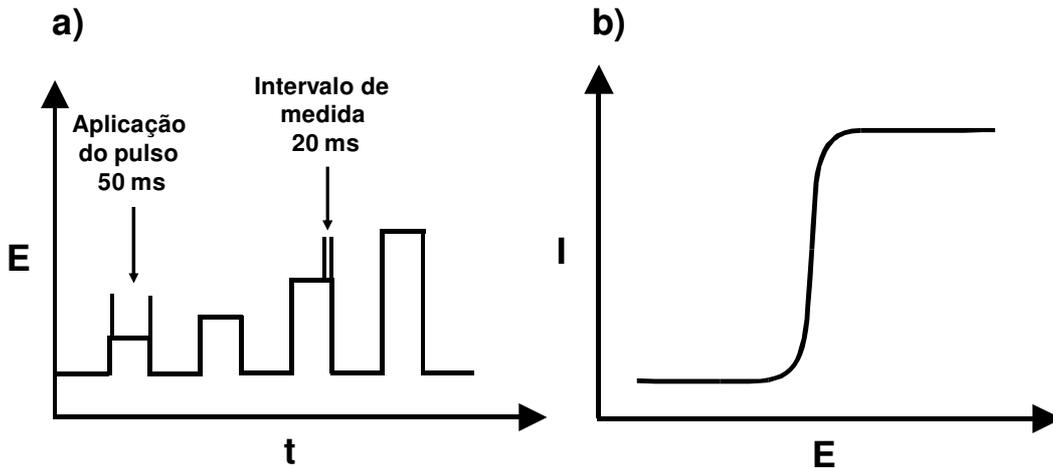


Figura 11. a) Sinal de excitação da voltametria de pulso normal; b) Voltamograma característico da NPV.

4.1.2.2 Voltametria de pulso diferencial

Na voltametria de pulso diferencial (DPV) uma série de pulsos de amplitude constantes (10-100 mV) são superpostos a rampa linear de potencial. O pulso é aplicado durante os últimos 50 ms do período de tempo de cada degrau do sinal de excitação, e como mostrado na Figura 12, são realizadas duas medidas de corrente, uma (em S_1) que é 16,7 ms antes do pulso e outra (em S_2) 16,7 ms antes do final do pulso. A diferença de corrente (Δi) por pulso é registrada em função do potencial aplicado. O resultado é uma curva diferencial (Figura 13), no qual consiste em um máximo cuja altura é diretamente proporcional à concentração do analito.^{57,60,65}

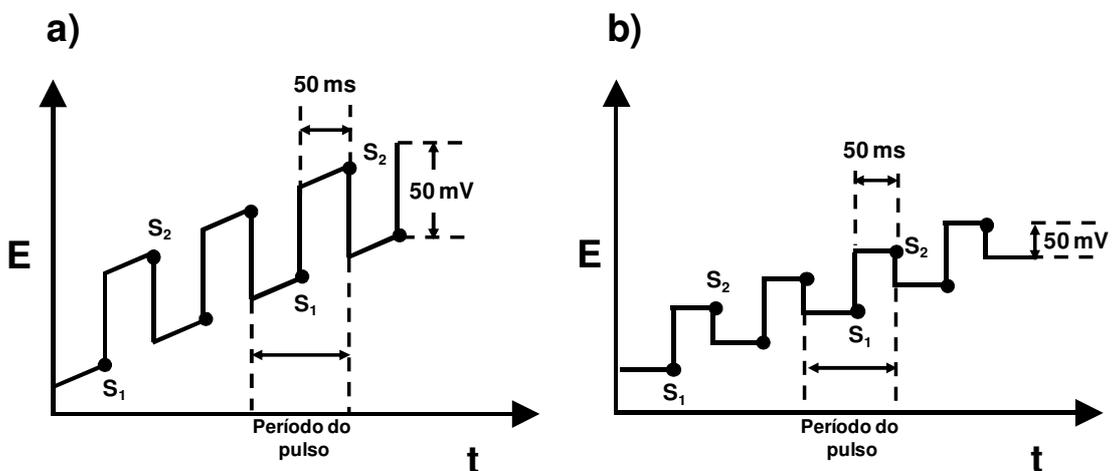


Figura 12. Sinal de excitação da voltametria de pulso diferencial. a) usado em equipamentos analógicos; b) usado em equipamentos digitais.

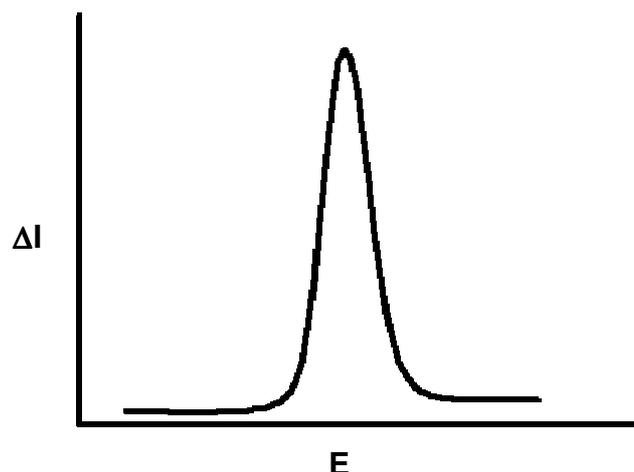


Figura 13. Voltamograma característico da DPV.

Com a utilização da técnica de DPV, os limites de detecção são duas ou três ordens de magnitude mais baixos do que os da polarografia clássica, chegando ao intervalo de 10^{-7} a 10^{-8} mol L⁻¹. Este aumento da sensibilidade se deve principalmente a uma redução da corrente capacitiva.

4.1.2.3 Voltametria de onda quadrada

A voltametria de onda quadrada (SWV) é um tipo de voltametria de pulso que tem como vantagem a grande velocidade e a alta sensibilidade, sendo possível obter um voltamograma completo em poucos segundos. Com o eletrodo de trabalho, a varredura é feita durante os últimos milissegundos do período de tempo de cada degrau do sinal de excitação. O sinal de excitação da SWV (Figura 14c) é obtido superpondo uma escada de potencial (Figura 14a) sobre a onda quadrada (Figura 14b). O comprimento de cada degrau e o período (τ) do pulso são idênticos e de aproximadamente 5 ms. A variação do potencial (ΔE_p) é geralmente de 10 mV. A magnitude do pulso $2E_{pa}$ é normalmente de 50 mV. A corrente (Δi) é a diferença entre a corrente observada no ponto 1 e a corrente no ponto 2, sendo Δi proporcional à concentração do analito. O voltamograma característico da SWV é mostrado na Figura 15. Como nas técnicas de pulso, o limite de detecção desta técnica é da ordem de 10^{-7} a 10^{-8} mol L⁻¹.^{57,60,65}

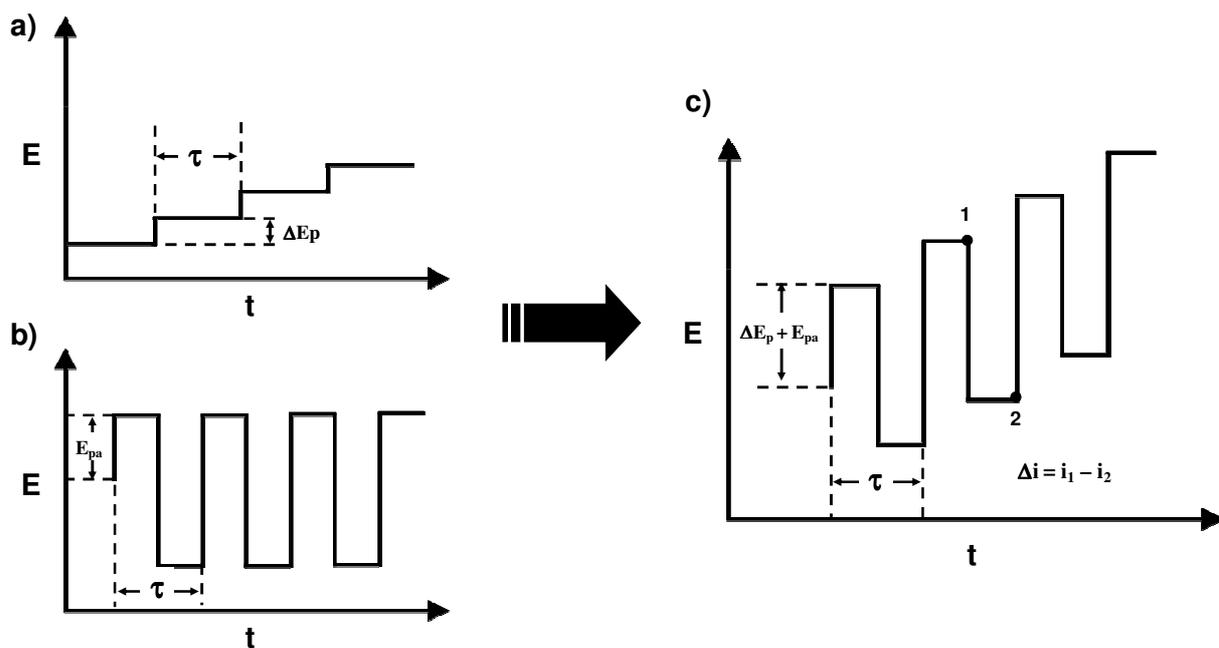


Figura 14. a) Escada de potencial; b) Onda quadrada c) Sinal de excitação da voltametria de onda quadrada.

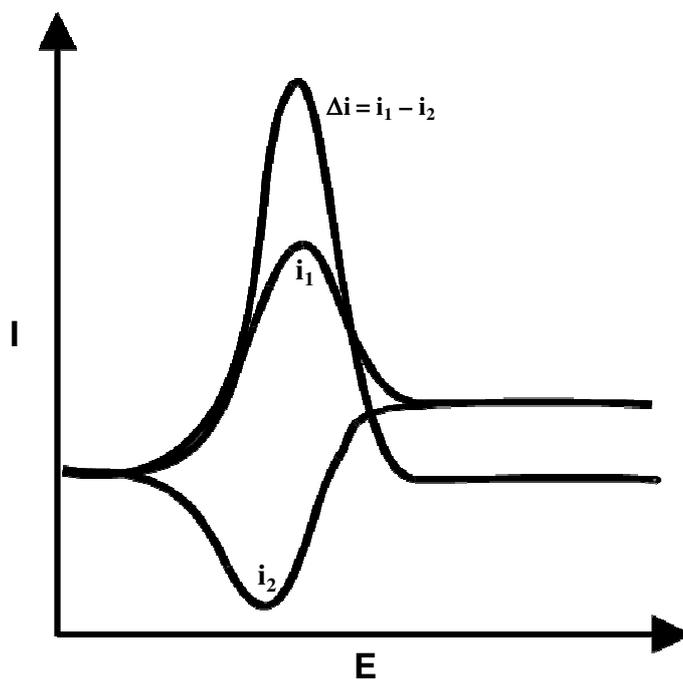


Figura 15. Voltamograma característico da SWV.

4.1.3 Voltametria de redissolução

As técnicas de redissolução se baseiam na deposição do analito em um eletrodo sob agitação. Depois de um tempo medido com precisão, a etapa de deposição é interrompida, cessa-se a agitação e o analito é determinado por meio de um dos métodos voltamétricos descritos anteriormente.

Na voltametria de redissolução anódica (ASV) o eletrodo de trabalho comporta-se como o cátodo durante a etapa de deposição e como ânodo durante a etapa de redissolução (oxidação do analito depositado na superfície do eletrodo). Na voltametria de redissolução catódica (CSV), o eletrodo comporta-se como o ânodo durante a etapa de deposição e como cátodo durante a etapa de redissolução. O eletrodo mais utilizado em métodos de redissolução é o eletrodo de mercúrio de gota pendente (HMDE).^{57,60}

A etapa de deposição corresponde a uma pré-concentração eletroquímica do analito e, devido a esta etapa, as técnicas de redissolução produzem limites de detecção muito mais baixos, da ordem de 10^{-9} mol L⁻¹, do que as demais técnicas voltamétricas.

A Figura 16 ilustra o sinal de excitação de potencial utilizado na técnica de ASV para a determinação do íon metálico (M^{2+}) em solução aquosa. Inicialmente é aplicado ao eletrodo de trabalho um potencial catódico constante (E_d), que provoca a redução do M^{2+} sob agitação. O eletrodo é mantido nesse potencial por um determinado tempo (t_d), para que uma quantidade significativa do metal se acumule no eletrodo. Em seguida, a agitação é interrompida por alguns segundos (tempo de equilíbrio), enquanto o eletrodo ainda é mantido no E_d . Após a etapa de deposição, o potencial é reduzido linearmente para valores menos negativos e a corrente da célula é registrada em função do potencial.^{57,60,65}

Normalmente apenas uma fração do analito é depositada durante a etapa de deposição, portanto, o resultado quantitativo depende do controle do potencial do eletrodo, do tempo de deposição e da velocidade de agitação da amostra. O voltamograma característico da ASV utilizando o pulso diferencial como forma de varredura é mostrado na Figura 17.

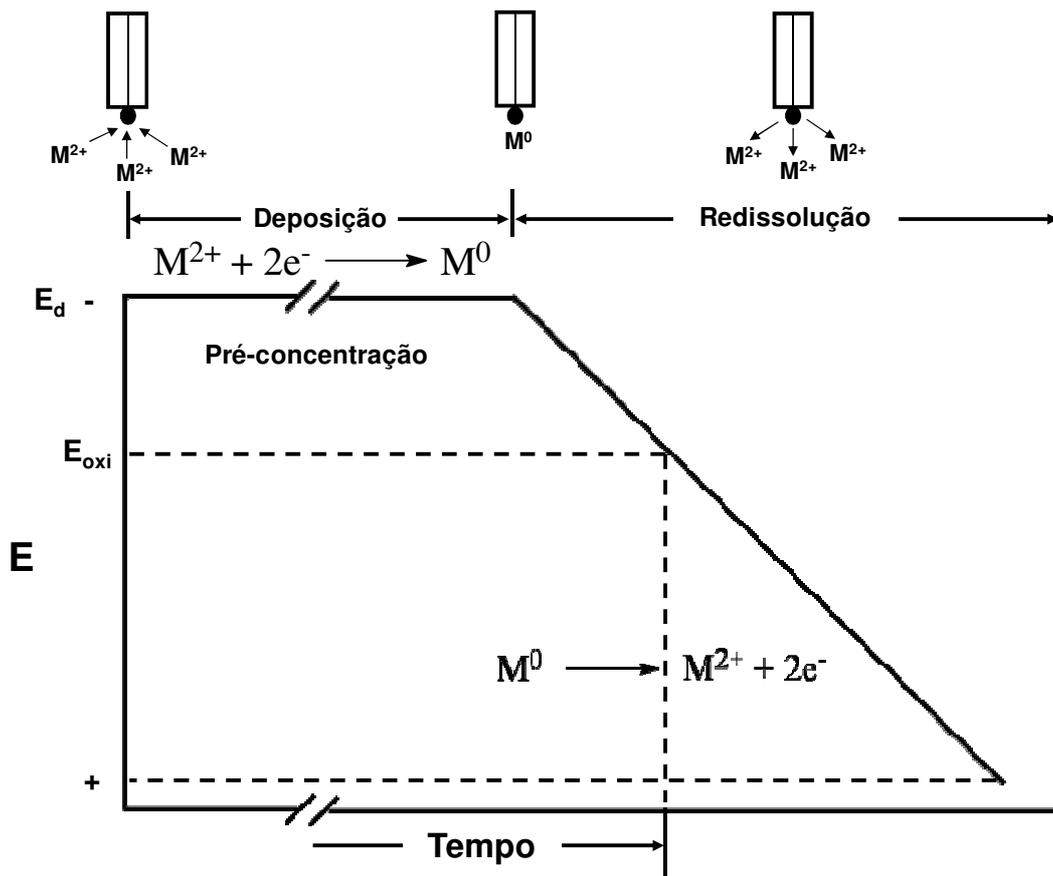


Figura 16. Sinal de excitação para a determinação do M^{2+} por redissolução anódica. E_d = potencial de deposição; E_{oxi} = potencial de oxidação do M^{2+} .

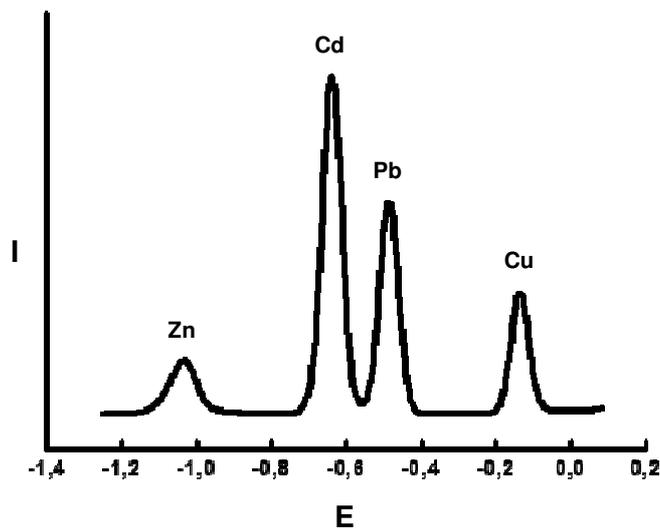


Figura 17. Voltamograma DPASV do zinco, cádmio, chumbo e do cobre.

4.1.4 Voltametria adsortiva de redissolução

As técnicas adsortivas de redissolução são similares às técnicas de redissolução anódica e catódica. A etapa de pré-concentração é feita por adsorção do analito na superfície do eletrodo sob agitação, sendo geralmente o HMDE o eletrodo utilizado. Em seguida, a agitação é interrompida e o analito adsorvido é determinado pelas técnicas voltamétricas de pulso ou de varredura linear. Esta técnica é aplicada em um número grande de moléculas orgânicas, que podem ser adsorvidas na superfície do eletrodo de mercúrio ou carbono. No caso de íons metálicos a pré-concentração é feita por meio de seus íons complexos. O limite de detecção pode chegar à ordem de 10^{-11} a 10^{-12} mol L⁻¹.

A Figura 18 ilustra o sinal de excitação de potencial utilizado na voltametria adsortiva de redissolução catódica (CAdSV) para a determinação do íon metálico (M^{n+}) em solução aquosa. Inicialmente o íon metálico é complexado por um agente ligante (L) e em seguida é aplicado ao eletrodo de trabalho um potencial constante (E_{ac}), que provoca a adsorção do ML_n sob agitação. O eletrodo é mantido nesse potencial por um determinado tempo (t_{ac}), para que uma quantidade significativa do complexo se adsorva no eletrodo. Após a etapa de adsorção, é realizada uma varredura na direção catódica e a corrente da célula é registrada em função do potencial. Para substâncias orgânicas o processo é análogo. O voltamograma característico da CAdSV utilizando o pulso diferencial como forma de varredura é mostrado na Figura 19.^{57,60,65}

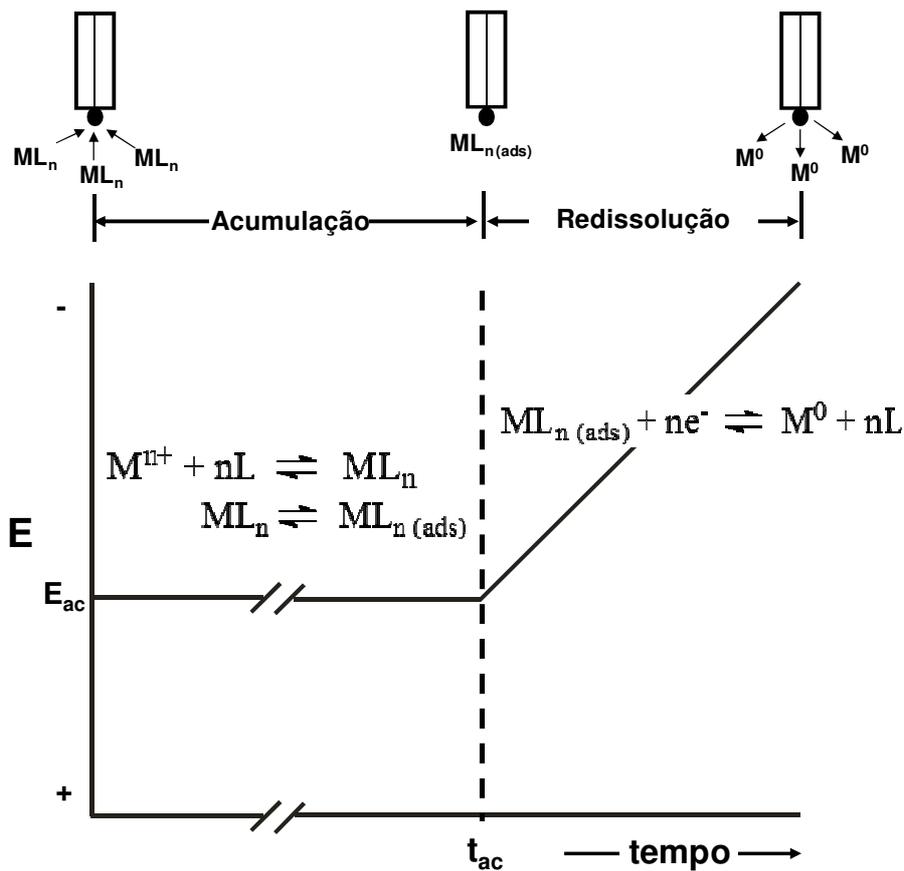


Figura 18. Sinal de excitação para a determinação do M^{n+} por voltametria adsortiva de redissolução catódica. E_{ac} = potencial de acumulação; t_{ac} = tempo de acumulação.

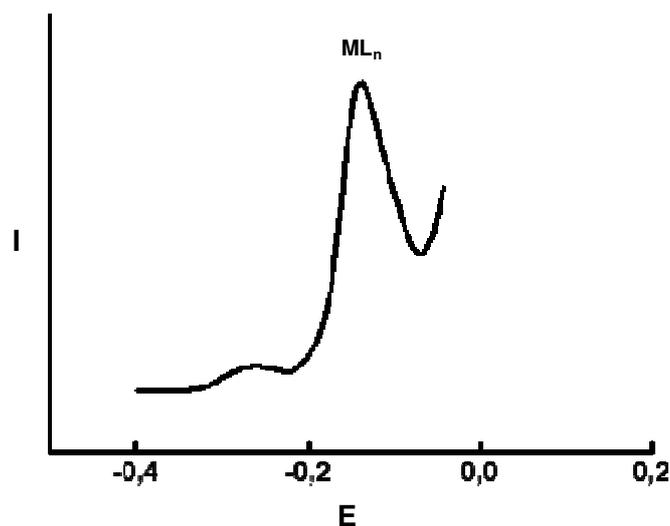


Figura 19. Voltamograma característico da DPCAdSV.

4.1.5 Voltametria cíclica

A voltametria cíclica (CV) utiliza ondas triangulares (Figura 20) como sinais de excitação para o eletrodo de trabalho. O primeiro sinal de excitação (Figura 20a), que é usado em equipamentos analógicos, é uma rampa de potencial linear. O segundo sinal de excitação (Figura 20b), que é usado em equipamentos digitais, é uma rampa de potencial na forma de escada. Após aplicar uma rampa de potencial entre os tempos t_0 e t_1 , a rampa é invertida para trazer o potencial de volta ao seu valor inicial no tempo t_2 . Os potenciais nos quais ocorre a reversão são chamados potenciais de inversão. O ciclo pode ser repetido diversas vezes.^{57,60}

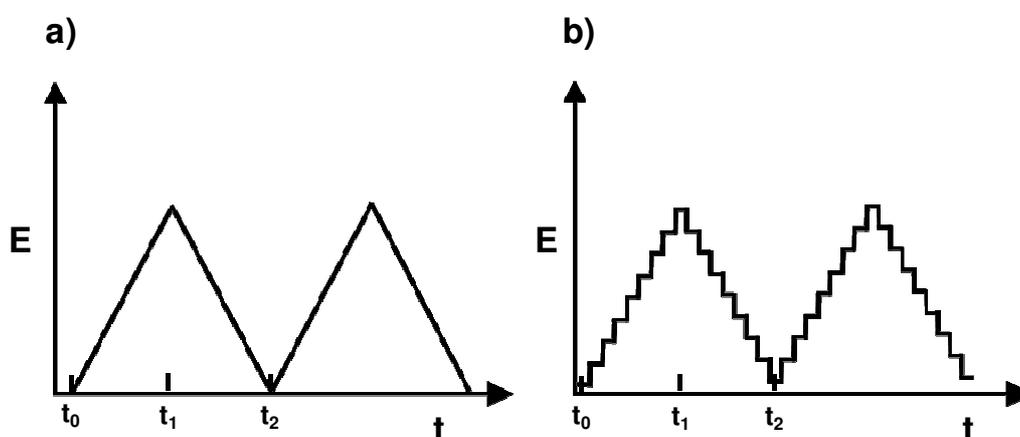


Figura 20. Sinal de excitação para a CV. a) usado em equipamentos analógicos; b) usado em equipamentos digitais.

A Figura 21 mostra o voltamograma característico da voltametria cíclica. O início da curva de potencial *versus* corrente, começando em t_0 , assemelha-se aos voltamogramas normais com uma onda catódica. Em seguida a corrente diminui à medida que o potencial aumenta, em função do aumento da camada de difusão, cujo limite externo torna-se cada vez mais distante da superfície do eletrodo. Após t_1 , o potencial é invertido, porém a corrente catódica continua a circular por que o potencial ainda é suficientemente negativo para a redução. Quando o potencial se torna suficientemente menos negativo, a espécie eletroativa anteriormente reduzida começa a ser oxidada, originando uma onda anódica. Após a oxidação da espécie eletroativa, a corrente anódica diminui para o seu valor inicial em t_2 .⁵⁷

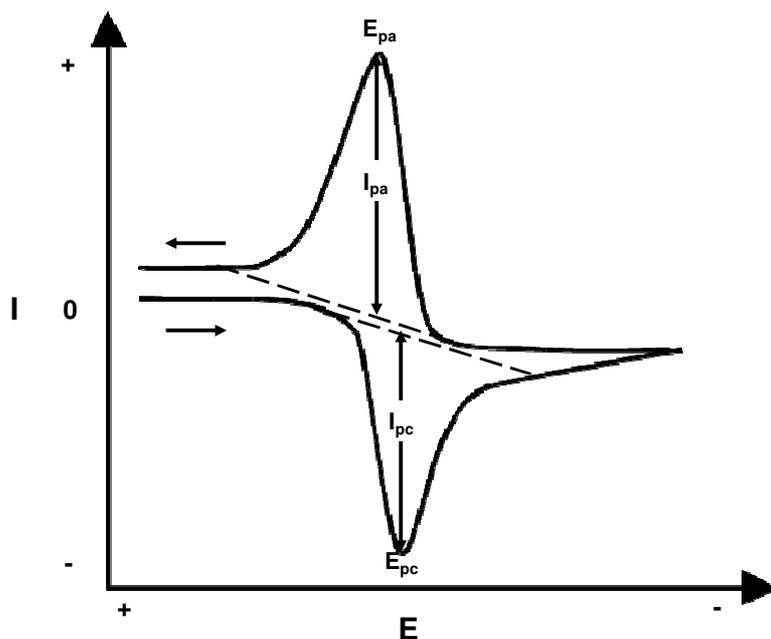
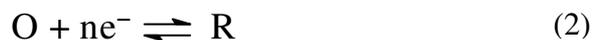


Figura 21. Voltamograma característico da voltametria cíclica.

Os parâmetros importantes em um voltamograma cíclico são: o potencial do pico catódico (E_{pc}); o potencial do pico anódico (E_{pa}); a corrente de pico catódico (I_{pc}); e a corrente de pico anódico (I_{pa}). A Figura 21 ilustra como esses parâmetros são estabelecidos.

A voltametria cíclica fornece essencialmente informações qualitativas extremamente importantes sobre as velocidades e os mecanismos de processos de oxidação/redução, sendo geralmente empregada no estudo de sistemas desconhecidos.

Os voltamogramas característicos para processos redox reversíveis (Equação 2), quasi-reversíveis e irreversíveis são mostrados na Figura 22a, 22b e 22c, respectivamente.



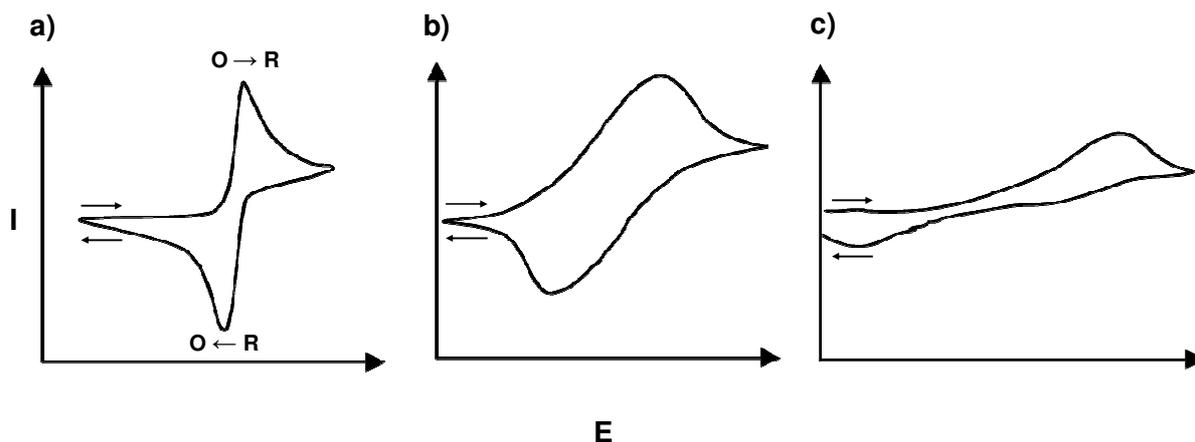


Figura 22. Voltamogramas característicos para processos redox:
a) reversíveis; b) quasi - reversíveis; c) irreversíveis.

Para processos reversíveis de eletrodo:

- O potencial de redução formal é calculado pela seguinte equação.

$$E^{0'} = \frac{E_{pa} + E_{pc}}{2} \quad (3)$$

- As correntes de picos catódicos e anódicos são aproximadamente iguais em valor absoluto, porém de sinais opostos (Equação 4).

$$\frac{i_{pa}}{i_{pc}} = 1 \quad (4)$$

- A diferença entre os potenciais de pico é:

$$\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} \cong \frac{0,059}{n} \quad (5)$$

onde n é o número de elétrons envolvidos na semi-reação.⁶⁶⁻⁶⁷

5. Identificação e quantificação de metabólitos secundários por técnicas voltamétricas

A possibilidade do uso de técnicas voltamétricas no estudo da capacidade antioxidante e na identificação e quantificação de polifenóis em diferentes matrizes se deve a eletroatividade desses compostos, ou seja, a facilidade com que eles

sofrem reações de oxidação (atuam como agentes redutores) ou redução (atuam como agentes oxidantes) em eletrodos inertes.

A voltametria cíclica, em eletrodos de carbono (normais e modificados), mostrou-se uma excelente ferramenta analítica para caracterizar as propriedades oxidantes de alguns flavonóides (catequina, epicatequina, rutina, arbutina, florizidina, quercetina, morina) e ácidos fenólicos (ácidos ferúlico, sinapínico, caféico, cloragênico, cumárico, vanílico, gálico, tânico) em suco de laranja, chá, café e vinho. Esta caracterização se baseia na medida da capacidade desses compostos de doarem elétrons (sofrerem oxidação) em potenciais próximos aos do pico anódico.⁶⁸⁻⁷³ Mannino e colaboradores⁷⁴ estabeleceram uma relação interessante entre o comportamento eletroquímico e o “poder anti-oxidante”, onde “baixo potencial de oxidação” significa “alto poder anti-oxidante”.

Métodos voltamétricos, baseados na oxidação de flavonóides e ácidos fenólicos no eletrodo de carbono, têm sido empregados para a identificação e quantificação destes compostos em diferentes amostras. O eletrodo de GC foi empregado na análise de flavonóides e ácidos fenólicos, utilizando a DPV, com limites de detecção da ordem de 10^{-6} mol L⁻¹.⁶⁹ Escarpa e colaboradores⁵³ desenvolveram um método amperométrico de análise em fluxo, empregando o eletrodo de GC e a genisteína como padrão, para a determinação de isoflavonas totais em suplemento alimentar e extrato à base de soja. A reação de oxidação da genisteína é mostrada na Figura 23. O eletrodo de pasta de carbono foi usado, por Klejdus e colaboradores⁵⁴ na determinação isoflavonas em amostras de alimentos a base de soja utilizando a HPLC com detecção eletroquímica.

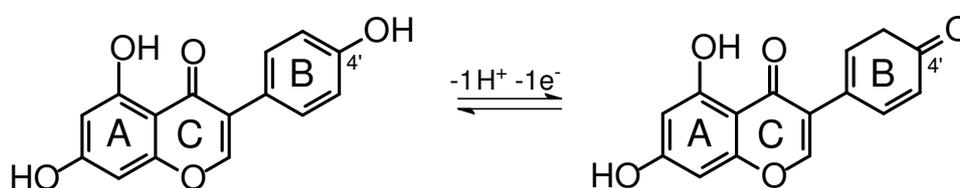


Figura 23. Reação de oxidação da genisteína.

Muitos estudos eletroquímicos envolvendo flavonóides baseiam-se na reação de oxidação da hidroxila fenólica, no entanto, muitos flavonóides podem

sofrer redução via carbonila no anel γ -pirona.⁷⁵⁻⁷⁶ Zhang e colaboradores⁵⁵ no estudo do comportamento eletroquímico da genisteína em meio ácido no HMDE, utilizando a CV, observaram um sinal em -1,168 V vs SCE correspondente ao processo de redução adsorptivo irreversível envolvendo dois elétrons e um próton. O mecanismo proposto pelos autores para a redução da genisteína no HMDE é mostrado na Figura 24. A corrente de redução foi proporcional a concentração de genisteína no intervalo $2,0 \times 10^{-7} - 5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em pH 1,0, com limite de detecção de $8,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$. O método desenvolvido foi aplicado na determinação de genisteína em amostras comerciais de soja.

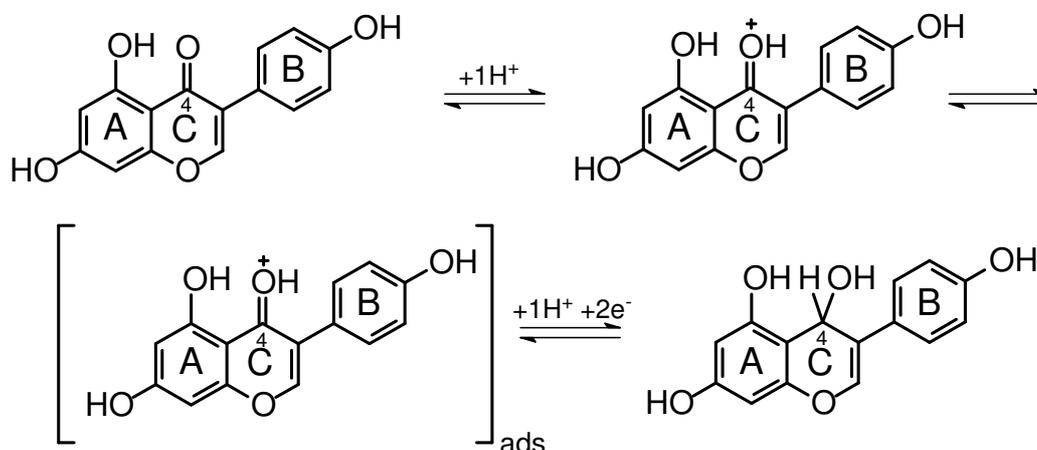


Figura 24. Mecanismo proposto para a redução da genisteína no HMDE.

Fogliatto e colaboradores⁵⁶ propuseram um método baseado na redução eletroquímica para a determinação de genisteína em farinha e suplementos à base de soja, por SWV utilizando o HMDE. Os melhores resultados foram obtidos usando como eletrólito suporte o tampão fosfato-metanol (8:2, v/v) em pH 7,5 com $2,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ do surfactante catiônico brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB). A corrente de redução foi proporcional à concentração de genisteína no intervalo $1,1 \times 10^{-7} - 1,1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, com limite de detecção e quantificação de $3,4 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,1 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. Os resultados obtidos pelo método desenvolvido foram comparados com os obtidos pela HPLC.

A determinação de genisteína pode ser afetada pela presença de outras isoflavonas como a daidzeína, daidzina e genistina, que são encontradas em

grandes quantidades em amostras de soja. Portanto, no mesmo trabalho Fogliatto e colaboradores⁵⁶ avaliaram o perfil voltamétrico da genisteína (Figura 25) na presença dessas isoflavonas. A redução da daidzeína ($E_{pc} = -1,450$ V vs Ag/AgCl) (Figura 25a) não afetou o pico de redução da genisteína ($E_{pc} = -1,560$ V vs Ag/AgCl), pois apresentou um intervalo de potencial de 110 mV entre as duas isoflavonas agliconas. No entanto, a redução das isoflavonas glicosiladas, genistina ($E_{pc1} = -1,450$ V vs Ag/AgCl e $E_{pc2} = -1,490$ V vs Ag/AgCl) (Figura 25b) e daidzina ($E_{pc} = -1,410$ V vs Ag/AgCl) (Figura 25c) provocaram um deslocamento no potencial de pico da genisteína ($E_{pc} = -1,590$ V vs Ag/AgCl); porém, este comportamento não prejudicou a quantificação do analito de interesse, pois as isoflavonas estudadas apresentaram um intervalo de potencial superior ou igual a 100 mV entre elas. O uso do surfactante CTAB promoveu a separação dos picos de redução da genisteína em relação às outras isoflavonas estudadas, tornando-se o método voltamétrico desenvolvido seletivo o suficiente para a determinação de genisteína, sem processos de separação, em amostras de soja.

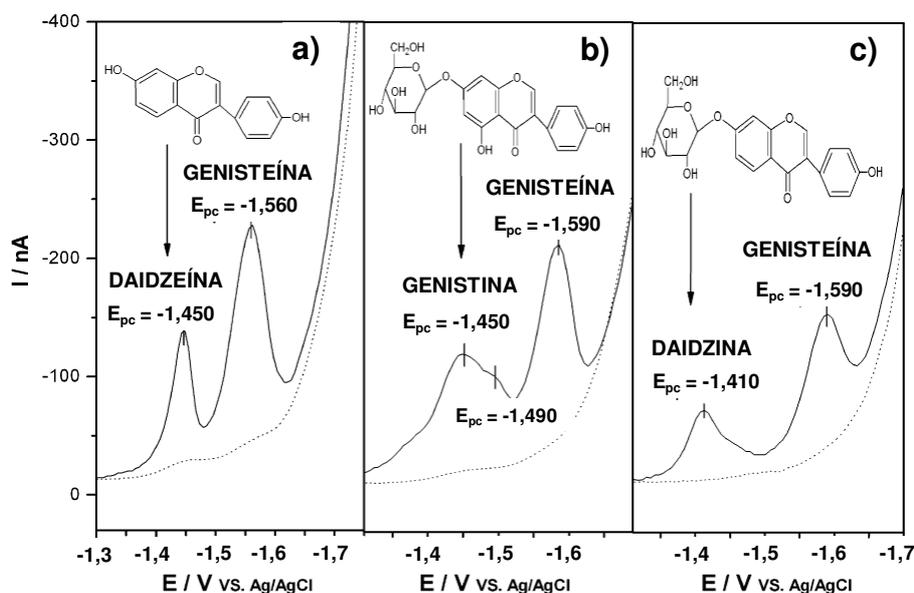


Figura 25. Voltamogramas de onda quadrada das isoflavonas daidzeína, genistina e daidzina na presença de $4,5 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ de genisteína em tampão fosfato-metanol (8:2, v/v, pH 7,5) + $2,2 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ do surfactante CTAB: a) $4,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ de daidzeína; b) $3,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de genistina; e c) $6,5 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de daidzina. $E_{ac} = 0$ V, $t_{ac} = 60$ s, $E_i = -1,100$ V; $E_f = -1,800$ V, frequência = 100 Hz, Eletrodo de trabalho: HMDE, Eletrodo de referência: Ag/AgCl (KCl 3 mol L⁻¹) [Retirado de Fogliatto, D.K; Barbosa, A. M. J.; Ferreira, V. S. *Colloids Surf., B* 2010, 78, 243.]

Técnicas voltamétricas adsorptivas de redissolução têm sido aplicadas, na grande maioria dos trabalhos publicados, na determinação de flavonóides (rutina, naringina, fisetina, galangina, morina, quercetina, ramelina, hesperidina, hesperitina e diosmina) (na forma livre e complexados com íons metálicos: Cu^{2+} e Hg^{2+}), em suco, chá, formulações farmacêuticas e fluídos biológicos (plasma, urina e sangue), empregando eletrodos de carbono ou HMDE.⁷⁷⁻⁸⁰

Ensafi⁸¹ e Temerk⁸² e seus colaboradores empregaram a CAdSV na determinação de rutina em chá e fluídos biológicos, respectivamente. O método envolveu basicamente duas etapas: na primeira ocorre adsorção ou acumulação do complexo formado pela molécula orgânica (rutina) com o metal (Cu^{2+}), sobre a superfície do HMDE, por um tempo determinado; e na segunda etapa, empregando a técnica de DPV ou SWV, ocorre a redução do complexo Cu^{2+} -rutina (estequiometria: 1:3; $\beta = 3,9 \times 10^{20}$).⁸¹ Os autores estudaram os efeitos de vários parâmetros como pH, concentração de Cu^{2+} , potencial de acumulação, tempo de acumulação e velocidade de varredura na corrente do complexo Cu^{2+} -rutina. Foram obtidos, utilizando a CAdSV, limites de detecção da ordem de 10^{-9} mol L⁻¹.

Mendes e colaboradores⁸³ construíram eletrodos compósitos à base de poliuretana (PU), derivada do óleo de mamona, e grafite (GPU). Neste trabalho pioneiro, estudos envolvendo a voltametria cíclica foram realizados para avaliar a resposta voltamétrica dos eletrodos compósitos em diferentes proporções de grafite e poliuretana (30–70% grafite, m/m) e comparados com o eletrodo de GC (Figura 26). A melhor resposta voltamétrica foi obtida com a proporção 60–70 % grafite. Além da composição, os eletrodos compósitos foram avaliados quanto à reprodutibilidade de superfície, ao intervalo útil de potenciais e ao seu desempenho frente à hidroquinona, ao catecol, ao cádmio (II) e à detecção amperométrica em fluxo. Os resultados, comparados com o desempenho do eletrodo de GC, demonstram vantagens para os eletrodos compósitos, principalmente em relação à atividade da superfície. O eletrodo compósito GPU foi utilizado na determinação de diferentes compostos orgânicos, em diferentes matrizes, utilizando-se as técnicas SWV e DPV: hidroquinona em fluído cerebrospinal sintético⁸⁴ e reveladores fotográficos⁸⁵; imipramina,⁸⁶ paracetamol,⁸⁷ furosemida⁸⁸ e verapamil⁸⁹ em formulações farmacêuticas; e ácido indol-3-acético⁹⁰ em amostras de solo.

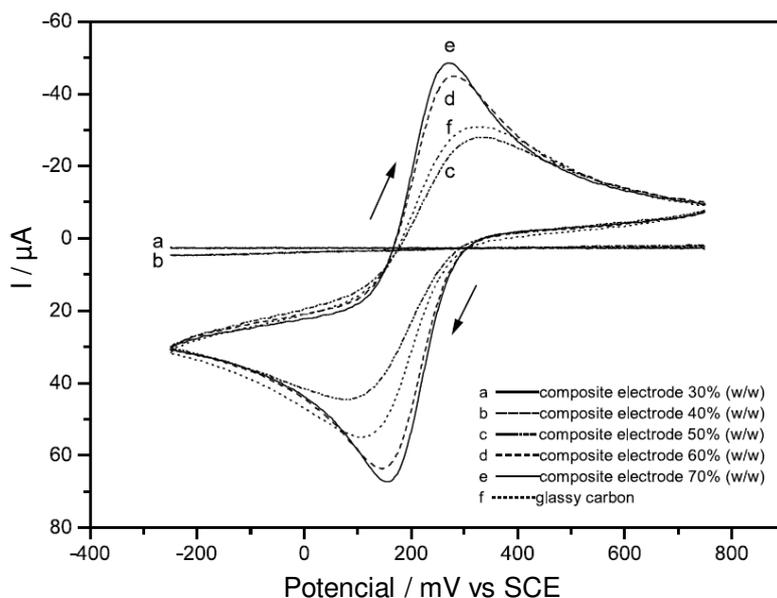


Figura 26. Voltamogramas cíclicos para eletrodos compósitos: a) 30; b) 40; c) 50; d) 60; e) 70% (grafite, m/m); e (f) GC em $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{ K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ em solução de $\text{KCl } 0,500 \text{ mol L}^{-1}$. $E_i = -0,250 \text{ V}$, $E_w = 0,750 \text{ V}$, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$, Eletrodo de referência: calomelano saturado. [Retirado de Mendes, R. K.; Claro-Neto, S.; Cavalheiro, E. T. G. *Talanta* **2002, 57, 909.]**

O eletrodo compósito GPU foi utilizado por Malagutti e colaboradores⁹¹ na determinação de rutina em chá verde por SWV. Neste trabalho foi realizado um estudo comparativo do comportamento eletroquímico, do eletrodo compósito GPU com o eletrodo de GC, utilizando a voltametria cíclica em solução de rutina. A Figura 27 mostra a reação de oxidação da rutina. Os resultados mostraram uma resposta mais sensível ao utilizar o eletrodo compósito GPU. Foi obtida uma curva analítica para a rutina, com faixa linear entre $1,1 \times 10^{-6}$ e $3,1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e limite de detecção de $7,1 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$. Os resultados obtidos para a determinação de rutina em chá verde utilizando o eletrodo compósito GPU foram coincidentes com os resultados obtidos por HPLC. O bom desempenho do eletrodo compósito GPU, na determinação de rutina, possibilita sua utilização na detecção e quantificação de metabólitos secundários em amostras de soja.

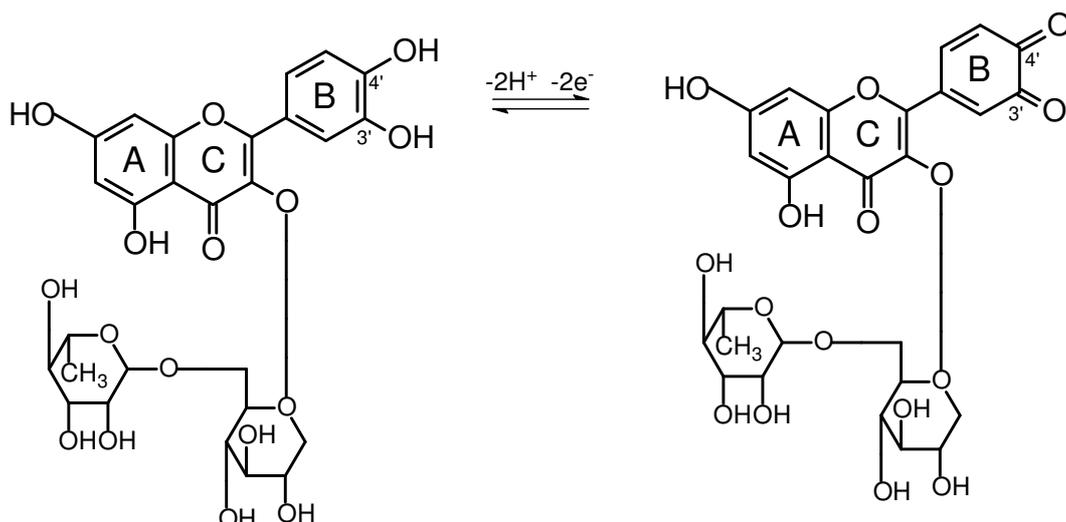


Figura 27. Reação de oxidação da rutina.

6. Preparação de amostras de soja para a identificação e quantificação de metabólitos secundários

Um método analítico envolve principalmente as seguintes etapas: amostragem, preservação de amostras, preparação de amostras e análise. A preparação de amostras pode constituir também de várias etapas, como por exemplo, secagem, homogeneização, peneiramento, extração do analito, pré-concentração, hidrólise e derivatização.⁹²

A hidrólise (Figura 28) consiste em converter as isoflavonas glicosiladas em suas formas agliconas. Este procedimento é comum em determinações de isoflavonas, em amostras e derivados de soja, por HPLC; pois, alguns padrões de isoflavonas (6''-O-malonil-daidzina, 6''-O-malonil-genistina, 6''-O-malonil-glicitina, 6''-O-acetil-daidzina, 6''-O-acetil-genistina e 6''-O-acetil-glicitina) são mais difíceis de serem obtidos. A hidrólise básica quebra as ligações do éster, removendo os grupos ácidos que estão ligados à parte glicosídica da isoflavona; enquanto que, a hidrólise ácida quebra a ligação entre a isoflavona e a parte glicosídica convertendo todas as isoflavonas em suas formas agliconas.⁹³

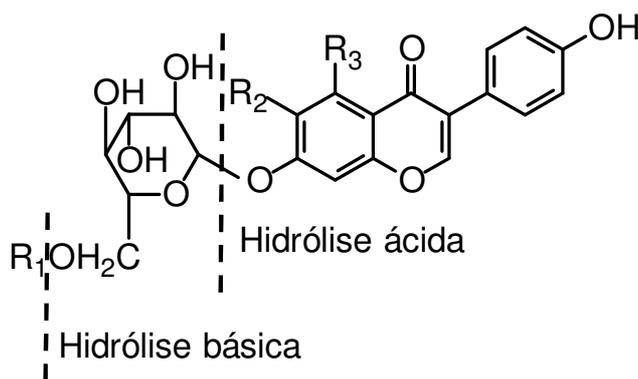


Figura 28. Esquema das hidrólises básica e ácida das isoflavonas.

A Tabela 2 apresenta um resumo dos estudos que envolveram a preparação de amostras de soja para a determinação de isoflavonas utilizando a HPLC.

Tabela 2. Preparação de amostras de soja para a determinação de isoflavonas utilizando a HPLC

Amostra	Método de extração	Ref.
Derivados de soja	Metanol 80% (40 °C) Hidrólise ácida (HCl 2 mol L ⁻¹) Agitação mecânica e em ultrassom	42-43
Grãos e derivados de soja	Metanol 80% Hidrólise básica (NaOH 2 mol L ⁻¹) (25 °C)	52
Grãos de soja	Desengorduramento com n-hexano Metanol 80% (25 °C)	19
Farinha de soja Kinako (grãos torrados moídos)	Etanol 70 % (25 °C) 1 hora sob agitação mecânica	44
Grãos de soja	Metanol 80 %	25
Grãos de soja	Etanol 50% (60 °C) 20 min no ultrassom	45
Grãos de soja	Etanol 70%	46
Derivados de soja	Etanol 80% contendo HCl 1 mol L ⁻¹ (Hidrólise ácida)	47

Tabela 2. Preparação de amostras de soja para a determinação de isoflavonas utilizando a HPLC (continuação)

Amostra	Método de extração	Ref.
Folhas de soja	Etanol 40% 18 horas sob agitação mecânica	12
Extrato seco de soja	Hidrólise ácida (HCl 3 mol L ⁻¹ solução etanólica) 5 minutos no ultrassom seguido de 40 minutos em banho a vapor	48
Grãos de soja	Desengorduramento com n-hexano Etanol 70% (25 °C)	49
Cotilédone de soja	Etanol 96% (80 °C) Extração em fase sólida Hidrólise ácida (HCl 2,5 mol L ⁻¹) (85 °C) Extração líquido-líquido	50
Grãos de soja	50 minutos de hidrólise ácida (HCl 1 mol L ⁻¹) por microondas (100 °C)	51

II – OBJETIVOS DO TRABALHO

Este trabalho teve como objetivo principal desenvolver e validar métodos voltamétricos de análise sensíveis, seletivos e rápidos para a determinação de metabólitos secundários em amostras de soja.

Para o desenvolvimento e validação destes métodos voltamétricos, foram propostos os seguintes objetivos específicos:

1) Preparação das amostras de soja

- Otimizar os processos de extração dos metabólitos secundários.

2) Avaliação da aplicabilidade do HMDE e de eletrodos sólidos para a detecção e quantificação de metabólitos secundários em amostras de soja por técnicas voltamétricas

- Realizar testes para avaliar o perfil voltamétrico dos metabólitos secundários com o HMDE e diferentes eletrodos sólidos (ouro, platina, carbono vítreo e grafite), verificando assim a possibilidade de aplicação desses eletrodos nos estudos voltamétricos, como também no desenvolvimento de método analítico.

3) Otimização dos parâmetros e condições experimentais para a detecção e quantificação de metabólitos secundários em amostras de soja por técnicas voltamétricas (Estudos Qualitativos)

- Selecionar os metabólitos secundários alvos dos estudos voltamétricos.
- Selecionar o eletrodo de trabalho, por meio de testes com o HMDE e com eletrodos sólidos (ouro, platina, carbono vítreo e grafite).
- Estudar o processo de oxidação/redução dos metabólitos secundários por CV.
- Selecionar o eletrólito suporte que oferece melhor seletividade e sensibilidade para as determinações voltamétricas.

- Selecionar o valor de pH mais adequado para os estudos qualitativos e quantitativos dos metabólitos secundários selecionados.
- Selecionar as técnicas voltamétricas (ASV, AdSV, DPV e SWV) mais adequadas para a determinação dos metabólitos secundários selecionados.
- Otimizar os parâmetros voltamétricos de análise: tempo e potencial de deposição, potenciais inicial e final, velocidade de varredura, tempo de vida e área da gota de Hg, amplitude do pulso, potencial de inversão, tempo de equilíbrio, tempo de borbulhamento de nitrogênio.
- Otimizar os parâmetros quantitativos de análise: concentração e volume do eletrólito suporte, concentração e volume dos padrões de metabólitos secundários selecionados, volume das amostras.

4) Obtenção das figuras analíticas de mérito (Estudos Quantitativos)

- Obter as figuras analíticas de mérito para os métodos voltamétricos desenvolvidos: linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, seletividade, recuperação e intervalo de aplicação.

5) Aplicação dos métodos voltamétricos desenvolvidos na análise de amostras de soja

- Determinar os metabólitos secundários presentes em amostras de soja.

III – EXPERIMENTAL

1. MATERIAL

1.1 Reagentes

Os reagentes utilizados nos experimentos são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3. Reagentes

Reagentes	Fonte
Acetona ((CH ₃) ₂ CO)	Sigma-Aldrich
Acetonitrila (CH ₃ CN)	Sigma-Aldrich
Ácido acético PA (CH ₃ COOH)	Sigma-Aldrich
Ácido bórico PA (H ₃ BO ₃)	Sigma-Aldrich
Ácido clorídrico (HCl)	Sigma-Aldrich
Ácido fosfórico PA (H ₃ PO ₄)	Sigma-Aldrich
Ácido nítrico PA (HNO ₃)	Quimex
Alumina 1,0 µm (Al ₂ O ₃)	Sigma-Aldrich
Etanol PA (CH ₃ CH ₂ OH)	Sigma-Aldrich
Fosfato de potássio monobásico PA (KH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich
Fosfato de sódio dibásico PA (Na ₂ HPO ₄)	Sigma-Aldrich
Fosfato de sódio PA (Na ₃ PO ₄)	Merck
Hidróxido de Sódio PA (NaOH)	Sigma-Aldrich
Metanol PA (CH ₃ OH)	Sigma-Aldrich
Padrão de daidzeína grau HPLC	L.C. Laborotaries
Padrão de daidzina grau HPLC	L.C. Laborotaries
Padrão de genisteína grau HPLC	L.C. Laborotaries
Padrão de genistina grau HPLC	L.C. Laborotaries
Padrão de gliciteína grau HPLC	L.C. Laborotaries
Padrão de glicitina grau HPLC	L.C. Laborotaries
Rutina hidratada grau HPLC	Sigma-Aldrich
Solução padrão de cobre 1000 ppm	Merck

1.2 Soluções

1. Solução padrão de Cu^{2+} $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$
2. Solução padrão de Cu^{2+} $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$
3. Solução padrão de daidzeína $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (etanol)
2,6 mg / 10 mL
4. Solução padrão de daidzina $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (etanol)
4,2 mg / 10 mL
5. Solução padrão de genisteína $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (1:1 etanol:água)
2,7 mg / 10 mL
6. Solução padrão de genistina $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (etanol)
4,3 mg / 10 mL
7. Solução padrão de gliciteína $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (etanol)
2,9 mg / 10 mL
8. Solução padrão de glicitina $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (etanol)
4,5 mg / 10 mL
9. Solução padrão de rutina $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (1:1 etanol:água)
6,1 mg / 10 mL
10. Solução de HNO_3 20% (v/v)
11. Solução de HCl $0,100 \text{ mol L}^{-1}$
12. Solução de NaOH $0,100 \text{ mol L}^{-1}$
13. Tampão Britton-Robinson pH 3,0–12,0
Solução de H_3PO_4 $0,040 \text{ mol L}^{-1}$
Solução de H_3BO_3 $0,040 \text{ mol L}^{-1}$
Solução de CH_3COOH 2 mol L^{-1}
Solução de NaOH $0,040 \text{ mol L}^{-1}$ (até que se atinja o pH desejado)
14. Tampão fosfato pH 3,0
0,270 mL H_3PO_4 + 5,440g KH_2PO_4 / 200 mL
15. Tampão fosfato pH 4,0
5,440 g KH_2PO_4 / 200 mL
16. Tampão fosfato pH 5,0
5,168 g KH_2PO_4 + 0,085 g Na_2HPO_4 / 200 mL

17. Tampão fosfato pH 6,0
3,680 g KH_2PO_4 + 0,805 g Na_2HPO_4 / 200 mL
18. Tampão fosfato pH 7,0
0,942 g KH_2PO_4 + 1,570 g Na_2HPO_4 / 200 mL
19. Tampão fosfato pH 8,0
0,122 g KH_2PO_4 + 1,860 g Na_2HPO_4 / 200 mL
20. Tampão fosfato pH 9,0
1,894 g Na_2HPO_4 / 200 mL
21. Tampão fosfato pH 10,0
1,784 g Na_2HPO_4 + 0,150 Na_3PO_4 / 200 mL
22. Tampão fosfato pH 11,0
1,633 g Na_2HPO_4 + 0,347 Na_3PO_4 / 200 mL
23. Tampão fosfato pH 12,0
2,531 g Na_3PO_4 / 200 mL
24. Amostra preparada* 1 (isoflavonas totais = $5,0 \times 10^{-4}$ mol L^{-1})
16,67% genistina
16,67% daidzina
16,67% glicitina
16,67% genisteína
16,67% daidzeína
16,67% gliciteína
25. Amostra preparada* 2 (isoflavonas totais = $5,0 \times 10^{-4}$ mol L^{-1})
51,14% genistina
29,84% daidzina
13,52% glicitina
3,14% genisteína
2,36% daidzeína
26. Amostra preparada* 3 (isoflavonas totais = $5,0 \times 10^{-4}$ mol L^{-1})
51,14% genisteína
29,84% daidzeína
13,52% glicitina
3,14% genistina
2,36% daidzina

- 27 Amostra preparada* 4 (isoflavonas totais = $5,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹)
54,28% genisteína
32,20% daidzeína
13,52% gliciteína

* As amostras foram preparadas por diluição das soluções estoque de isoflavonas.

1.3 Amostras de soja

Os métodos desenvolvidos foram aplicados na determinação de isoflavonas totais em comprimidos à base de extrato de soja, adquiridos em drogaria do Distrito Federal. Estes comprimidos são utilizados na redução dos sintomas decorrentes do climatério e serviram de base para os estudos com grãos e folhas de soja quanto à concentração de isoflavonas totais.

Foram analisados também os grãos e as folhas de soja, em dois estádios de crescimento (vegetativo 6 e reprodutivo 7), dos genótipos: P98R6 (Pioneer Sementes, Brasil) e BRQ 96-3065, coletados na região Centro-Oeste do Brasil (15°56'20.06"S latitude, 47°34'54.14"O longitude) (quanto à concentração de rutina); IAC-100 e Dowling (Embrapa Hortaliças, Brasil), produzidos em casa de vegetação (temperatura (T) = 27 ± 2 °C, umidade relativa (UR) = 70%) (quanto à concentração de rutina); e Flora (Embrapa Cerrados, Brasil), produzido em casa de vegetação (temperatura (T) = 25 ± 2 °C, umidade relativa (UR) = 80%) (quanto à concentração de isoflavonas totais).

1.4 Vidraria

Lavagem:

O procedimento adotado para a lavagem de toda a vidraria utilizada nos experimentos é descrito abaixo:

- ✓ Lavou-se com água de torneira;
- ✓ Lavou-se com água destilada;
- ✓ Imergiu-se em cuba contendo solução de HNO₃ 20% por 24 horas;
- ✓ Imergiu-se em cuba contendo água ultrapura (18,2 MΩ cm) por 24 horas;
- ✓ Secou-se à temperatura ambiente, protegendo-as contra poeira e outros agentes de contaminação.

1.5 Aparelhagem utilizada na preparação das amostras e das soluções

- ✓ Balança Analítica AW 120 (Shimadzu);
- ✓ Banho-maria tipo dubnoff TE-053 (Tecnal);
- ✓ Centrífuga MiniSpin (Eppendorf);
- ✓ Cuba de ultrassom 2840 DA (Odontobrás);
- ✓ Eletrodo Combinado de pH DME-CV1 (Digimed);
- ✓ Estufa de secagem com circulação de ar 320 SE (Fanem);
- ✓ Mesa agitadora pendular TE-240 (Tecnal);
- ✓ pHmetro 3030 (Jenway).

1.6 Aparelhagem utilizada nos experimentos voltamétricos

- ✓ Analisador voltamétrico 797 VA Computrace (Metrohm) (Figura 29);
- ✓ Uma célula eletroquímica composta pelos eletrodos:
Eletrodos de Trabalho: HMDE e Eletrodos rotatórios de disco (Metrohm) (ouro ($\Phi = 2,0$ mm), platina ($\Phi = 2,0$ mm), carbono vítreo (GC) ($\Phi = 2,0$ mm) e grafite ($\Phi = 2,0$ mm));
Eletrodo de Referência: Ag/AgCl (KCl 3 mol L⁻¹) (Metrohm);
Eletrodo Auxiliar: Eletrodo de platina (Metrohm).



Figura 29. Analisador voltamétrico 797 VA Computrace (Metrohm). [Retirado de <http://www.metrohm.com.br>]

2. METODOLOGIA

2.1 Eletrodos

Lavagem:

Os eletrodos, após cada análise voltamétrica, foram lavados com água ultrapura (18,2 MΩ cm).

Tratamento mecânico e eletroquímico do eletrodo de trabalho:

Antes de iniciar as medidas voltamétricas, o eletrodo rotatório de disco foi polido em suspensão aquosa de alumina e limpo com acetona, utilizando ultrassom, durante 5 minutos. Entre cada medida voltamétrica, o eletrodo foi limpo eletroquimicamente por cinco ciclos entre 0 e 1,8 V.

2.2 Avaliação da aplicabilidade do HMDE e de eletrodos sólidos para a detecção e quantificação de metabólitos secundários em amostras de soja por técnicas voltamétricas

Foram realizados testes para avaliar o perfil voltamétrico dos metabólitos secundários com o HMDE e diferentes eletrodos sólidos (ouro, platina, carbono vítreo e grafite), utilizando-se a DPV e a DPCAdSV, verificando assim, a possibilidade de aplicação desses eletrodos nos estudos voltamétricos, bem como no desenvolvimento de método analítico. Foram adotados dois procedimentos distintos, conforme o eletrodo utilizado (Figuras 30 e 31).

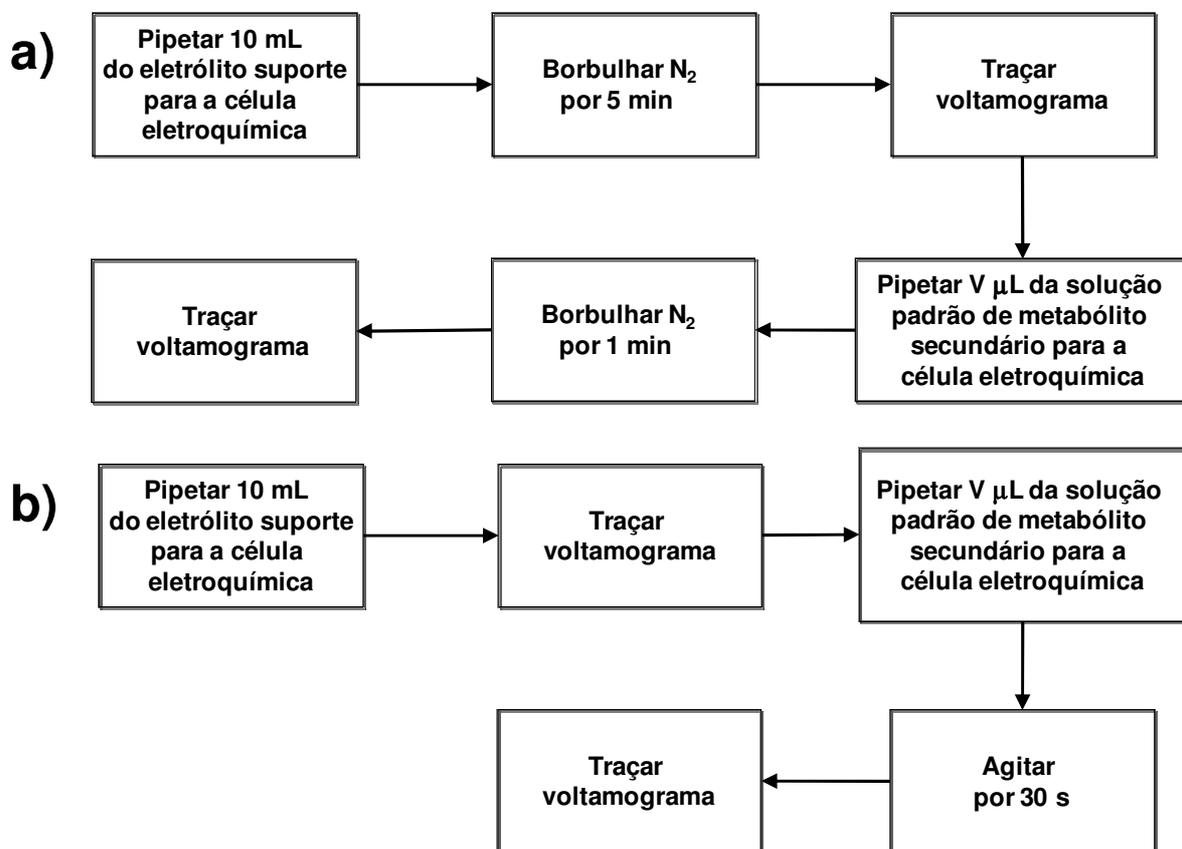


Figura 30. Diagramas esquemáticos dos procedimentos adotados nos testes para avaliar o perfil voltamétrico dos metabólitos secundários com o HMDE (a) e diferentes eletrodos sólidos (b) por DPV e no estudo do processo de oxidação/redução dos metabólitos secundários no eletrodo de GC por CV (b). Metabólito secundário: daidzeína, daidzina, genisteína, genistina, gliciteína, glicitina ou rutina. (V = volume).

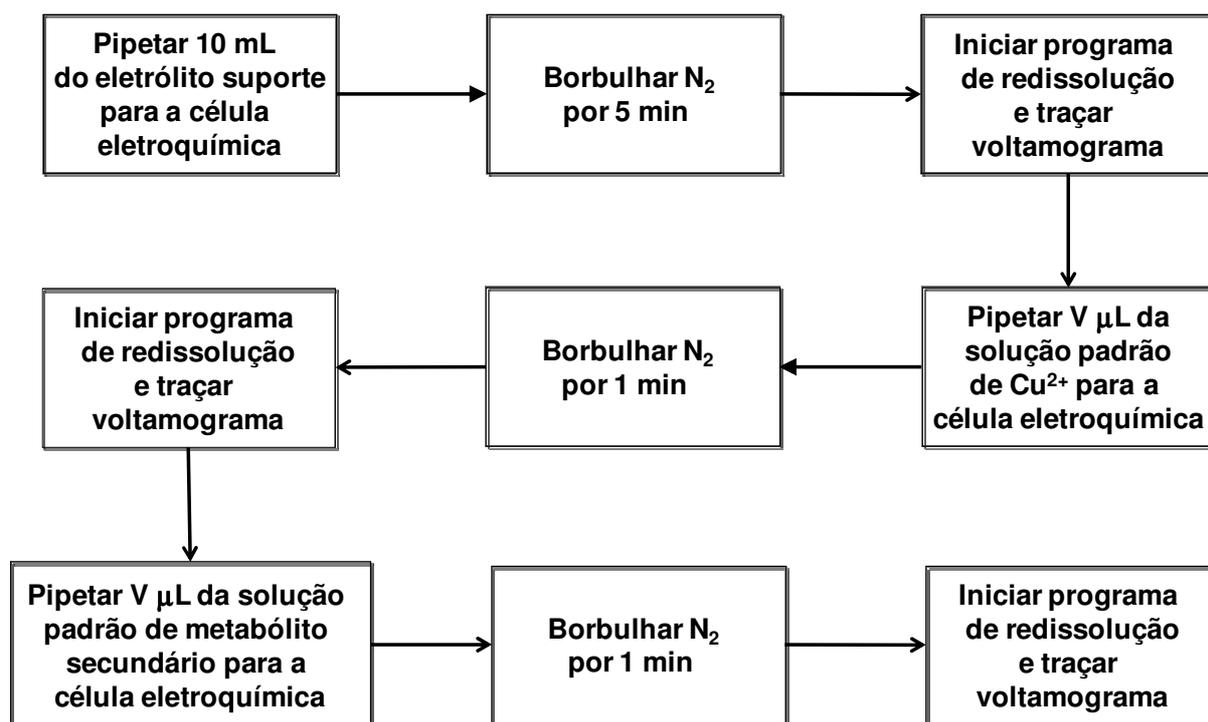


Figura 31. Diagrama esquemático do procedimento adotado nos testes para avaliar o perfil voltamétrico dos metabólitos secundários com o HMDE por DPCAdSV e no estudo do processo de oxidação/redução do complexo Cu^{2+} -rutina no HMDE por CV. Metabólito secundário: daidzeína, daidzina, genisteína, genistina, gliciteína, glicitina ou rutina. (V = volume).

Os parâmetros e as condições experimentais dos testes para avaliar o perfil voltamétrico dos metabólitos secundários com o HMDE e diferentes eletrodos sólidos são mostrados nas Tabelas 4 e 5, respectivamente.

Tabela 4. Parâmetros utilizados nos testes para avaliar o perfil voltamétrico dos metabólitos secundários com o HMDE e diferentes eletrodos sólidos

Parâmetros	Valores		
	HMDE	Eletrodos sólidos	
	DPCAdSV	DPV	DPV
Amplitude do pulso / mV	70	50	50
v / mV s ⁻¹	50	50	50
E_{ac} / V	-1,000	-	-
t_{ac} / s	180	-	-
E_i / V	0,150	-0,700	0
E_f / V	-0,400	-1,250	1,000

Eletrodo de referência: Ag/AgCl (3 mol L⁻¹)

Tabela 5. Condições experimentais utilizadas nos testes para avaliar o perfil voltamétrico dos metabólitos secundários com o HMDE e diferentes eletrodos sólidos

Condições Experimentais	
Eletrólito suporte	Tampão fosfato pH 6,0 Tampão fosfato pH 3,0
[Cu ²⁺] / mol L ⁻¹	1,0 x 10 ⁻⁴
$V_{Cu^{2+}}$ / μ L	100
[Metabólito secundário] / mol L ⁻¹	1,0 x 10 ⁻⁴ ou 1,0 x 10 ⁻³
$V_{Metabólito\ secundário}$ / μ L	20–200

Metabólito secundário: daidzeína ou rutina. (V = volume)

2.3 Otimização dos parâmetros e condições experimentais para a detecção e quantificação de metabólitos secundários em amostras de soja por técnicas voltamétricas (Estudos Qualitativos)

Antes de determinar as condições e os parâmetros experimentais ótimos para a detecção e quantificação de metabólitos secundários em soja, foi realizado

um estudo do processo de oxidação/redução dos metabólitos secundários no eletrodo de GC por CV e do complexo Cu^{2+} -rutina no HMDE utilizando-se a CV.

2.3.1 Estudo do processo de oxidação/redução dos metabólitos secundários no eletrodo de GC por CV

A CV foi utilizada para estudar o processo de oxidação/redução dos metabólitos secundários no eletrodo de GC. O procedimento utilizado está descrito na Figura 30. Os parâmetros e as condições experimentais do estudo do processo de oxidação/redução dos metabólitos secundários por CV são mostrados nas Tabelas 6 e 7, respectivamente.

Tabela 6. Parâmetros utilizados no estudo do processo de oxidação/redução dos metabólitos secundários no eletrodo de GC por CV

Operações	Parâmetros
E_i / V	0
E_w / V	1,300
E_f / V	0
$v / \text{mV s}^{-1}$	10–200

Eletrólito de referência: Ag/AgCl (3 mol L^{-1})

Tabela 7. Condições experimentais utilizadas no estudo do processo de oxidação/redução dos metabólitos secundários no eletrodo de GC por CV

Condições Experimentais	
Eletrólito suporte	Tampão fosfato pH 6,0
[Metabólito secundário] / mol L^{-1}	$1,0 \times 10^{-3}$ ou $5,0 \times 10^{-4}$
$V_{\text{Metabólito secundário}} / \mu\text{L}$	500 ou 1000

Metabólito secundário: daidzeína, daidzina, genisteína, genistina, gliciteína, glicitina ou rutina. (V = volume)

2.3.2 Estudo do processo de oxidação/redução do complexo Cu²⁺-rutina no HMDE por CV

Foi realizado um estudo do processo de oxidação/redução do complexo Cu²⁺-rutina no HMDE utilizando a CV. O procedimento utilizado está descrito na Figura 31.

Os parâmetros e as condições experimentais do estudo do processo de oxidação/redução do complexo Cu²⁺-rutina no HMDE por CV são mostrados nas Tabelas 8 e 9, respectivamente.

Tabela 8. Parâmetros utilizados no estudo do processo de oxidação/redução do complexo Cu²⁺-rutina no HMDE por CV

Operações	Parâmetros
E _i / V	0,200
E _w / V	-1,200
E _f / V	0,200
v / mV s ⁻¹	10–600

Eletrodo de referência: Ag/AgCl (3 mol L⁻¹)

Tabela 9. Condições experimentais utilizadas no estudo do processo de oxidação/redução do complexo Cu²⁺-rutina no HMDE por CV

Condições Experimentais	
Eletrólito suporte	Tampão fosfato pH 6,0
[Cu ²⁺] / mol L ⁻¹	1,0 x 10 ⁻³
V _{Cu2+} / μL	100
[Rutina] / mol L ⁻¹	1,0 x 10 ⁻³
V _{Rutina} / μL	100

(V = volume)

2.3.3 Otimização dos parâmetros e condições experimentais para a determinação de rutina por DPCAdSV utilizando-se o HMDE

2.3.3.1 Eletrólito suporte e pH

A influência do eletrólito suporte e do pH na corrente do complexo Cu^{2+} -rutina, usando a DPCAdSV e o HMDE, foi estudada por meio do procedimento descrito na Figura 32.

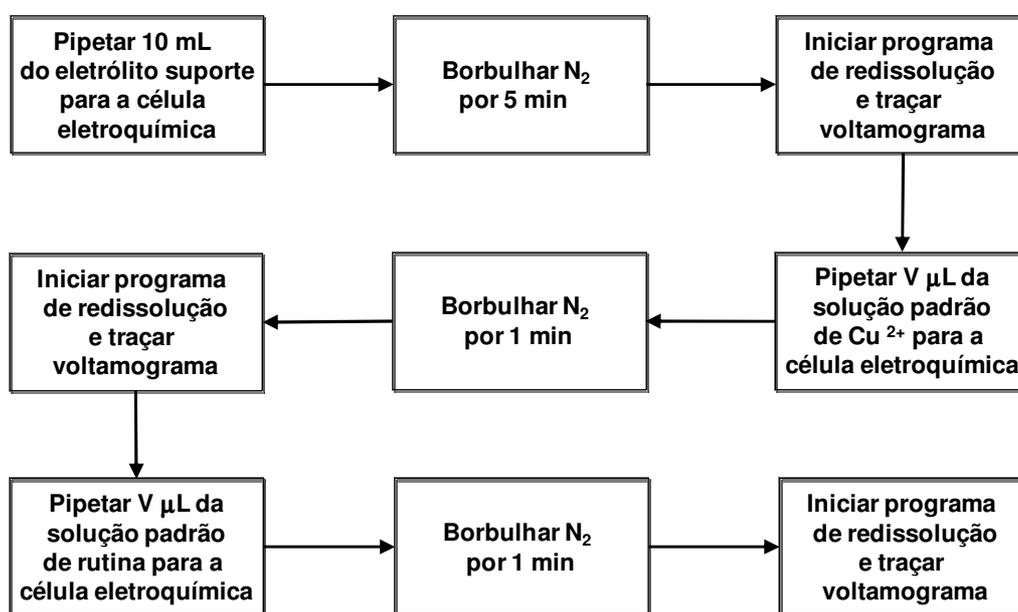


Figura 32. Diagrama esquemático do procedimento adotado no estudo da influência do eletrólito suporte e do pH na corrente do complexo Cu^{2+} -rutina por DPCAdSV utilizando-se o HMDE. (V = volume).

Os parâmetros e as condições experimentais do estudo da influência do eletrólito suporte e do pH na corrente do complexo Cu^{2+} -rutina por DPCAdSV utilizando-se o HMDE são mostrados nas Tabelas 10 e 11, respectivamente.

Tabela 10. Parâmetros utilizados no estudo da influência do eletrólito suporte e do pH na corrente do complexo Cu²⁺-rutina por DPCAdSV utilizando-se o HMDE

Operações	Parâmetros
Tempo de vida da gota / ms	600
Área da gota / mm ²	0,300
Amplitude do pulso / mV	50
$v / \text{mV s}^{-1}$	60
E_{ac} / V	-1,100
t_{ac} / s	180
E_i / V	0,100
E_f / V	-1,100

Eletrodo de referência: Ag/AgCl (3 mol L⁻¹)

Tabela 11. Condições experimentais utilizadas no estudo da influência do eletrólito suporte e do pH na corrente do complexo Cu²⁺-rutina por DPCAdSV utilizando-se o HMDE

Condições Experimentais	
Eletrólito suporte	Tampão fosfato pH 3,0–12,0 Tampão B-R pH 3,0–12,0
[Cu ²⁺] / mol L ⁻¹	1,0 x 10 ⁻⁴
$V_{\text{Cu}^{2+}} / \mu\text{L}$	100
[Rutina] / mol L ⁻¹	1,0 x 10 ⁻⁴
$V_{\text{Rutina}} / \mu\text{L}$	100

(V = volume)

2.3.3.2 Potencial de acumulação, tempo de acumulação, amplitude de pulso e velocidade de varredura

O estudo da influência do potencial de acumulação, tempo de acumulação, amplitude de pulso e velocidade de varredura na corrente do complexo Cu²⁺-rutina, utilizando-se a DPCAdSV e o HMDE, foi realizado por meio do procedimento descrito na Figura 33.

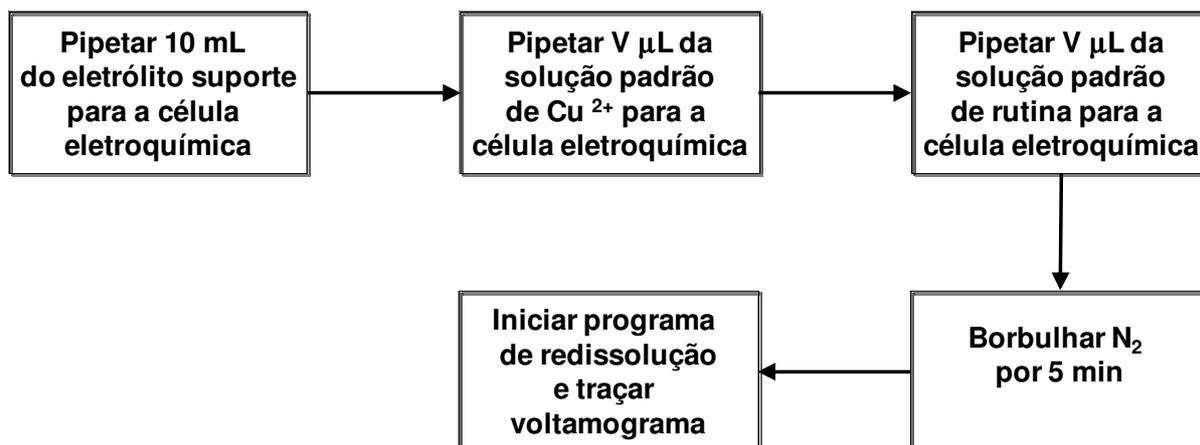


Figura 33. Diagrama esquemático do procedimento adotado no estudo da influência do potencial de acumulação, tempo de acumulação, amplitude de pulso e velocidade de varredura na corrente do complexo Cu^{2+} -rutina por DPCCAdSV utilizando-se o HMDE. (V = volume).

Os parâmetros e as condições experimentais desse estudo são mostrados nas Tabelas 12 e 13, respectivamente.

Tabela 12. Parâmetros utilizados no estudo da influência do potencial de acumulação, tempo de acumulação, amplitude de pulso e velocidade de varredura na corrente do complexo Cu^{2+} -rutina por DPCCAdSV utilizando-se o HMDE

Operações	Parâmetros
Amplitude do pulso / mV	10–100
$v / \text{mV s}^{-1}$	5–600
E_{ac} / V	-1,200– -0,500
t_{ac} / s	30–300
E_i / V	0,050
E_f / V	-0,400

Eletrodo de referência: Ag/AgCl (3 mol L^{-1})

Tabela 13. Condições experimentais utilizadas no estudo da influência do potencial de acumulação, tempo de acumulação, amplitude de pulso e velocidade de varredura na corrente do complexo Cu^{2+} -rutina por DPCCAdSV utilizando-se o HMDE

Condições Experimentais	
Eletrólito suporte	Tampão fosfato pH 6,0
$[\text{Cu}^{2+}] / \text{mol L}^{-1}$	$1,0 \times 10^{-4}$
$V_{\text{Cu}^{2+}} / \mu\text{L}$	100
$[\text{Rutina}] / \text{mol L}^{-1}$	$1,0 \times 10^{-4}$
$V_{\text{Rutina}} / \mu\text{L}$	100

(V = volume)

2.3.3.3 Concentração de Cu^{2+}

O efeito da concentração de cobre na corrente do complexo Cu^{2+} -rutina, utilizando-se a DPCCAdSV e o HMDE, foi verificado por meio do procedimento descrito na Figura 34.

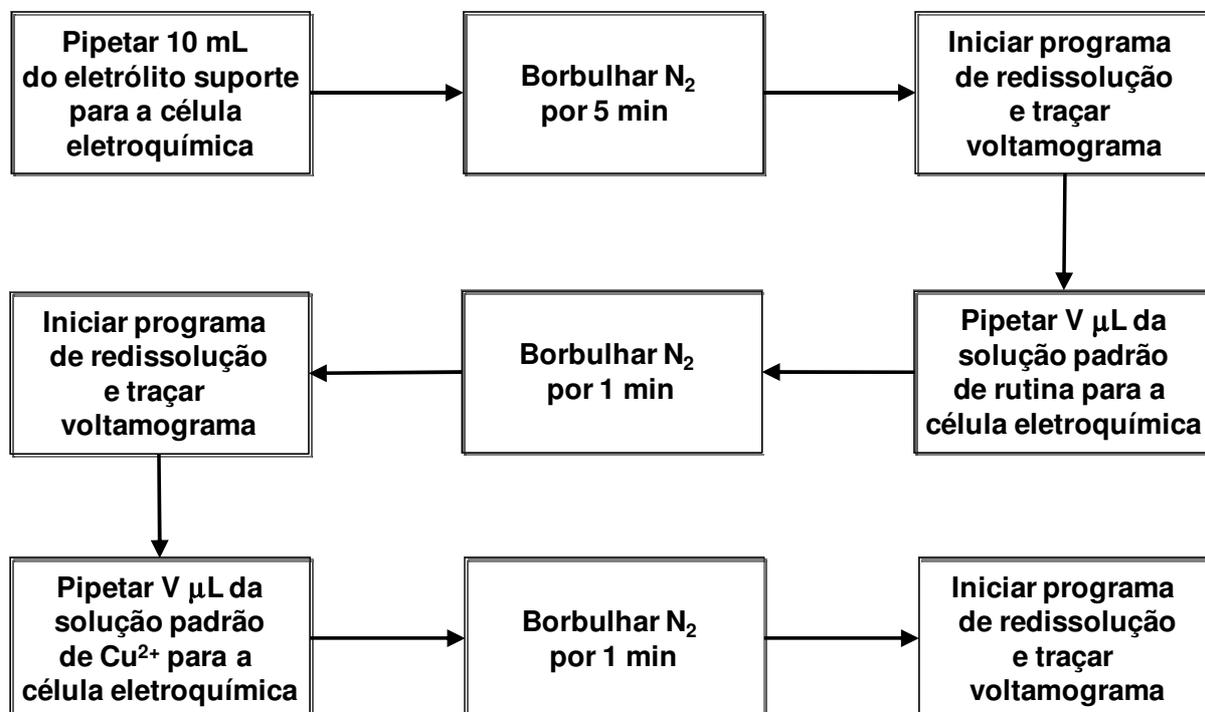


Figura 34. Diagrama esquemático do procedimento adotado no estudo da influência da concentração de cobre na corrente do complexo Cu^{2+} -rutina por DPCCAdSV utilizando-se o HMDE. (V = volume).

Os parâmetros e as condições experimentais do estudo da influência da concentração de cobre na corrente do complexo Cu^{2+} -rutina por DPAdSV utilizando-se o HMDE são mostrados nas Tabelas 14 e 15, respectivamente.

Tabela 14. Parâmetros utilizados no estudo da influência da concentração de cobre na corrente do complexo Cu^{2+} -rutina por DPAdSV utilizando-se o HMDE

Operações	Parâmetros
Amplitude do pulso / mV	70
v / mV s^{-1}	50
E_{ac} / V	-1,100
t_{ac} / s	180
E_i / V	0,050
E_f / V	-0,400

Eletrodo de referência: Ag/AgCl (3 mol L^{-1})

Tabela 15. Condições experimentais utilizadas no estudo da influência da concentração de cobre na corrente do complexo Cu^{2+} -rutina por DPAdSV utilizando-se o HMDE

Condições Experimentais	
Eletrólito suporte	Tampão fosfato pH 6,0
$[\text{Cu}^{2+}]$ / mol L^{-1}	$1,0 \times 10^{-4}$
$V_{\text{Cu}^{2+}}$ / μL	20–180
$[\text{Rutina}]$ / mol L^{-1}	$1,0 \times 10^{-4}$
V_{Rutina} / μL	100

(V = volume)

2.3.4 Otimização dos parâmetros e condições experimentais para a detecção e quantificação de metabólitos secundários por DPV e DPAdSV

Foram realizados diversos ensaios para determinar as condições e os parâmetros experimentais ótimos para a detecção e quantificação de metabólitos por DPV e DPAdSV. Os itens de 1 a 6 mostram as condições e os parâmetros estudados:

- 1) Eletrólito suporte e pH;
- 2) Potencial de acumulação;
- 3) Tempo de acumulação;
- 4) Amplitude de pulso;
- 5) Velocidade de varredura;
- 6) Repetibilidade do eletrodo de trabalho.

O procedimento utilizado na otimização dos parâmetros e condições experimentais para a detecção e quantificação de metabólitos secundários por DPV e DPAdSV, utilizando-se o HMDE e os eletrodo de GC e grafite, está descrito na Figura 35.

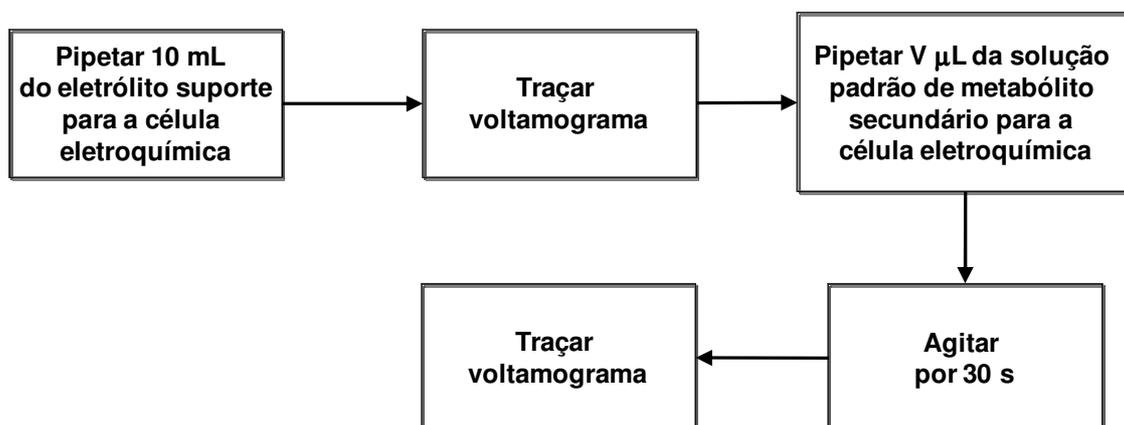


Figura 35. Diagrama esquemático do procedimento adotado na otimização dos parâmetros e condições experimentais para a detecção e quantificação de metabólitos secundários por DPV e DPAdSV, utilizando-se o HMDE e os eletrodo de GC e grafite. Metabólito secundário: daidzeína, daidzina, genisteína, genistina, gliciteína, glicitina ou rutina. (V = volume).

Os parâmetros e as condições experimentais utilizados nos estudos de otimização por DPV e DPAdSV, utilizando-se o HMDE e os eletrodo de GC e grafite, são mostrados nas Tabelas 16 e 17, respectivamente.

Tabela 16. Parâmetros utilizados nos estudos de otimização por DPV e DPAdSV, utilizando-se o HMDE e os eletrodo de GC e grafite

Operações	Parâmetros
Amplitude do pulso / mV	10–100
$v / \text{mV s}^{-1}$	5–50
E_{ac} / V	-0,100–0,600
t_{ac} / s	30–300
E_i / V	0 ou -0,700
E_f / V	1,000 ou -1,250

Eletrodo de referência: Ag/AgCl (3 mol L⁻¹)

Tabela 17. Condições experimentais utilizadas nos estudos de otimização por DPV e DPAdSV, utilizando-se o HMDE e os eletrodo de GC e grafite

Condições Experimentais	
Eletrólito suporte	Tampão fosfato pH 3,0–7,0
[Metabólito secundário] / mol L ⁻¹	1,0x 10 ⁻³ ou 1,0x 10 ⁻⁴
$V_{\text{Metabólito secundário}} / \mu\text{L}$	60–200

Metabólito secundário: daidzeína, daidzina, genisteína, genistina, gliciteína, glicitina ou rutina. (V = volume)

2.4 Obtenção das figuras analíticas de mérito

2.4.1 Curvas analíticas

A curva analítica foi obtida pelo método de adição de padrão, nas condições experimentais ótimas. Os procedimentos utilizados estão descrito na Figura 36. Os Limites de Detecção (LD) e Limites de Quantificação (LQ) foram calculados a partir de: $LD = 3S_b/b$; $LQ = 10S_b/b$, onde S_b é o desvio padrão das medidas do branco e b é a inclinação da curva analítica.⁹⁴

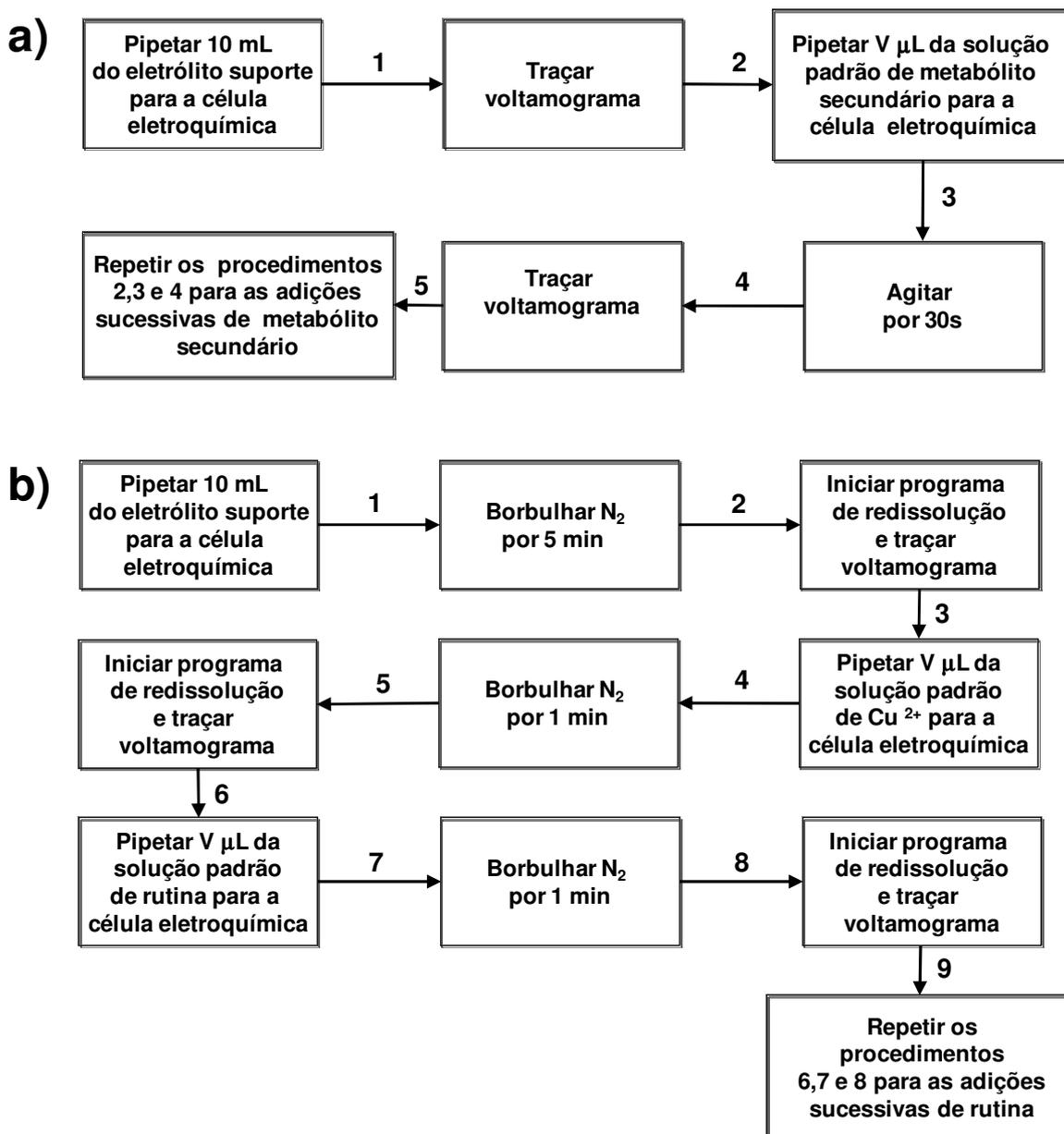


Figura 36. Diagrama esquemático do procedimento adotado na obtenção da curva analítica. a) por DPV e DPAdSV, utilizando-se o HMDE e os eletrodo de GC e grafite; b) por DPCAdSV, utilizando-se o HMDE. Metabólito secundário: daidzeína, daidzina, genisteína ou rutina. (V = volume).

2.5 Análise de amostras preparadas de isoflavonas

Antes de realizar testes com amostras de grãos e folhas de soja, foi realizado um estudo com quatro amostras preparadas de isoflavonas ($5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), com diferentes porcentagens de metabólitos secundários. Esse estudo foi

realizado para verificar a recuperação de isoflavonas totais utilizando-se os métodos voltamétricos desenvolvidos, baseados no eletrodo de GC ou HMDE e na DPV.

O procedimento utilizado na análise das amostras preparadas de isoflavonas está descrito na Figura 37.

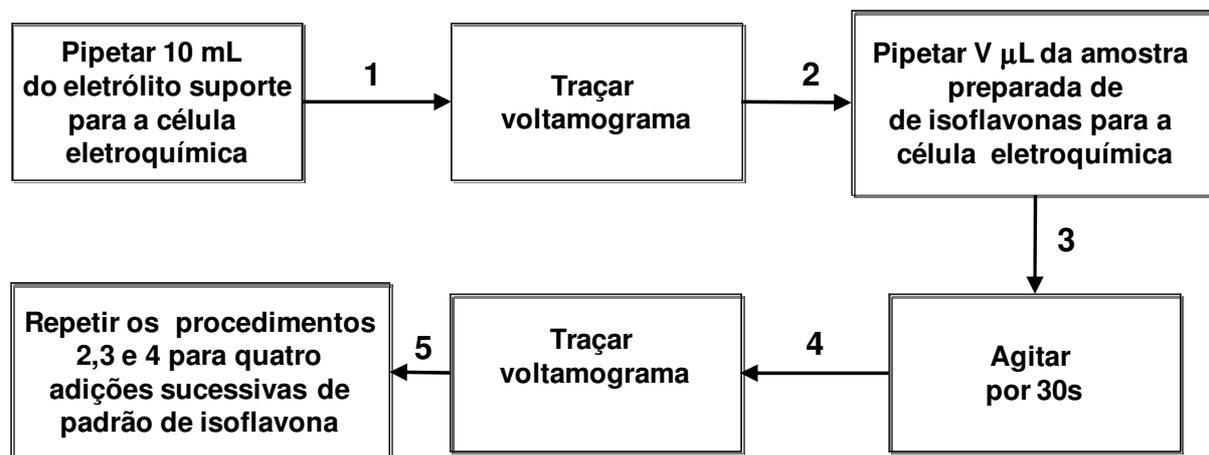


Figura 37. Diagrama esquemático do procedimento adotado na análise das amostras preparadas de isoflavonas. Isoflavona: daidzeína, daidzina ou genisteína. (V = volume).

Os parâmetros e as condições experimentais da análise das amostras preparadas de isoflavonas são mostrados nas Tabelas 18 e 19, respectivamente.

Tabela 18. Parâmetros utilizados na análise das amostras preparadas de isoflavonas por DPV, utilizando-se o eletrodo de GC ou HMDE

Operações	Parâmetros	
	GC	HMDE
Amplitude do pulso / mV	50	50
$v / \text{mV s}^{-1}$	50	50
E_i / V	0,200	-0,700
E_f / V	1,000	-1,250

Eletrodo de referência: Ag/AgCl (3 mol L⁻¹)

Tabela 19. Condições experimentais utilizadas na análise das amostras preparadas de isoflavonas por DPV, utilizando-se o eletrodo de GC ou HMDE

Condições Experimentais	
Eletrólito suporte	Tampão fosfato pH 3,0–6,0
[Isoflavona] / mol L ⁻¹	1,0 x 10 ⁻³
V Amostra preparada / μL	70–100
V Isoflavona/ μL	5–10

Isoflavona: daidzeína, daidzina ou genisteína. (V = volume)

2.6 Preparação de amostras de soja para a identificação e quantificação de metabólitos secundários

2.6.1 Comprimidos à base de extrato soja

O procedimento utilizado na preparação das amostras dos comprimidos à base de extrato de soja está descrito na Figura 38.

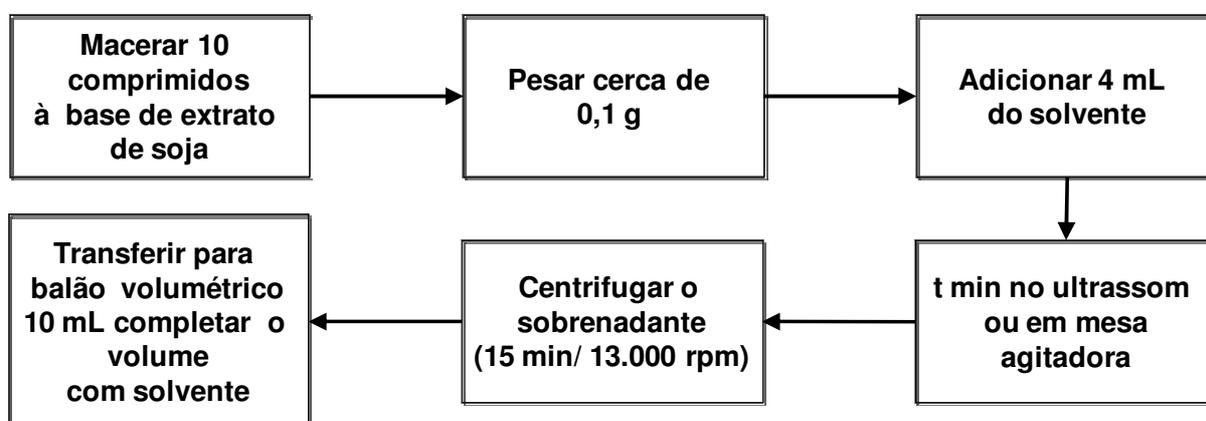


Figura 38. Diagrama esquemático do procedimento adotado na preparação das amostras dos comprimidos à base de extrato de soja. (t = tempo).

As condições experimentais utilizadas na preparação das amostras dos comprimidos à base de extrato de soja são mostradas na Tabela 20.

Tabela 20. Condições experimentais utilizadas na preparação das amostras dos comprimidos à base de extrato de soja

Condições Experimentais	
Solvente	Acetona, acetonitrila, etanol ou metanol
Concentração do solvente em água / %	25, 50, 70 ou 99,5
t na mesa agitadora / hora	1
t no ultrassom / min	5–30

2.6.2 Folhas e grãos de soja

O procedimento utilizado na preparação de grãos e folhas de soja está descrito na Figura 39.

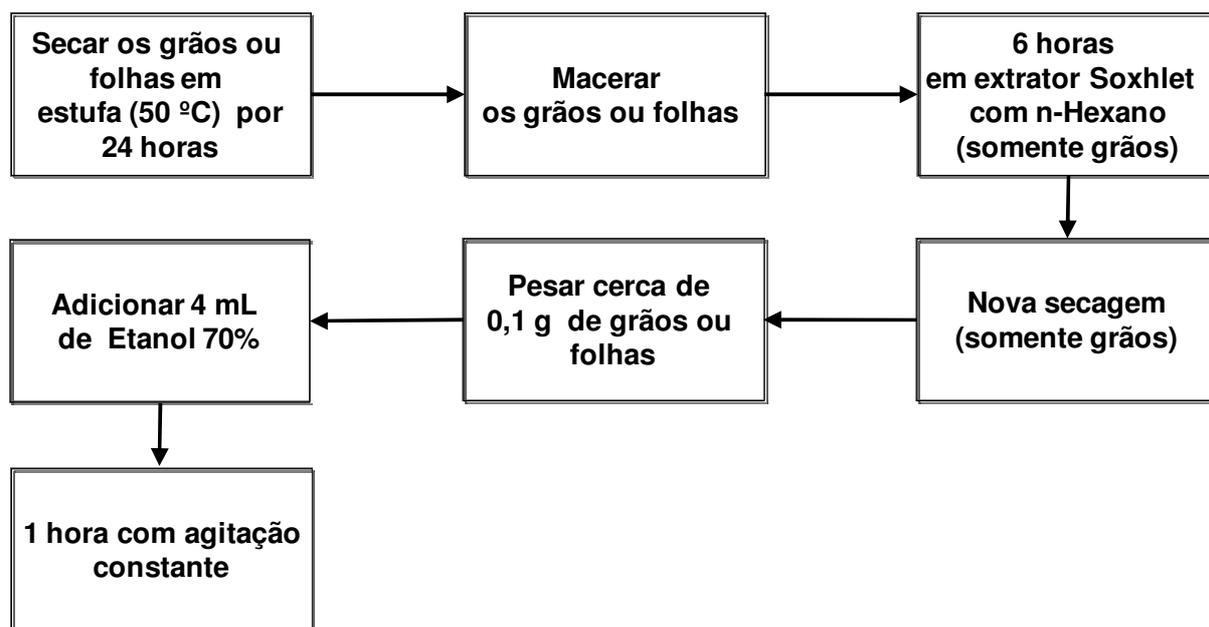


Figura 39. Diagrama esquemático do procedimento adotado na preparação de grãos e folhas de soja.

Após as etapas de secagem, maceração e extração com etanol 70%, descritas na Figura 39, a preparação dos grãos da cultivar Flora envolveu ainda a realização de uma extração em fase sólida (SPE), utilizando-se um cartucho C18/18% (Applied Separations). Inicialmente, o cartucho foi condicionado com 3 mL de metanol e 3 mL de água. Em seguida, o extrato etanólico da cultivar Flora foi

adicionado no cartucho, que posteriormente foi lavado com 3 mL de metanol 10%. A última etapa compreendeu a eluição das isoflavonas com 3 mL de metanol 80%.

2.7 Análise dos comprimidos à base de extrato de soja e de grãos de soja da cultivar Flora utilizando-se a DPV e o eletrodo de GC

O procedimento utilizado na determinação de isoflavonas totais em comprimidos à base de extrato de soja e de grãos de soja da cultivar Flora, por DPV, utilizando-se o eletrodo de GC, está descrito na Figura 40.

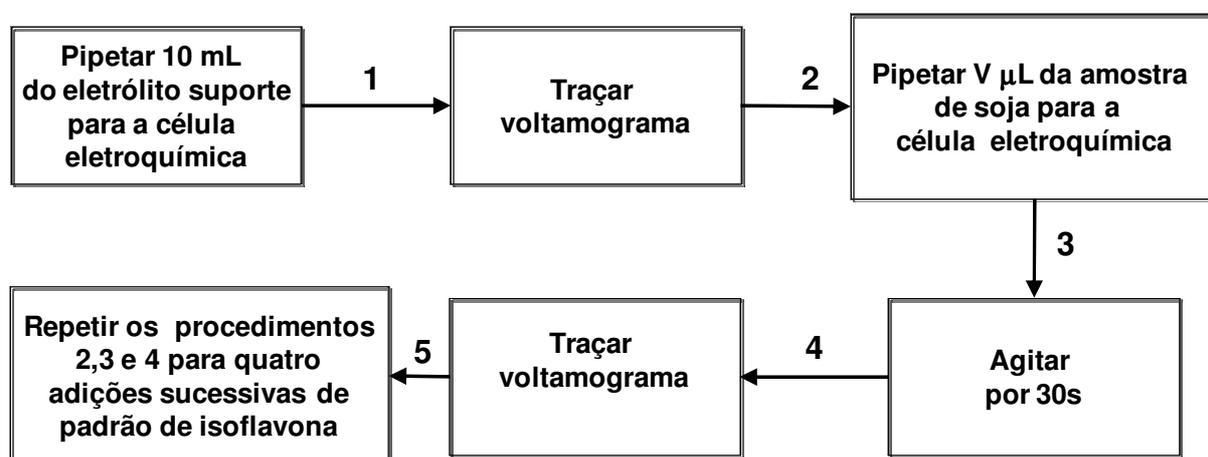


Figura 40. Diagrama esquemático do procedimento adotado na determinação de isoflavonas totais em comprimidos à base de extrato de soja e de grãos de soja da cultivar Flora, por DPV, utilizando-se o eletrodo de GC. Isoflavona: daidzeína ou genisteína. (V = volume).

Os parâmetros e as condições experimentais utilizados na determinação de isoflavonas totais em comprimidos à base de extrato de soja e de grãos de soja da cultivar Flora, por DPV, utilizando-se o eletrodo de GC, são mostrados nas Tabelas 21 e 22, respectivamente.

Tabela 21. Parâmetros utilizados na determinação de isoflavonas totais em comprimidos à base de extrato de soja e de grãos de soja da cultivar Flora, por DPV, utilizando-se o eletrodo de GC

Operações	Parâmetros
Amplitude do pulso / mV	50
v / mV s ⁻¹	50
E_i / V	0,200
E_f / V	1,000
Eletrodo de referência: Ag/AgCl (3 mol L ⁻¹)	

Tabela 22. Condições experimentais utilizadas na determinação de isoflavonas totais em comprimidos à base de extrato de soja e de grãos de soja da cultivar Flora, por DPV, utilizando-se o eletrodo de GC

Condições Experimentais	
Eletrólito suporte	Tampão fosfato pH 3,0–6,0
[Metabólito secundário] / mol L ⁻¹	1,0 x 10 ⁻³
$V_{\text{Amostra de comprimido}}$ / μL	20
$V_{\text{isoflavona}}$ / μL	10
Isoflavona: daidzeína ou genisteína. (V = volume)	

2.8 Análise de amostras de grãos e folhas de soja das cultivares P98R6, BRQ 96-3065, IAC-100 e Dowling, utilizando-se a DPCAdSV e o HMDE

O procedimento utilizado na análise de grãos e folhas de soja das cultivares P98R6, BRQ 96-3065, IAC-100 e Dowling, por DPCAdSV, utilizando-se o HMDE, está descrito na Figura 41.

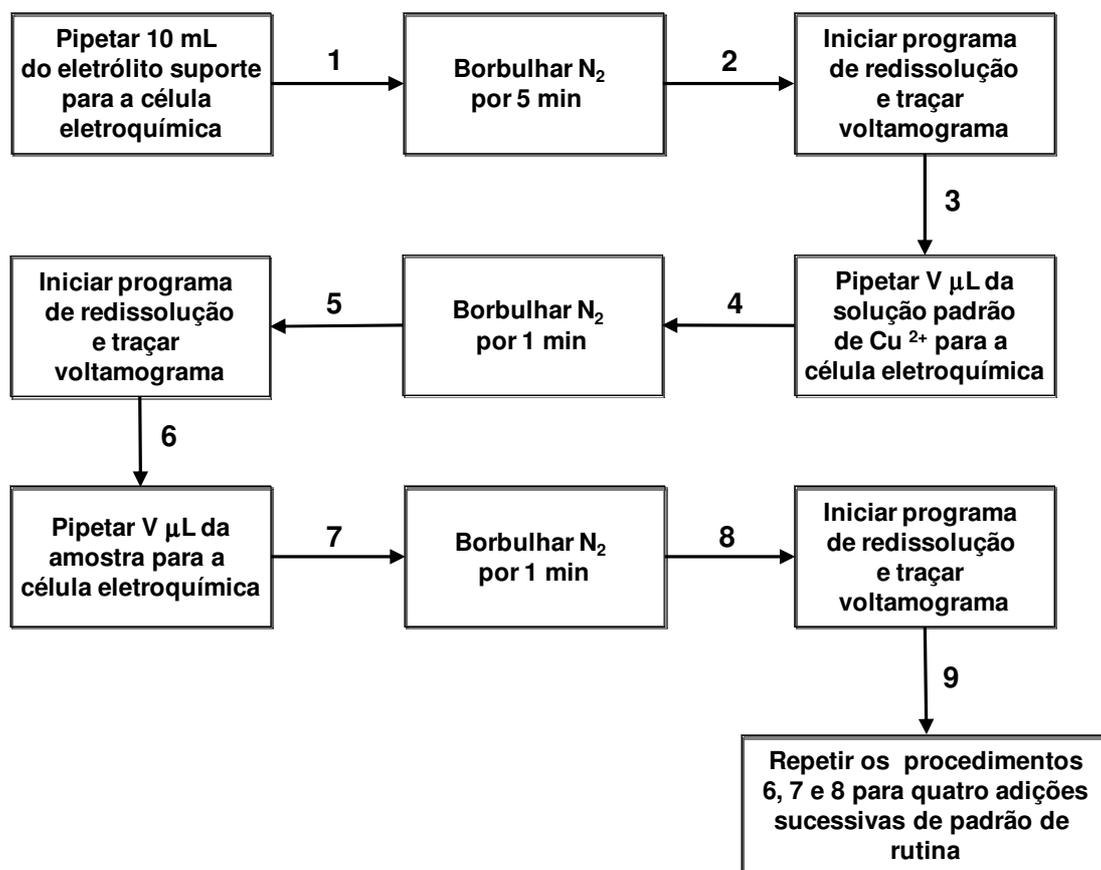


Figura 41. Diagrama esquemático do procedimento adotado na determinação de rotina em de grãos e folhas de soja das cultivares P98R6, BRQ 96-3065, IAC-100 e Dowling, por DPCAdSV, utilizando-se o HMDE. (V = volume).

Os parâmetros e as condições experimentais utilizados na determinação de rotina em grãos e folhas de soja das cultivares P98R6, BRQ 96-3065, IAC-100 e Dowling, por DPCAdSV, utilizando-se o HMDE, são mostrados nas Tabelas 23 e 24, respectivamente.

Tabela 23. Parâmetros utilizados na determinação de rutina em grãos e folhas de soja das cultivares P98R6, BRQ 96-3065, IAC-100 e Dowling, por DPCAdSV, utilizando-se o HMDE

Operações	Parâmetros
Amplitude do pulso / mV	70
$v / \text{mV s}^{-1}$	50
E_{ac} / V	-1,000
t_{ac} / s	180
E_i / V	0,050
E_f / V	-0,400

Eletrodo de referência: Ag/AgCl (3 mol L⁻¹)

Tabela 24. Condições experimentais utilizadas na determinação de rutina em grãos e folhas de soja das cultivares P98R6, BRQ 96-3065, IAC-100 e Dowling, por DPCAdSV, utilizando-se o HMDE

Condições Experimentais	
Eletrólito suporte	Tampão Fosfato pH 6,0
$[\text{Cu}^{2+}] / \text{mol L}^{-1}$	$1,0 \times 10^{-4}$
$V_{\text{Cu}^{2+}} / \mu\text{L}$	160
$[\text{Rutina}] / \text{mol L}^{-1}$	$1,0 \times 10^{-4}$
$V_{\text{Rutina}} / \mu\text{L}$	20–50
$V_{\text{Amostra de soja}} / \mu\text{L}$	40–50

(V = volume)

IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Avaliação da aplicabilidade do HMDE e de eletrodos sólidos para a detecção e quantificação de metabólitos secundários em amostras de soja por técnicas voltamétricas

Nos voltamogramas adsortivos de redissolução catódica de pulso diferencial obtidos para a daidzeína e rutina, em tampão fosfato pH 6,0, na presença de Cu^{2+} (Figura 42a), observaram-se sinais correspondentes à redução dos complexos Cu^{2+} -daidzeína e Cu^{2+} -rutina, indicando a possibilidade de aplicação do HMDE com a DPV no desenvolvimento de métodos analíticos. Empregando o HMDE e a DPV, sinais correspondentes à redução da daidzeína e da rutina foram observados nos voltamogramas obtidos (Figura 42b), também indicando a possibilidade de aplicação desse eletrodo com a DPV nos estudos voltamétricos, bem como no desenvolvimento de métodos analíticos.

Nos voltamogramas de pulso diferencial obtidos para a daidzeína e rutina em tampão fosfato pH 5,0, com diferentes eletrodos sólidos, não foram observados, para os eletrodos de ouro e platina (Figura 42c e d, respectivamente), sinais correspondentes à oxidação desses metabólitos secundários, impossibilitando a aplicação desses eletrodos nos estudos voltamétricos. Para os eletrodos de carbono vítreo e grafite, sinais correspondentes à oxidação da daidzeína e da rutina foram observados nos voltamogramas obtidos (Figura 42e e f), indicando a possibilidade de aplicação desses eletrodos nos estudos voltamétricos, como também no desenvolvimento de métodos analíticos. Resultados semelhantes aos obtidos com os eletrodos de carbono vítreo e grafite foram observados por Malagutti⁹¹ e Oliveira⁹⁵ e seus colaboradores com o eletrodo compósito GPU. No entanto, o uso deste eletrodo tem como principal desvantagem a dificuldade de renovação da superfície de resposta se comparado aos eletrodos comerciais utilizados, e por este motivo não foi considerado no presente estudo. Portanto, os eletrodos de carbono vítreo, grafite e de mercúrio foram os escolhidos para os estudos voltamétricos e o desenvolvimento de método analítico para a quantificação de metabólitos secundários em amostras de soja.

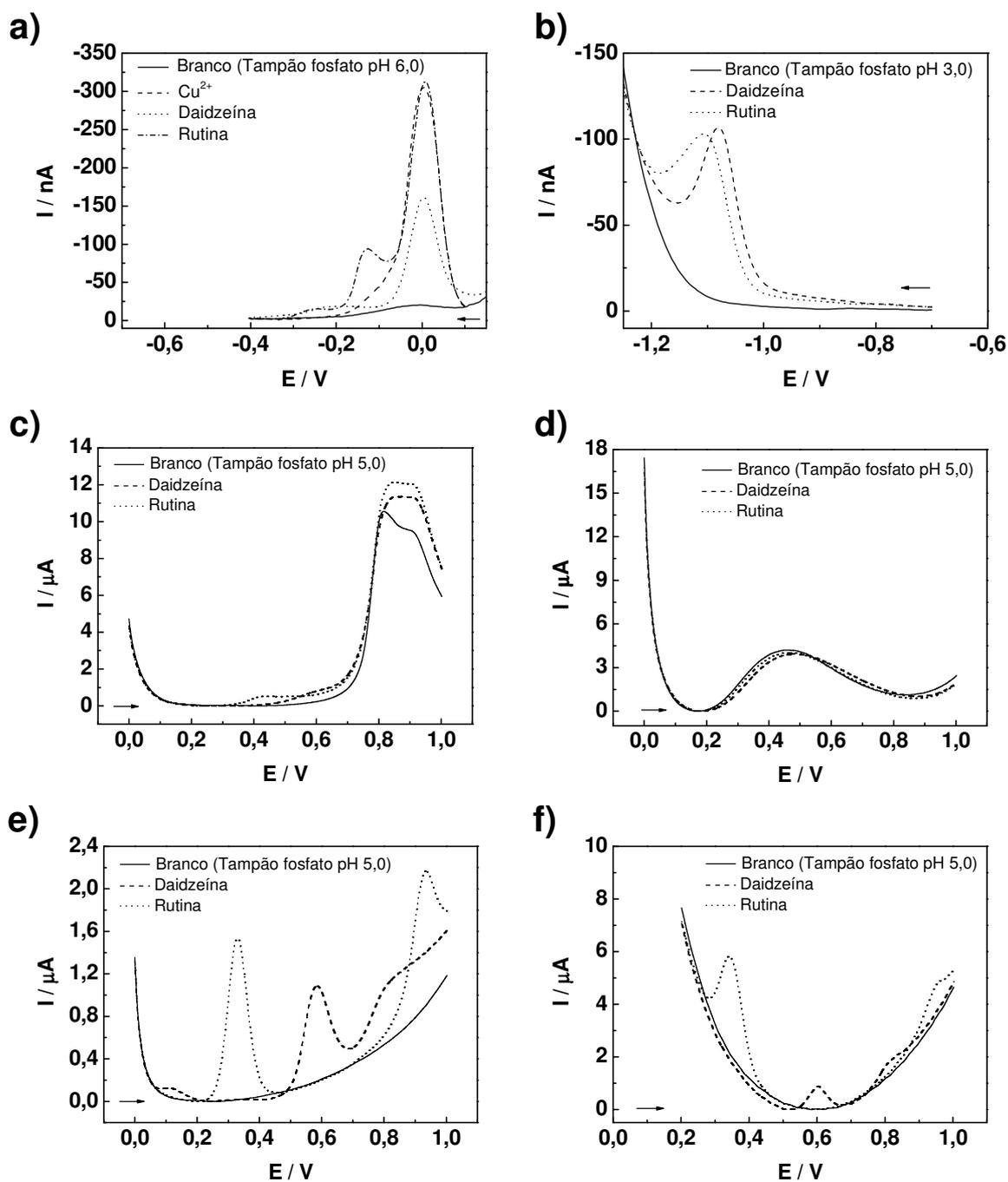


Figura 42. a) Voltamogramas adsortivos de redissolução catódica de pulso diferencial para a daidzeína $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e rutina $2,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ na presença de Cu^{2+} $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em 10 mL de tampão fosfato pH 6,0 utilizando-se o HMDE; b) Voltamogramas de pulso diferencial para o metabólito secundário $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em 10 mL de tampão fosfato pH 3,0 utilizando-se o HMDE; e voltamogramas de pulso diferencial para o metabólito secundário $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em 10 mL de tampão fosfato pH 5,0. c) Eletrodo de ouro; d) Eletrodo de platina; e) Eletrodo de carbono vítreo; f) Eletrodo de grafite.

2. Otimização dos parâmetros e condições experimentais para a detecção e quantificação de metabólitos secundários em amostras de soja por técnicas voltamétricas (Estudos Qualitativos)

A seguir são mostrados os resultados obtidos no estudo do processo de oxidação/redução dos metabólitos secundários no eletrodo de GC e do complexo Cu^{2+} -rutina no HMDE, por CV. Este estudo foi realizado antes do desenvolvimento dos métodos analíticos para a quantificação de metabólitos secundários em amostras de soja.

2.1 Estudo do processo de oxidação/redução dos metabólitos secundários no eletrodo de GC por CV

Os voltamogramas cíclicos, para as isoflavonas daidzeína, daidzina, genisteína, genistina, gliciteína e glicitina $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato pH 6,0 (Figura 43), mostram picos irreversíveis em torno de 0,600 V, correspondentes a oxidação do 4'-hidróxi do anel B. Para a genisteína (Figura 43c) foi observado um segundo sinal em 0,951 V, correspondente a oxidação do 5,7-dihidróxi do anel A. Os mesmos sinais foram observados para a daidzeína e genisteína por Wu e colaboradores.⁹⁶ No estudo do processo de oxidação, para todas as isoflavonas estudadas, obteve-se uma relação linear entre a corrente de pico e a v no intervalo 10–200 mV s^{-1} , indicando um processo controlado por adsorção (Figura 43 Inserções).

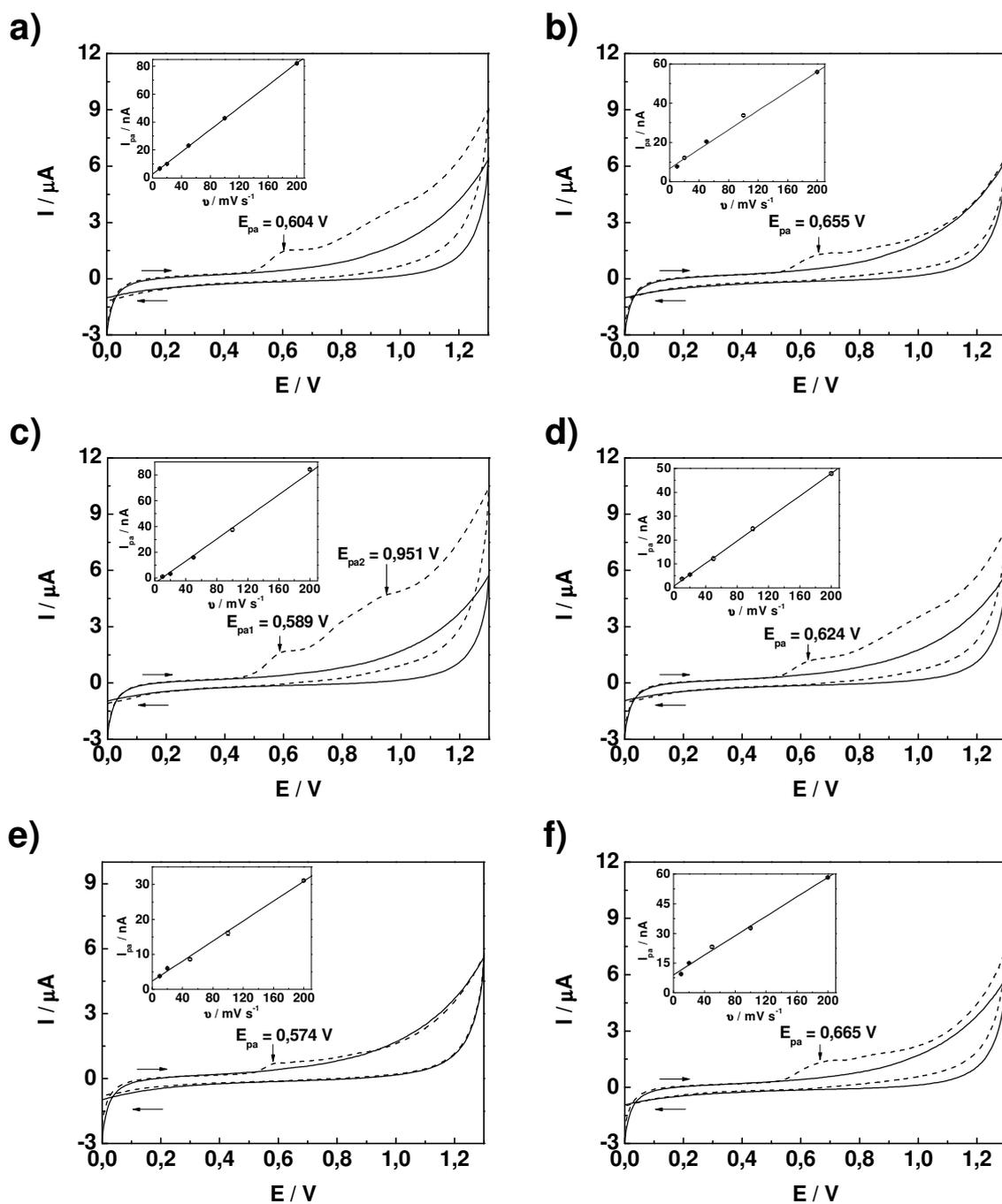


Figura 43. Voltamogramas cíclicos para as soluções de daidzeína (a), daidzina (b), genisteína (c), genistina (d), gliciteína (e) e glicitina (f) $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (---) em tampão fosfato pH 6,0 (—). Inserções: Curva I_{pc} vs v . $E_i = 0 \text{ V}$, $E_w = 1,300 \text{ V}$, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$, Eletrodo de trabalho: GC, Eletrodo de referência: Ag/AgCl (KCl 3 mol L^{-1}).

O voltamograma cíclico, obtido para a rutina $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato pH 6,0 (Figura 44), mostra um pico reversível em 0,332 V, correspondente a oxidação do 3',4'- dihidróxi do anel B. O pico correspondente à redução do 3',4'- diquinona formado ocorre em 0,292 V. Um segundo processo ocorre em 0,947 V, correspondente a oxidação irreversível do 5,7-dihidróxi do anel A. Os mesmos sinais foram observados para a rutina por Ghica e Brett.⁹⁷ No estudo do processo de oxidação, obteve-se uma relação linear entre a corrente de pico e a v no intervalo 10-200 mV s^{-1} , indicando um processo controlado por adsorção (Figura 44 Inserção).

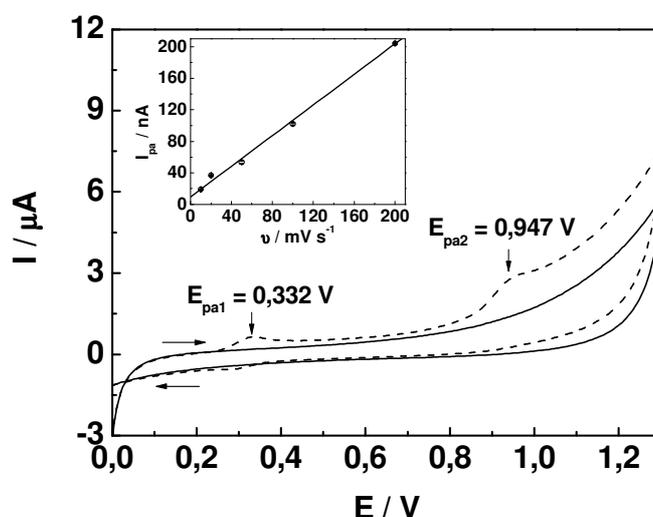


Figura 44. Voltamogramas cíclicos para a solução de rutina $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (---) em tampão fosfato pH 6,0 (—). Inserção: Curva I_{pc} vs v . $E_i = 0 \text{ V}$, $E_w = 1,300 \text{ V}$, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$, Eletrodo de trabalho: GC, Eletrodo de referência: Ag/AgCl (KCl 3 mol L^{-1}).

2.2 Estudo do processo de oxidação/redução do complexo Cu^{2+} -Rutina no HMDE por CV

A Figura 45 mostra o voltamograma cíclico obtido para o Cu^{2+} $4,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ na ausência e na presença de rutina $4,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato pH 6,0. Na presença de rutina, observa-se um pico em -0,250 V, correspondente a redução do complexo Cu^{2+} -rutina. No estudo do processo de oxidação/redução do complexo Cu^{2+} -rutina, obteve-se uma relação linear entre a corrente de pico e a v no intervalo 10–600 mV s^{-1} ($I_{pc} = -1,491 + 0,529 v$, $r = 0,999$), indicando um processo controlado por adsorção (Figura 45 Inserção). Com o aumento da velocidade de

varredura, verificou-se um deslocamento para potenciais mais negativos do potencial de pico de redução do complexo Cu^{2+} -rutina, sendo o E_{pc} linear para $\log v$ no intervalo $50\text{--}600 \text{ mV s}^{-1}$ ($E_{pc} = -0,285 + 0,035 \log v$, $r = 0,993$). Considerando que dois elétrons estão envolvidos no processo de redução,⁸¹ o coeficiente de transferência de elétrons ($\alpha = 0,420$) foi calculado a partir da inclinação ($b/2$, onde b é a inclinação de Tafel ($-2,3RT/\alpha \text{ nF}$)) da curva E_{pc} vs $\log v$.⁹⁸ Este valor está em concordância com o determinado por Ensafi e colaboradores.⁸¹ A separação entre os potenciais de pico ($\Delta E_p = |E_{pc} - E_{pa}|$) é de cerca de 60 mV com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} . A separação entre os potenciais de pico cresce com o aumento da velocidade de varredura, indicando que a taxa de transferência de elétrons não é muito alta e a reação eletroquímica gradualmente se torna menos reversível. Considerando $\alpha = 0,420$, o potencial condicional formal do complexo de Cu^{2+} -rutina pode ser calculado pela equação $E^{0'} = E_{pa} - \alpha (E_{pa} - E_{pc})$. Como esperado, o potencial condicional formal é linear ao pH ($E^{0'} = 0,076 - 0,048\text{pH}$, $r = 0,994$). A partir da interseção desta curva, o potencial redox de Cu^{2+} -rutina foi encontrado ($0,076 \text{ V vs Ag / AgCl (KCl } 3 \text{ mol L}^{-1}\text{)}$) e está de acordo com o encontrado por Mahal e colaboradores.⁹⁹

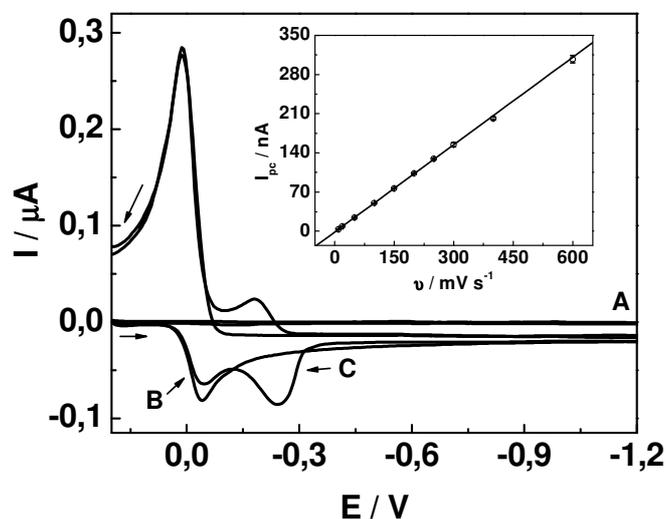


Figura 45. Voltamogramas cíclicos para a solução de Cu^{2+} $4,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ na ausência (curva B) e na presença de rutina $4,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (curva C) em tampão fosfato pH 6,0 (curva A). Inserção: Curva I_{pc} vs v . $E_i = 0,200 \text{ V}$, $E_w = -1,200 \text{ V}$, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$, Eletrodo de trabalho: HMDE, Eletrodo de referência: Ag/AgCl (KCl 3 mol L^{-1}).

3. Obtenção das figuras analíticas de mérito (Estudos Quantitativos)

Os parâmetros voltamétricos e as condições experimentais ótimas, que forneceram o melhor perfil voltamétrico (largura do pico) e a maior intensidade da corrente de oxidação ou redução, para a determinação de metabólitos secundários utilizando-se as técnicas de DPCAdSV, DPV e DPAdSV e os eletrodos HMDE, grafite e GC, foram determinados em ensaios prévios (Anexos I). Os resultados obtidos das curvas analíticas e de algumas figuras analíticas de mérito são mostrados a seguir.

3.1 Determinação de metabólitos secundários utilizando-se a DPCAdSV e o HMDE

Os parâmetros voltamétricos e as condições experimentais, otimizadas em ensaios prévios, para a determinação de rotina na presença de íons Cu^{2+} , utilizando-se a DPCAdSV e o HMDE são mostrados na Tabela 25.

Tabela 25. Parâmetros voltamétricos e condições experimentais otimizadas para a determinação de rotina, utilizando-se a DPCAdSV e o HMDE

Parâmetros	
Eletrólito suporte e pH	Tampão fosfato pH 6,0
E_{ac} / V	-1,000
Amplitude de pulso / mV	70
$v / \text{mV s}^{-1}$	50
t_{ac} / s	180
$[\text{Cu}^{2+}] / \text{mol L}^{-1}$	$1,6 \times 10^{-6}$
Eletrodo de referência: Ag/AgCl (3 mol L^{-1})	

Após a otimização dos parâmetros voltamétricos foi obtida a curva analítica para a rotina em tampão fosfato pH 6,0. A curva analítica (Figura 46), no intervalo de concentração de $2,0 \times 10^{-7}$ a $1,4 \times 10^{-6}$ mol L^{-1} , apresentou a equação

$I_{pc} \text{ (nA)} = 10,070 + 1,9 \times 10^8 [\text{Rutina}]$ ($r = 0,999$), com LD $7,0 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ e LQ $2,2 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$.

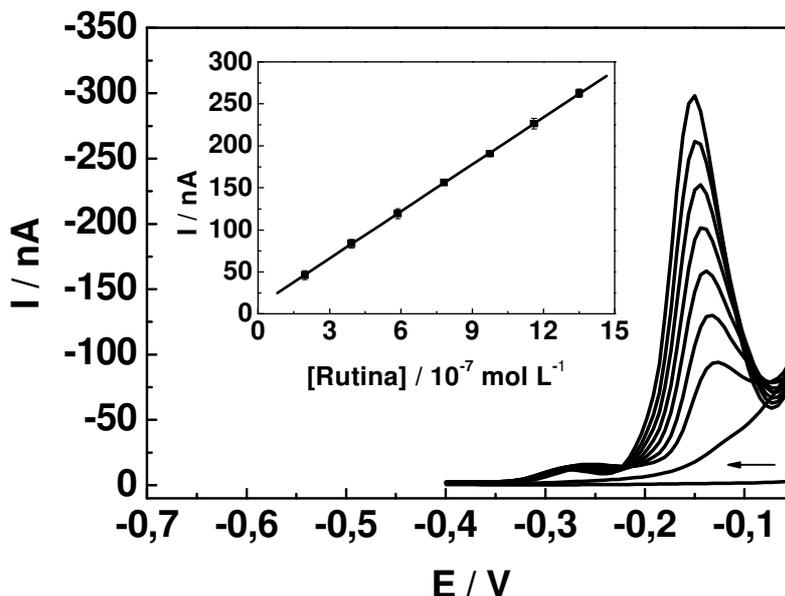


Figura 46. Voltamogramas adsortivos de redissolução catódica de pulso diferencial obtidos para o Cu^{2+} $1,6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em 10 mL de tampão fosfato pH 6,0 em diferentes concentrações de rutina. Inserção: Curva analítica. $E_{ac} = -1,000 \text{ V}$, $t_{ac} = 180 \text{ s}$, $E_i = 0,100 \text{ V}$; $E_f = -0,400 \text{ V}$, amplitude de pulso = 70 mV , $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, Eletrodo de trabalho: HMDE, Eletrodo de referência: Ag/AgCl ($\text{KCl } 3 \text{ mol L}^{-1}$).

Foram realizados ensaios com o objetivo de verificar a possibilidade de aplicação da DPCAdSV e o HMDE na detecção e quantificação de algumas isoflavonas (daidzeína, daidzina, genisteína, genistina, gliciteína e glicitina). Foram observados nos voltamogramas adsortivos de redissolução catódica (Figura 47), obtidos para as isoflavonas em tampão fosfato pH 6,0, um sinal correspondente a redução do complexo Cu^{2+} -isoflavona na presença de daidzeína, genisteína, genistina e gliciteína com concentrações na ordem de $10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Para a daidzina e glicitina não foram observados sinais correspondentes à redução dessas espécies complexadas com o Cu^{2+} . Portanto, estes resultados não indicam a aplicação da DPCAdSV e o HMDE no desenvolvimento de métodos analíticos para a quantificação de isoflavonas totais. Além disso, para as isoflavonas testadas, no qual foram observados sinais correspondentes à redução do complexo Cu^{2+} -isoflavona, os limites de detecção foram maiores que os obtidos utilizando outras técnicas voltamétricas e eletrodos.

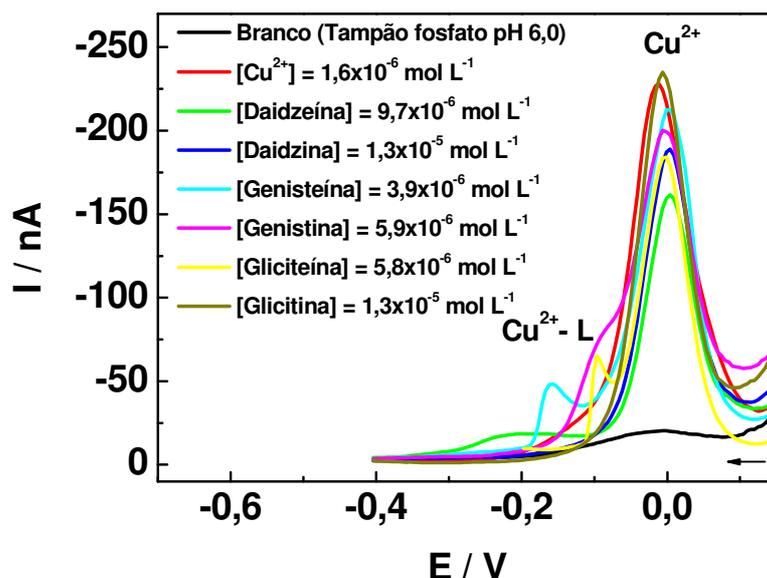


Figura 47. Voltamogramas adsortivos de redissolução catódica de pulso diferencial obtidos para o Cu^{2+} $1,6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em 10 mL de tampão fosfato pH 6,0 em diferentes concentrações de isoflavonas. $E_{ac} = -1,000 \text{ V}$, $t_{ac} = 180 \text{ s}$, $E_i = 0,150 \text{ V}$; $E_f = -0,400 \text{ V}$, amplitude de pulso = 70 mV , $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$, Eletrodo de trabalho: HMDE, Eletrodo de referência: Ag/AgCl (KCl 3 mol L^{-1}). (L = daidzeína, daidzina, genisteína, genistina, gliciteína ou glicitina)

3.2 Determinação de metabólitos secundários utilizando-se a DPV e o HMDE

Com a impossibilidade de aplicação da DPVAdSV com o HMDE na quantificação de algumas isoflavonas, foram realizados ensaios, para verificar a possibilidade de aplicação do HMDE e da DPV no desenvolvimento de métodos analíticos. Nos voltamogramas de pulso diferencial, obtidos para os metabólitos secundários (Figura 48), observam-se sinais entre $-1,200$ e $-1,000 \text{ V}$, correspondentes a redução dos metabólitos secundários no HMDE. Os potenciais de redução para estes metabólitos secundários são próximos, impossibilitando a determinação simultânea dos mesmos. No entanto, estes sinais poderão ser utilizados na detecção e quantificação de metabólitos secundários totais (rutina mais isoflavonas) em amostras de soja, empregando-se a DPV. Para o desenvolvimento de métodos analíticos foram selecionadas as isoflavonas daidzeína e daidzina, pois foram estas que apresentaram os melhores perfis voltamétricos e maiores sinais de redução no HMDE.

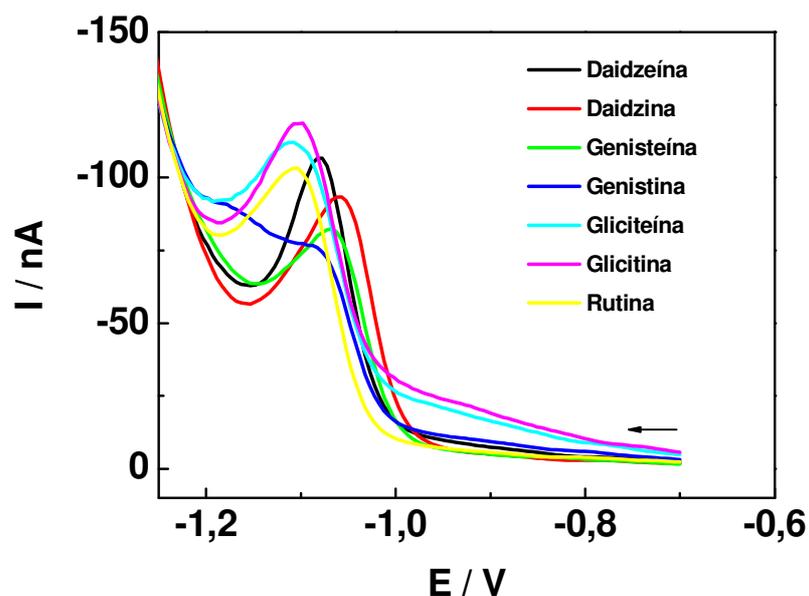


Figura 48. Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para o metabólito secundário $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em 10 mL de tampão fosfato pH 3,0. $E_i = -0,700 \text{ V}$; $E_f = -1,250 \text{ V}$, amplitude de pulso = 50 mV, $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$, Eletrodo de trabalho: HMDE, Eletrodo de referência: Ag/AgCl (KCl 3 mol L^{-1}).

Os parâmetros voltamétricos e as condições experimentais, otimizadas em ensaios prévios, para a determinação de metabólitos secundários totais por DPV com o HMDE, utilizando-se a daidzeína e a daidzina, são mostrados na Tabela 26. O estudo da repetibilidade de resposta do HMDE para a quantificação de metabólitos secundários totais apresentou RSD menor que 2,0% ($n = 10$).

Tabela 26. Parâmetros voltamétricos e condições experimentais otimizadas para a determinação de metabólitos secundários totais por meio da daidzeína e daidzina, utilizando-se o HMDE com a DPV

Parâmetros	Daidzeína	Daidzina
Eletrólito suporte e pH	Tampão fosfato pH 3,0	Tampão fosfato pH 3,0
Amplitude de pulso / mV	50	50
$\nu / \text{mV s}^{-1}$	50	50

Após a otimização das condições experimentais e do estudo da repetibilidade de resposta do HMDE para a quantificação de metabólitos secundários totais, empregando-se a DPV, foram obtidos os voltamogramas de pulso diferencial, para a daidzeína em tampão fosfato pH 3,0 (Figura 49). No

intervalo de concentração de $1,0 \times 10^{-6}$ a $7,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, a curva analítica apresentou a equação I_{pc} (nA) = -1,956 + $7,6 \times 10^6$ [Daidzeína], com coeficiente de correlação de 0,997 e LD $7,6 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ e LQ $2,5 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹.

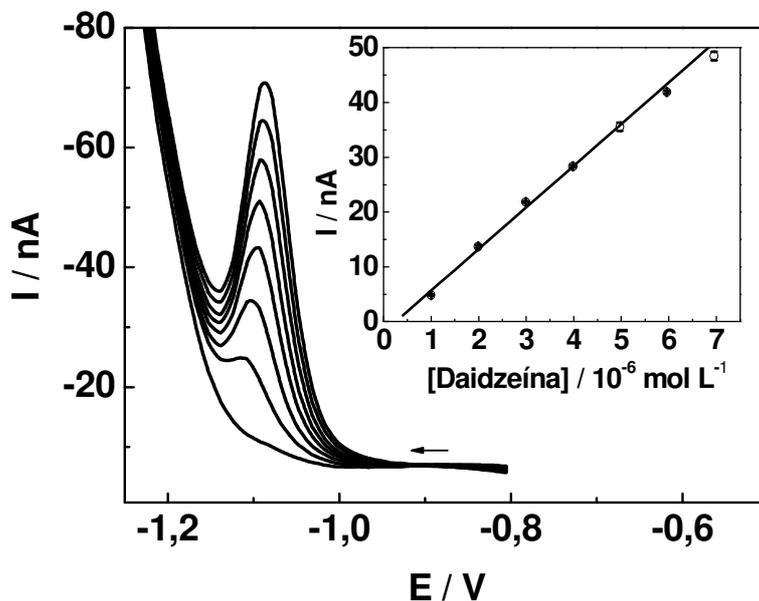


Figura 49. Voltamogramas de pulso diferencial em 10 mL de tampão fosfato pH 3,0 com adições sucessivas de 10 μ L de daidzeína $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. E_i = -0,700 V; E_f = -1,250 V, amplitude de pulso = 50 mV, ν = 50 mV s⁻¹, Eletrodo de trabalho: HMDE, Eletrodo de referência: Ag/AgCl (3 mol L⁻¹).

A curva analítica (Figura 50), obtida pelo método de adição de padrão, para a daidzina, em tampão fosfato pH 3,0, apresentou a equação I_{pc} (nA) = -3,335 + $1,1 \times 10^7$ [Daidzina] ($r = 0,998$) e linearidade entre $1,0 \times 10^{-6}$ a $3,5 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ com LD $5,7 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ e LQ $1,9 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹.

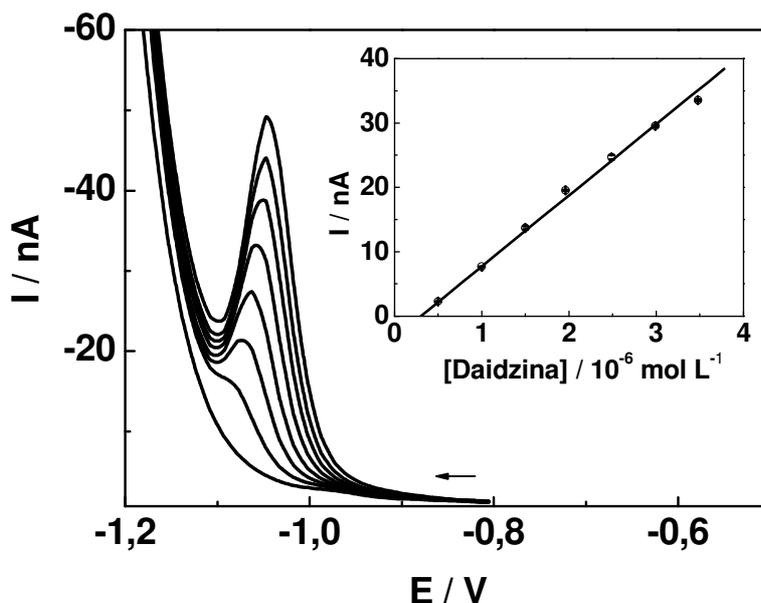


Figura 50. Voltamogramas de pulso diferencial em 10 mL de tampão fosfato pH 3,0 com adições sucessivas de 5 μL de daidzina $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. $E_i = -0,700 \text{ V}$; $E_f = -1,250 \text{ V}$, amplitude de pulso = 50 mV, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, Eletrodo de trabalho: HMDE, Eletrodo de referência: Ag/AgCl (3 mol L^{-1}).

Os métodos voltamétricos desenvolvidos utilizando-se o HMDE e a DPV e os metabólitos daidzeína e daidzina apresentaram boa sensibilidade e repetibilidade e baixos limites de detecção e quantificação, possibilitando a sua aplicação no estudo de cultivares de soja da Embrapa quanto à detecção e quantificação de metabólitos secundários totais.

3.3 Determinação de metabólitos secundários utilizando-se a DPV e o eletrodo de Grafite

Após o desenvolvimento de métodos voltamétricos empregando-se o HMDE e a DPV, foi verificada também a possibilidade de aplicação do eletrodo de grafite e da DPV no desenvolvimento de métodos analíticos para a análise de metabólitos secundários em amostras de soja. Nos voltamogramas de pulso diferencial obtidos para os metabólitos secundários (Figura 51), utilizando-se o eletrodo de grafite e a DPV, observam-se sinais entre 0,700 e 0,800 V que correspondem à oxidação das isoflavonas e um sinal em 0,560 V, correspondente a oxidação da rutina. Como os potenciais de oxidação das isoflavonas são próximos e apenas a oxidação da rutina ocorre em um potencial diferente, não é possível fazer

a determinação simultânea dos metabólitos estudados. No entanto, estes sinais poderão ser utilizados na detecção e quantificação de metabólitos secundários totais, por meio da determinação de isoflavonas totais mais rutina, em amostras de soja, empregando-se a DPV. Para o desenvolvimento de métodos analíticos foram selecionados os metabólitos daidzeína, genisteína e rutina. Foram escolhidas as duas isoflavonas que apresentaram os melhores perfis voltamétricos e os maiores sinais de oxidação no eletrodo de grafite para o desenvolvimento dos métodos analíticos; com o objetivo de verificar qual das duas oferece os melhores valores de LD, LQ e recuperação quando os métodos desenvolvidos forem aplicados na análise de isoflavonas ou metabólitos secundários totais.

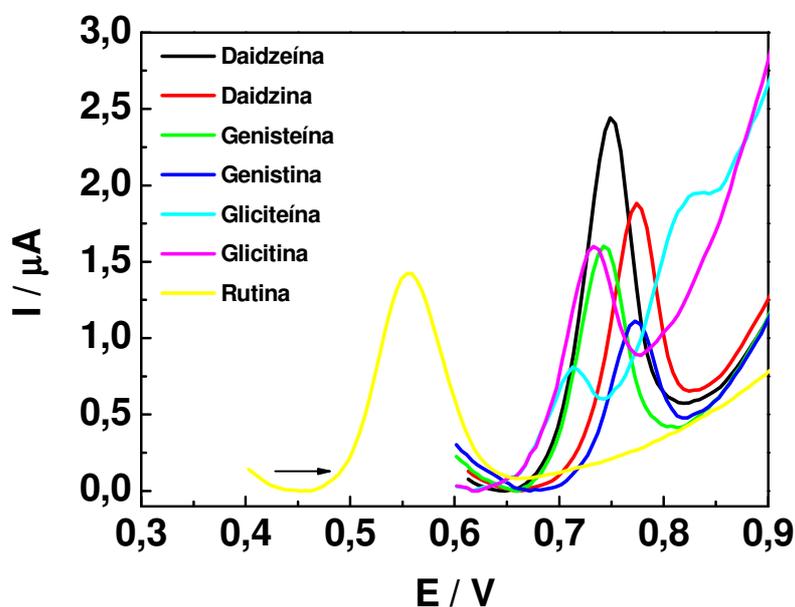


Figura 51. Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para o metabólito secundário $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em 10 mL de tampão fosfato pH 3,0. $E_i = 0,200 \text{ V}$; $E_f = 1,000 \text{ V}$, amplitude de pulso = 50 mV, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, Eletrodo de trabalho: Grafite, Eletrodo de referência: Ag/AgCl (KCl 3 mol L^{-1}).

Os parâmetros voltamétricos e as condições experimentais otimizadas, em ensaios prévios, para a determinação de metabólitos secundários totais utilizando-se o eletrodo de grafite, a DPV e os metabólitos secundários daidzeína, genisteína e rutina são mostrados na Tabela 27. O estudo da repetibilidade de resposta do eletrodo de grafite para a quantificação de metabólitos secundários totais apresentou RSD menor que 2,0% ($n = 10$).

Tabela 27. Parâmetros voltamétricos e condições experimentais otimizadas para a determinação de metabólitos secundários totais por meio da daidzeína, genisteína e rutina, utilizando-se o eletrodo de grafite com a DPV

Parâmetros	Daidzeína e Genisteína	Rutina
Eletrólito suporte e pH	Tampão fosfato pH 3,0	Tampão fosfato pH 4,0
Amplitude de pulso / mV	50	50
ν / mV s ⁻¹	50	5

Após a otimização das condições experimentais para o eletrodo de grafite e do estudo da repetibilidade de resposta do eletrodo de grafite para a quantificação de metabólitos secundários totais, utilizando-se a técnica DPV, foram obtidas as curvas analíticas para os metabólitos secundários daidzeína, genisteína e rutina.

A Figura 52 apresenta os voltamogramas de pulso diferencial obtidos para a daidzeína no intervalo de concentração de $4,0 \times 10^{-6}$ a $2,7 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e equação $I_{pa}(\mu A) = 0,518 + 1,4 \times 10^5 [Daidzeína]$, com coeficiente de correlação de 0,997 e LD $1,6 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e LQ $5,1 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹.

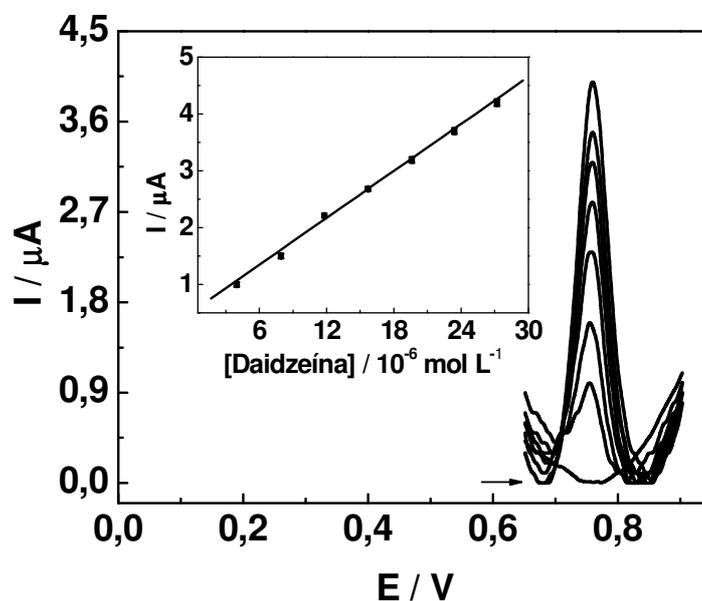


Figura 52. Voltamogramas de pulso diferencial em 10 mL de tampão fosfato pH 3,0 com adições sucessivas de 40 μL de daidzeína $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. $E_i = 0,400$ V; $E_f = 0,900$ V, amplitude de pulso = 50 mV, $\nu = 50$ mV s⁻¹, Eletrodo de trabalho: Grafite, Eletrodo de referência: Ag/AgCl (3 mol L⁻¹).

Na Figura 53 são mostrados os voltamogramas de pulso diferencial obtidos para a genisteína no intervalo de concentração de $4,0 \times 10^{-6}$ a $3,1 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e equação $I_{pa}(\mu A) = -0,070 + 9,2 \times 10^4 [\text{Genisteína}]$, com coeficiente de correlação de 0,998 e LD $1,4 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e LQ $4,8 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹.

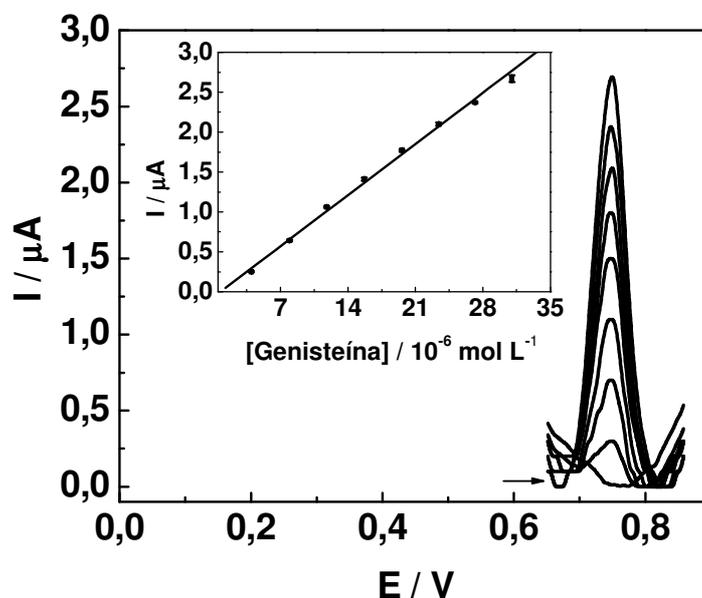


Figura 53. Voltamogramas de pulso diferencial em 10 mL de tampão fosfato pH 3,0 com adições sucessivas de 40 μL de genisteína $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. $E_i = 0,400$ V; $E_f = 0,900$ V, amplitude de pulso = 50 mV, $v = 50$ mV s⁻¹, Eletrodo de trabalho: Grafite, Eletrodo de referência: Ag/AgCl (3 mol L⁻¹).

A curva analítica (Figura 54), para a rutina, apresentou a equação $I_{pa}(\mu A) = -0,783 + 9,4 \times 10^5 [\text{Rutina}]$ ($r = 0,999$) e linearidade entre $2,0 \times 10^{-6}$ a $2,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, com LD $1,5 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e LQ $5,1 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹.

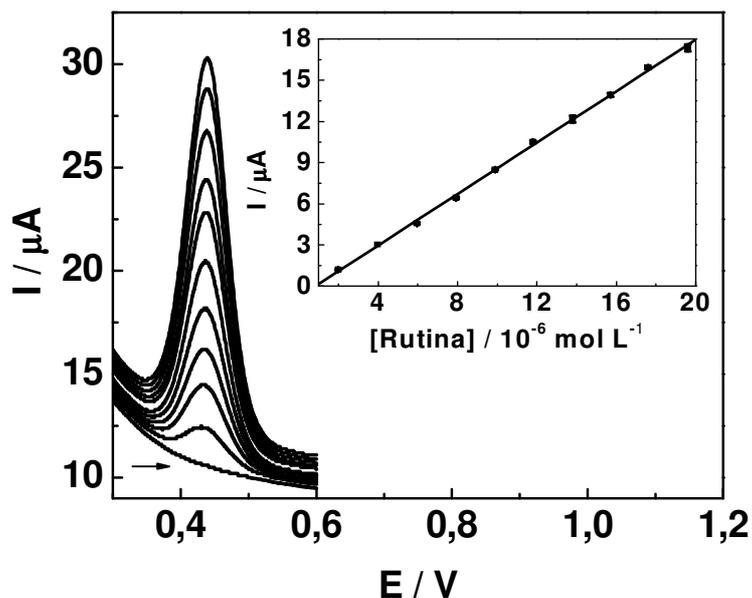


Figura 54. Voltamogramas de pulso diferencial em 10 mL de tampão fosfato pH 4,0 com adições sucessivas de 20 μL de rutina $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. $E_i = 0,100 \text{ V}$; $E_f = 0,600 \text{ V}$, amplitude de pulso = 50 mV, $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$, Eletrodo de trabalho: Grafite, Eletrodo de referência: Ag/AgCl (3 mol L^{-1}).

Os métodos eletroanalíticos desenvolvidos para a determinação de metabólitos secundários totais (isoflavonas totais mais rutina) por meio da daidzeína, genisteína e rutina utilizando o eletrodo de grafite e a DPV apresentaram boa sensibilidade e repetibilidade e baixos limites de detecção e quantificação, possibilitando suas aplicações no estudo de cultivares de soja da Embrapa quanto à identificação e quantificação de metabólitos secundários totais.

3.4 Determinação de metabólitos secundários utilizando-se a DPV ou a DPAdSV e o eletrodo de GC

Também foi verificada a possibilidade de aplicação do eletrodo de GC e da DPV no desenvolvimento de métodos analíticos para a análise de metabólitos secundários em amostras de soja. Nos voltamogramas de pulso diferencial obtidos para os metabólitos secundários (Figura 55), utilizando-se o eletrodo de GC e a DPV, observam-se sinais entre 0,500 e 0,600 V que são correspondentes à oxidação das isoflavonas e um sinal em 0,300 V, correspondente a oxidação da rutina. Como os potenciais de oxidação das isoflavonas são próximos e apenas a oxidação da rutina ocorre em um potencial diferente, não é possível fazer a

determinação simultânea dos metabólitos estudados. No entanto, estes sinais poderão ser utilizados na detecção e quantificação de metabólitos secundários totais em amostras de soja, por meio da determinação de isoflavonas totais mais rotina, empregando-se a DPV. Para o desenvolvimento de método analítico foram selecionados os metabólitos daidzeína, genisteína e rutina. Foram escolhidas as duas isoflavonas que apresentaram os melhores perfis voltamétricos e os maiores sinais de oxidação no eletrodo de GC para o desenvolvimento dos métodos analíticos; com o objetivo de verificar qual delas oferece os melhores valores de LD, LQ e recuperação quando os métodos desenvolvidos forem aplicados na análise de isoflavonas ou metabólitos secundários totais.

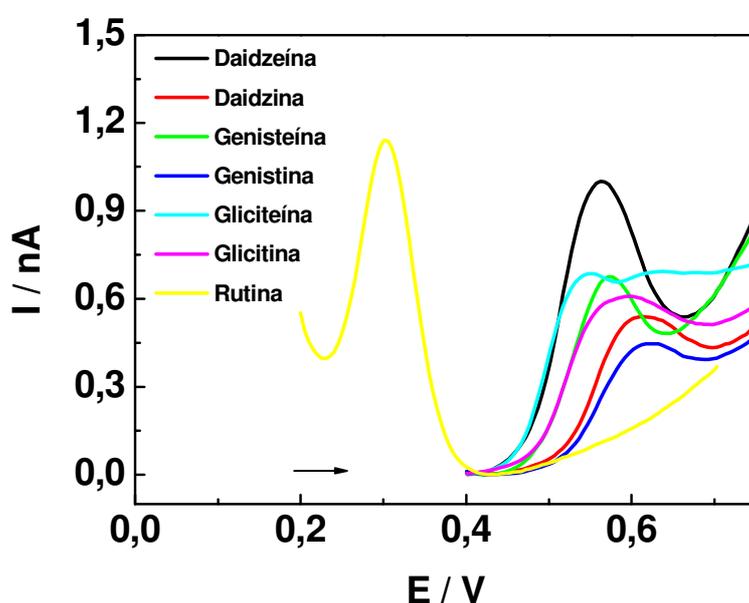


Figura 55. Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para o metabólito secundário $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em 10 mL de tampão fosfato pH 6,0. $E_i = 0,200 \text{ V}$; $E_f = 1,000 \text{ V}$, amplitude de pulso = 50 mV, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, Eletrodo de trabalho: GC, Eletrodo de referência: Ag/AgCl ($\text{KCl } 3 \text{ mol L}^{-1}$).

Os parâmetros voltamétricos e as condições experimentais, otimizadas em ensaios prévios, para a determinação de metabólitos secundários totais, utilizando-se o eletrodo de GC, a DPV e os metabólitos secundários daidzeína, genisteína e rutina, são mostrados na Tabela 28. O estudo da repetibilidade de resposta do eletrodo de GC para a quantificação de metabólitos secundários totais apresentou RSD menor que 1,0% ($n = 10$).

Tabela 28. Parâmetros voltamétricos e condições experimentais otimizadas para a determinação de metabólitos secundários totais por meio da daidzeína, genisteína e rutina, utilizando-se o eletrodo de GC com a DPV

Parâmetros	Daidzeína e Genisteína	Rutina
Eletrólito suporte e pH	Tampão fosfato pH 6,0	Tampão fosfato pH 6,0
Amplitude de pulso / mV	50	50
v / mV s ⁻¹	50	5

Após a otimização das condições experimentais para o eletrodo de GC e do estudo da repetibilidade de resposta do eletrodo de GC para a quantificação de metabólitos secundários totais, utilizando-se a técnica DPV, foram obtidas as curvas analíticas para os metabólitos secundários daidzeína, genisteína e rutina.

A Figura 56 apresenta os voltamogramas de pulso diferencial obtidos para a daidzeína no intervalo de concentração de $1,0 \times 10^{-6}$ a $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e equação $I_{pa}(nA) = -6,475 + 7,5 \times 10^7 [Daidzeína]$, com coeficiente de correlação de 0,998 e LD $1,3 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e LQ $4,3 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹.

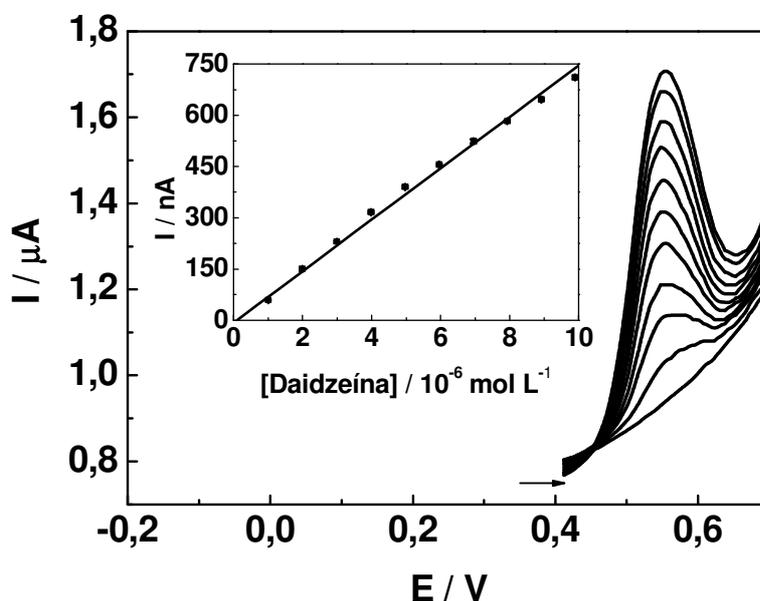


Figura 56. Voltamogramas de pulso diferencial em 10 mL de tampão fosfato pH 6,0 com adições sucessivas de 10 μL de daidzeína $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. $E_i = 0,200$ V; $E_f = 1,000$ V, amplitude de pulso = 50 mV, $v = 50$ mV s⁻¹, Eletrodo de trabalho: GC, Eletrodo de referência: Ag/AgCl (3 mol L⁻¹).

Na Figura 57 são mostrados os voltamogramas de pulso diferencial obtidos para a genisteína no intervalo de concentração de $1,0 \times 10^{-6}$ a $1,0 \times 10^{-5}$

mol L⁻¹ e equação $I_{pa}(nA) = -8,388 + 5,7 \times 10^7 [\text{Genisteína}]$, com coeficiente de correlação de 0,998 e LD $1,2 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e LQ $3,9 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹.

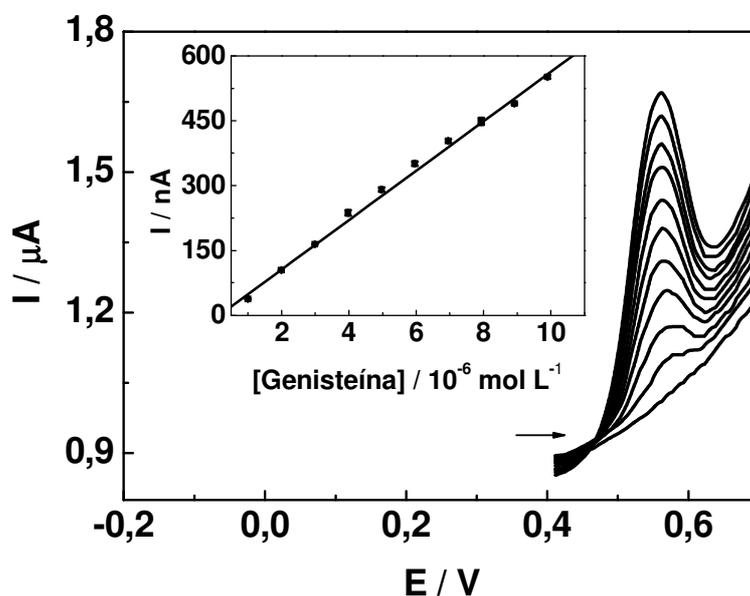


Figura 57. Voltamogramas de pulso diferencial em 10 mL de tampão fosfato pH 6,0 com adições sucessivas de 10 μL de genisteína $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. $E_i = 0,200$ V; $E_f = 1,000$ V, amplitude de pulso = 50 mV, $\nu = 50$ mV s⁻¹, Eletrodo de trabalho: GC, Eletrodo de referência: Ag/AgCl (3 mol L⁻¹).

A curva analítica (Figura 58), para a rutina, apresentou a equação $I_{pa}(\mu A) = -0,485 + 3,2 \times 10^5 [\text{Rutina}]$ ($r = 0,999$) e linearidade entre $2,0 \times 10^{-6}$ a $1,4 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, com LD $1,4 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ e LQ $4,8 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹.

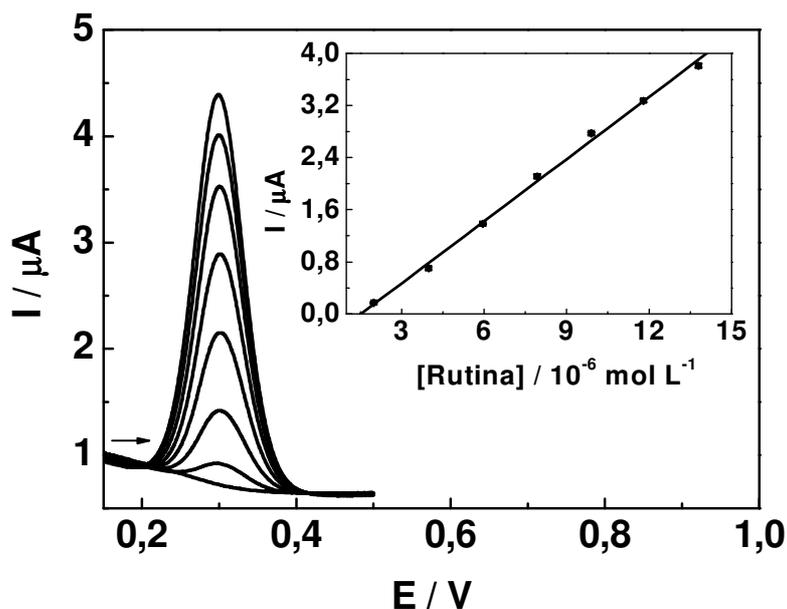


Figura 58. Voltamogramas de pulso diferencial em 10 mL de tampão fosfato pH 6,0 com adições sucessivas de 20 μL de rutina $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. $E_i = 0,100 \text{ V}$; $E_f = 0,500 \text{ V}$, amplitude de pulso = 50 mV, $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$, Eletrodo de trabalho: GC, Eletrodo de referência: Ag/AgCl (3 mol L^{-1}).

Os métodos voltamétricos desenvolvidos, utilizando-se o eletrodo de GC e a DPV e os metabólitos daidzeína, genisteína e rutina, apresentaram boa sensibilidade e repetibilidade e baixos limites de detecção e quantificação; possibilitando a sua aplicação no estudo de cultivares de soja da Embrapa quanto à detecção e quantificação de metabólitos secundários totais.

Com o objetivo de obter limites de detecção da ordem de $10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$, foram realizados ensaios com metabólitos secundários utilizando-se a técnica DPAdSV e o eletrodo de GC. Com exceção da genisteína, não foi possível utilizar a DPAdSV para o desenvolvimento de método analítico para a detecção e quantificação de metabólitos secundários em amostras de soja, devido a forte adsorção desses metabólitos no eletrodo de GC, dificultando assim a restauração da superfície do eletrodo e como consequência uma corrente de oxidação não reproduzível.

Os parâmetros voltamétricos e as condições experimentais, otimizadas em ensaios prévios, para a determinação de genisteína utilizando-se a DPAdSV com o eletrodo de GC, são mostrados na Tabela 29. O estudo da repetibilidade de resposta do eletrodo de GC, empregando-se a DPAdSV, para a quantificação de metabólitos secundários totais apresentou RSD menor que 1,0% ($n = 10$).

Tabela 29. Parâmetros voltamétricos e condições experimentais otimizadas para a determinação de genisteína, utilizando-se a DPAdSV com o eletrodo de GC

Parâmetros	
Eletrólito suporte e pH	Tampão fosfato pH 4,0
E_{ac} / V	0,400
Amplitude de pulso / mV	50
$v / mV s^{-1}$	50
t_{ac} / s	180
Eletrodo de referência: Ag/AgCl(3 mol L ⁻¹)	

Após a otimização das condições experimentais e do estudo da repetibilidade de resposta do eletrodo de GC para a quantificação de genisteína, empregando-se o eletrodo de GC e a DPAdSV, foram obtidos os voltamogramas adsorptivos de pulso diferencial, para a genisteína em tampão fosfato pH 4 (Figura 59). No intervalo de concentração de $5,0 \times 10^{-8}$ a $3,5 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, a curva analítica apresentou a equação $I_{pa}(\mu A) = -0,022 + 3,4 \times 10^6 [Genisteína]$, com coeficiente de correlação de 0,998 e limite de detecção de $3,9 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹ e limite de quantificação de $1,3 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹.

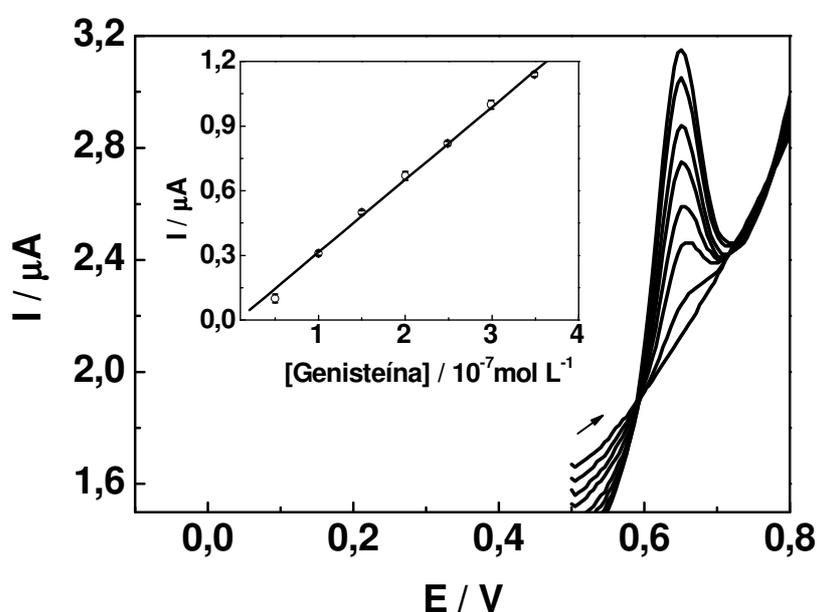


Figura 59. Voltamogramas adsorptivos de pulso diferencial em 10 mL de tampão fosfato pH 4,0 com adições sucessivas de 5 μ L de genisteína $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. $E_{ac} = 0,400$ V, $t_{ac} = 180$ s, $E_i = 0,500$ V; $E_f = 0,800$ V, amplitude de pulso = 50 mV, $v = 50$ mV s⁻¹, Eletrodo de trabalho: GC, Eletrodo de referência; Ag/AgCl (3 mol L⁻¹).

O método analítico desenvolvido para a determinação de genisteína utilizando-se o eletrodo de GC e a DPAdSV, apresentou boa sensibilidade e baixos limites de detecção e quantificação, possibilitando a sua aplicação na determinação de metabólitos secundários totais em cultivares de soja da Embrapa. Este método será empregado na quantificação de isoflavonas totais se for necessário um limite de detecção da ordem de 10^{-9} mol L⁻¹.

3.5 Resumo dos métodos analíticos desenvolvidos para a determinação de metabólitos secundários

Algumas figuras analíticas de mérito dos métodos analíticos desenvolvidos para a determinação de metabólitos secundários totais (isoflavonas totais mais rutina) são mostradas na Tabela 30.

Tabela 30. Figuras analíticas de mérito dos métodos analíticos desenvolvidos para a determinação de metabólitos secundários

Eletrodo	Técnica	Metabólito secundário	Faixa Linear (mol L ⁻¹)	r	LD (mol L ⁻¹)
HMDE	DPCAdSV	Rutina	$2,0 \times 10^{-7}$ – $1,4 \times 10^{-6}$	0,999	$7,0 \times 10^{-9}$
HMDE	DPV	Daidzeína	$1,0 \times 10^{-6}$ – $7,0 \times 10^{-6}$	0,997	$7,6 \times 10^{-8}$
		Daidzina	$1,0 \times 10^{-6}$ – $3,5 \times 10^{-6}$	0,998	$5,7 \times 10^{-8}$
Grafite	DPV	Daidzeína	$4,0 \times 10^{-6}$ – $2,7 \times 10^{-5}$	0,997	$1,6 \times 10^{-7}$
		Genisteína	$4,0 \times 10^{-6}$ – $3,1 \times 10^{-5}$	0,998	$1,4 \times 10^{-7}$
		Rutina	$2,0 \times 10^{-6}$ – $2,0 \times 10^{-5}$	0,999	$1,5 \times 10^{-7}$
GC	DPV	Daidzeína	$1,0 \times 10^{-6}$ – $1,0 \times 10^{-5}$	0,998	$1,3 \times 10^{-7}$
		Genisteína	$1,0 \times 10^{-6}$ – $1,0 \times 10^{-5}$	0,998	$1,2 \times 10^{-7}$
		Rutina	$2,0 \times 10^{-6}$ – $1,4 \times 10^{-5}$	0,999	$1,4 \times 10^{-8}$
	DPAdSV	Genisteína	$5,0 \times 10^{-8}$ – $3,5 \times 10^{-7}$	0,998	$3,9 \times 10^{-9}$
GPU ⁹⁵	DPV	Daidzeína	$1,0 \times 10^{-6}$ – $8,4 \times 10^{-6}$	0,999	$1,3 \times 10^{-7}$
		Genisteína	$1,0 \times 10^{-6}$ – $7,5 \times 10^{-6}$	0,999	$2,7 \times 10^{-7}$
		Rutina	$5,0 \times 10^{-7}$ – $7,5 \times 10^{-6}$	0,999	$8,2 \times 10^{-8}$

Observa-se que o método desenvolvido para a determinação de rutina, por meio do complexo Cu^{2+} -rutina, empregando-se a DPAdSV com o HMDE, apresentou um limite de detecção menor que os obtidos nos demais métodos, onde foram utilizados a DPV e eletrodos sólidos. Comparando os eletrodos de grafite e de GC, os melhores resultados para a rutina foram obtidos empregando-se o eletrodo de GC com a DPV. Para a determinação de rutina em amostras de soja, o método desenvolvido empregando-se a DPAdSV com o HMDE, foi utilizado. Na determinação de isoflavonas totais em amostras de soja e amostras preparadas, os métodos desenvolvidos, utilizando-se a DPV com o HMDE e eletrodo de GC, foram empregados. Estes métodos foram selecionados, pois apresentaram os menores valores de limite de detecção. Estes métodos foram avaliados para verificar qual dos dois forneceria os melhores resultados na determinação de metabólitos totais (isoflavonas totais mais rutina) em amostras de soja. Se na determinação de isoflavonas totais em amostras de grãos e folhas de soja, fornecidas pela Embrapa Soja, for necessário um limite de detecção da ordem de 10^{-9} mol L^{-1} , a técnica de DPAdSV com o eletrodo de GC poderá ser empregada. Os limites de detecção obtidos empregando-se a técnica de HPLC, com diferentes detectores, na determinação de isoflavonas totais, são da ordem de 10^{-7} a 10^{-9} mol L^{-1} .⁴⁶⁻⁴⁸ Estes valores são semelhantes aos obtidos nos métodos voltamétricos desenvolvidos neste trabalho, indicando a viabilidade de aplicação do métodos desenvolvidos na determinação de isoflavonas totais em amostras de soja.

Uma das vantagens das técnicas voltamétricas é a possibilidade de determinação simultânea e precisa de diversos analitos em uma única varredura. No entanto, para as isoflavonas estudadas, não é possível fazer esta determinação simultânea; pois, estes compostos apresentaram sinais de oxidação ou redução em potenciais próximos no HMDE, no eletrodo de grafite e no eletrodo de GC. Entretanto, estes sinais das isoflavonas poderão ser utilizados na detecção e quantificação de isoflavonas totais em amostras de soja, empregando-se a DPV, com custos e tempos reduzidos, quando comparados aos métodos convencionais (cromatografia e espectrometria de massas). Além disso, os resultados obtidos poderão ser aplicados em estudos agrônômicos e de ecologia química, pois nestes casos é necessária a determinação de metabólitos secundários totais (isoflavonas mais rutina). Havendo a necessidade de separação dos sinais de oxidação ou redução das isoflavonas nos eletrodos estudados, para a detecção e quantificação

dessas espécies, modificações nas superfícies dos eletrodos poderão ser realizadas ou ainda a utilização do tratamento quimiométrico dos sinais como alternativa.

4. Análise de amostras preparadas de isoflavonas

Na Tabela 31 são mostrados os resultados obtidos nas análises das quatro amostras preparadas de isoflavonas ($5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), empregando-se o eletrodo de GC ou HMDE e a DPV.

Tabela 31. Resultados obtidos nas análises das quatro amostras preparadas de isoflavonas

HMDE e DPV			
Amostra preparada		Erro Relativo ^a (%)	Recuperação (%)
1	Daidzeína	54,90	97,30–117,04
	Daidzina	-31,74	94,93–112,86
2	Daidzeína	23,59	95,54–114,32
	Daidzina	-54,33	94,68–118,31
3	Daidzeína	-13,55	97,70–119,96
	Daidzina	-69,16	92,92–106,71
4	Daidzeína	-55,82	96,69–115,59
	Daidzina	- ^b	- ^b
Eletrodo de GC e DPV			
Amostra preparada		Erro Relativo ^a (%)	Recuperação (%)
1	Daidzeína	-14,26	95,89–109,67
	Genisteína	-16,43	96,70–116,57
2	Daidzeína	-28,52	97,37–104,04
	Genisteína	-29,72	95,97–105,44
3	Daidzeína	-3,14	95,09–118,08
	Genisteína	-7,47	95,89–109,67
4	Daidzeína	24,70	96,80–109,88
	Genisteína	17,84	95,08–115,18

^a Erro relativo em relação a concentração de $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de isoflavonas totais.

^b Não foi possível fazer a quantificação de isoflavonas totais (observou-se um deslocamento do pico de redução do padrão de daidzina adicionado na amostra)

A amostra preparada 1 apresenta em sua composição concentrações iguais de seis isoflavonas (daidzeína, daidzina, genisteína, genistina, gliciteína e gicitina) encontradas em amostras de soja. A amostra preparada 2 apresenta um teor maior das isoflavonas glicosiladas genistina e daidzina, possuindo uma composição semelhante à encontrada em grãos de soja. A amostra preparada 3 apresenta um teor maior das isoflavonas agliconas genisteína e daidzeína, composição semelhante à encontrada em produtos à base de soja fermentados (ex: comprimidos). A amostra preparada 4 apresenta em sua composição apenas as isoflavonas agliconas (daidzeína, genisteína e gliciteína), composição semelhante à encontrada em amostras de soja após o processo de hidrólise ácida.

Os erros relativos obtidos nas análises das quatro amostras preparadas de isoflavonas, empregando-se o HMDE, foram maiores que os obtidos com o eletrodo de GC. Portanto, para os estudos seguintes, foi utilizando o eletrodo de GC, na identificação e quantificação de isoflavonas totais em amostras de soja.

Nas análises das amostras preparadas de isoflavonas, utilizando-se o eletrodo de GC, observa-se que os menores valores de erros relativos foram obtidos na amostra preparada 3, cuja composição é semelhante a produtos à base de soja fermentados. Estes resultados indicam a necessidade do processo de hidrólise ácida na preparação das amostras de grãos de soja, com o objetivo de converter as isoflavonas glicosiladas em suas formas agliconas, minimizando a interferência das formas glicosiladas na quantificação de isoflavonas totais. Lembrando que este estudo foi realizado em amostras preparadas e que as matrizes à base de soja são mais complexas e poderão apresentar outros interferentes, como, por exemplo, os ácidos fenólicos. Como os sinais de oxidação e redução das isoflavonas, no HMDE e no eletrodo de GC, podem sofrer uma influência de interferentes em amostras à base de soja, é necessária uma preparação da amostra mais complexa, como por exemplo uma extração em fase sólida, dificultando a adaptação dos métodos desenvolvidos neste trabalho ao campo.

5. Análise de comprimidos à base de extrato soja

O uso da mesa agitadora (1 hora de extração) e do ultrassom (20 minutos de extração) foram comparados durante a preparação dos comprimidos à base de

extrato de soja. Verificou-se que ambos apresentaram a mesma eficiência de extração de isoflavonas, portanto, optou-se pelo emprego do ultrassom devido ao menor tempo de extração. Verificou-se ainda que entre os tempos de extração no ultrassom testados (5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos), o de 20 minutos foi o que apresentou uma maior eficiência na extração de isoflavonas. Dos solventes testados na concentração de 70 %, o etanol foi o que apresentou a maior eficiência na extração, no entanto, ao comparar as diferentes concentrações de etanol (25%, 50%, 70% e 99,5%), verificou-se que o etanol 99,5 % foi o que apresentou a maior eficiência na extração de isoflavonas.

Após a otimização da extração de isoflavonas, o método desenvolvido, empregando-se o eletrodo de GC e a DPV, foi utilizado na determinação das isoflavonas totais nos comprimidos à base de extrato de soja. A concentração média de metabólitos secundários totais de soja na formulação farmacêutica é mostrada na Tabela 32. Foi obtido, empregando-se o método desenvolvido, um erro relativo menor que 10% em relação à composição indicada no rótulo e a recuperação de daidzeína ou genisteína adicionada indica ausência de efeito de matriz.

Tabela 32. Determinação das isoflavonas totais em comprimidos à base de extrato de soja

Padrão	Concentração mg/comprimido	Erro Relativo^a (%)	Recuperação (%)
Daidzeína	30,69 ± 2,44	2,30	95,15–110,06
Genisteína	32,20 ± 0,77	7,33	94,51–108,28

^a Erro relativo em relação à composição indicada no rótulo (30 mg comprimido⁻¹).

Os resultados obtidos mostram a viabilidade de aplicação do método desenvolvido na determinação das isoflavonas totais, utilizando-se o eletrodo de GC e a DPV; pois apresentou erro relativo baixo e os valores de recuperação indicam ausência de efeito de matriz, possibilitando também a sua aplicação em um estudo adicional em cultivares de soja da Embrapa quanto à identificação e quantificação de metabólitos secundários totais.

6. Análise de folhas e grãos de soja

O método desenvolvido empregando-se a DPCAdSV com o HMDE juntamente com o de adição de padrão, foi utilizado na determinação de rutina em quatro cultivares de soja. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 33. Observa-se que nos grãos das cultivares P98R62, BRQ 96-3065 e Dowling não foi detectada rutina. Este resultado já era esperado, pois em grãos de soja os principais metabólitos secundários presentes são a genistina e daidzina.⁴⁴ Também não foi detectada rutina nas folhas da cultivar Dowling. No entanto, para as folhas da cultivar IAC 100, este flavonóide foi detectado com concentração média de 0,197 mg g⁻¹. Este valor foi inferior ao encontrado por Piubelli e colaboradores,¹² utilizando HPLC na determinação de rutina em folhas de soja do mesmo genótipo (IAC 100), produzidas em casa de vegetação (T = 23±2 °C, UR = 78%) na Região Sul do Brasil (temperatura média local de 23 °C). No entanto, esta diferença pode ser atribuída às altas temperaturas da Região Centro-Oeste do Brasil (temperatura média de 27 °C, reproduzida na casa de vegetação) durante o desenvolvimento dos grãos, pois a temperatura foi demonstrada como sendo um fator importante na determinação dos níveis de metabólitos secundários em grãos de soja.¹⁰⁰ Carrão-Panizzi e colaboradores¹³ também observaram uma variação na concentração de metabólitos secundários entre cultivares de soja produzidas em diferentes regiões do país. A recuperação de rutina adicionada variou de 94 a 105%, indicando ausência de efeito de matriz.

Tabela 33. Determinação de rutina em amostras de grãos e folhas de soja

Amostras de soja	Rutina encontrada^a (mg g⁻¹)	Rutina reportada na literatura (mg g⁻¹)
P98R62 (Grãos)	n.d. ^b	n.r. ^c
BRQ 96-3065 (Grãos)	n.d.	n.r.
Dowling (Grãos)	n.d.	n.r.
Dowling (Folhas)	n.d.	n.r.
IAC 100 (Folhas)	0,197±0,038	0,972±0,082 ^d

^a Valores médios para três determinações independentes.

^b Não detectada.

^c Não reportado na literatura.

^d Piubelli e colaboradores.¹²

Limite de detecção (LD) = 4,270 ng mL⁻¹.

7. Estudos preliminares de determinação de isoflavonas totais em grãos de soja da cultivar Flora, utilizando-se a DPV e o eletrodo de GC

Nos estudos preliminares de determinação de isoflavonas totais em grãos de soja da cultivar Flora, empregando-se a DPV, o eletrodo de GC e a genisteína como padrão, foi realizada uma extração em fase sólida, após o tratamento inicial da amostra descrito na Figura 39, para a remoção dos interferentes presentes na amostra. Após a extração, utilizando-se o método de adição de padrão (Figura 60), obteve-se uma concentração média de isoflavonas totais de $0,184 \text{ mg g}^{-1}$. Esse valor é próximo ao encontrado por Ribeiro e colaboradores,¹⁴ utilizando-se a HPLC na determinação de isoflavonas totais em grãos de soja de três genótipos (BRS 183, BRS 212 e BRS 233), cultivados em Londrina (PR). A recuperação de genisteína adicionada variou de 97 a 107%, indicando ausência de efeito de matriz. Apesar de ser apenas um resultado preliminar, pois é necessária a otimização da extração em fase sólida e a comparação dos resultados com o método oficial da AOAC,⁵² o valor obtido indica a viabilidade de aplicação do método desenvolvido, baseado no uso da SPE, DPV e eletrodo de GC, na determinação de isoflavonas totais, após a extração em fase sólida, em grãos e folhas de diferentes cultivares de soja, em diferentes estádios de crescimento.

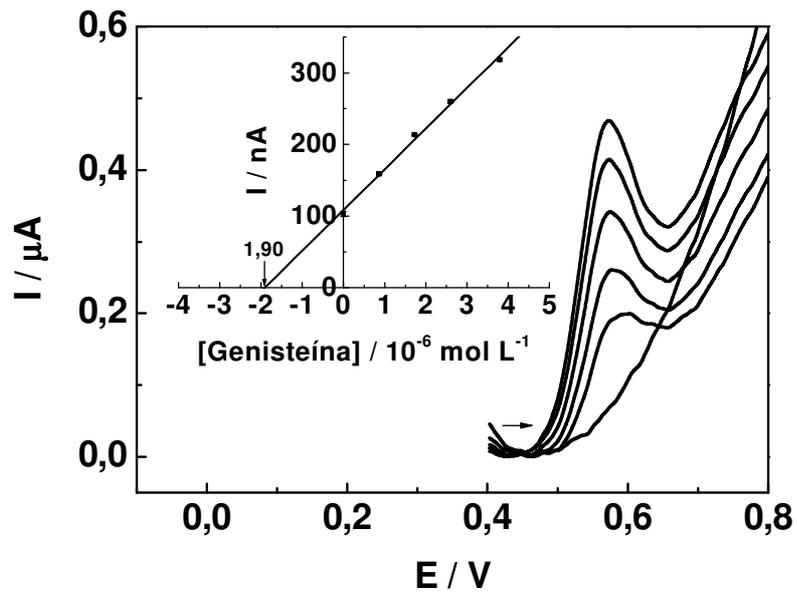


Figura 60. Voltamogramas de pulso diferencial em 10 mL de tampão fosfato pH 6,0 com 1500 μL da amostra de grão de soja da cultivar Flora com adições sucessivas de 10 μL de genisteína $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. $E_i = 0,200 \text{ V}$; $E_f = 1,000 \text{ V}$, amplitude de pulso = 50 mV, $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$, Eletrodo de trabalho: GC, Eletrodo de referência: Ag/AgCl (3 mol L^{-1}).

V – CONCLUSÃO

No estudo do processo de oxidação/redução, utilizando-se a CV, das isoflavonas no eletrodo de GC foram observados picos irreversíveis, correspondentes a oxidação do 4'-hidróxi do anel B. Para a rotina no eletrodo de GC, observou-se um pico reversível, correspondente à oxidação do 3',4'- dihidróxi do anel B e um pico irreversível correspondente à oxidação do 5,7-dihidróxi do anel A. No estudo do processo de oxidação/redução do complexo Cu(II)-rutina no HMDE, utilizando-se a CV, foi observado um pico de redução quasi-reversível. O método voltamétrico, baseado na acumulação do complexo Cu²⁺-rutina no HMDE, foi aplicado com sucesso na determinação de rutina, em grãos e folhas de soja dos genótipos P98R6, BRQ 96-3065, IAC-100 e Dowling, por DPAdSV. Foi detectada a presença de rutina apenas nas folhas do genótipo IAC-100. Observou-se uma diferença entre o valor da concentração obtido neste trabalho (0,197 mg g⁻¹) e o valor reportado na literatura,¹² que pode ser justificado pela diferença de temperatura durante o cultivo das amostras de soja, uma foi obtida na Região Centro-Oeste e a outra na Região Sul do Brasil. Os métodos voltamétricos, baseados na oxidação das isoflavonas daidzeína e genisteína no eletrodo de GC, foram aplicados com sucesso na determinação de isoflavonas totais, em amostras preparadas, em comprimidos à base de extrato de soja e na cultivar Flora, por DPV. Nas análises das amostras preparadas, observou-se que os menores valores de erros relativos foram obtidos na amostra de composição semelhante aos produtos à base de soja fermentados. Esses resultados indicam a necessidade do processo de hidrólise ácida na preparação das amostras de grãos de soja, com o objetivo de minimizar a interferência das formas glicosiladas na quantificação de isoflavonas totais. Na análise dos comprimidos à base de extrato de soja, foi obtida uma concentração média de isoflavonas totais de 0,184 mg g⁻¹ e um erro relativo menor que 10% em relação à composição indicada no rótulo. Na análise preliminar dos grãos da cultivar Flora, obteve-se um valor médio de concentração de isoflavonas totais (0,184 mg g⁻¹) semelhante ao encontrado em grãos de soja de três genótipos cultivados em Londrina (PR).¹⁴ Os resultados obtidos com os métodos desenvolvidos neste trabalho deverão ser comparados com o método oficial da AOAC. Os métodos desenvolvidos representam uma alternativa para a determinação de metabólitos

secundários totais (isoflavonas mais rutina) em amostras de soja, pois possuem como vantagens a rapidez, a sensibilidade e o baixo custo quando comparados a métodos cromatográficos. Não foi possível aplicar os métodos desenvolvidos na determinação simultânea das isoflavonas. Entretanto, para uso nas áreas agrícolas e nutricional, a concentração de metabólitos secundários totais em cultivares de soja é o dado normalmente requerido pelos programas de melhoramento genético.

VI – PERSPECTIVAS FUTURAS

Como perspectivas futuras, pretende-se desenvolver os seguintes trabalhos: otimizar os processos de extração em fase sólida dos metabólitos secundários em cultivares de soja; determinar os metabólitos secundários totais presentes em plantas (parte aérea e raízes) e vagens de soja (26 cultivares de soja fornecidas pela Embrapa Soja); comparar os resultados obtidos com o método oficial da AOAC; separar os sinais de oxidação e redução da isoflavonas no HMDE e no eletrodo de GC, se for necessário, por meio de tratamento quimiométrico ou de modificações nas superfícies dos eletrodos. Os resultados obtidos na determinação de metabólitos secundários totais nas cultivares de soja, utilizando os métodos voltamétricos desenvolvidos neste trabalho, poderão ser aplicados no futuro no manejo integrado de pragas e em programas de melhoramento genético, contribuindo para a sustentabilidade de sistemas agrícolas baseados na produção de soja.

VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Portugal, A.D.; State of the soybean agribusiness in Brazil.p.39-45 In Kauffmann (ed) Proceedings of the World soybean Res. Conf. VI., Chicago, IL. 4-7 Aug. 1999. Superior printing, Champaign, IL, 1999.
2. Belore, L. C.; Ramiro, Z. A.; Faria, A. M.; Marino, C. A. B.; *Arq. Inst. Biol.* **2003**, *70*, 169.
3. Röse, U. S. R.; Manukian, A.; Heath, R. R.; Tumlinson, J. H.; *Plant Physiol.* **1996**, *111*, 487.
4. Moraes, C. M.; Lewis, W. J.; Paré, P. W.; Alborn, H. T.; Tumlinson, J. H.; *Nature* **1998**, *393*, 570.
5. Dicke, M.; Van Loon, J. J. A.; *Entomologia Experimentalis et Applicata* **2000**, *97*, 237.
6. Walling, L. L.; *J. Plant Growth Regul.* **2000**, *19*, 195.
7. Kessler, A.; Baldwin, I. T.; *Science* **2001**, *291*, 2141.
8. Kessler, A.; Baldwin, I. T.; *Annu. Rev. of Plant Biol.* **2002**, *53*, 299.
9. Moraes, M. C. B.; Laumann, R. A.; Pires, C. S.; Suji, E. R.; Borges, M.; *Entomologia Experimentalis Et Applicat* **2005**, *33*, 227.
10. Rodríguez-Saona, C.; Crafts-Brandner, S. J.; Williams, L. H.; Paré, P. I. W. *J. Chem. Ecol.* **2002**, *28*, 1733.
11. Collaza, S.; Fucarino, A.; Peri, E.; Salerno, G.; Conti, E.; Bin, F.; *J. Exp. Biology* **2004**, *207*, 47.
12. Piubelli, G. C.; Hoffmann-Campo, C. B.; Moscardi, F.; Miyakubo, S. H.; de Oliveira, M. C.; *J. Chem. Ecol.* **2005**, *31*, 1509.
13. Carrão-Panizzi, M. C.; Beléia, A. D. P.; Kitamura, K.; Oliveira, M. C. N.; *Pesq. Agropec. Bras.* **1999**, *34*, 1787.
14. Ribeiro, M. L. L.; Mandarino, J. M. G.; Carrão-Panizzi, M. C.; Oliveira, M. C. N.; Hoffmann-Campo, C. B.; Nepomuceno, A. L.; Ida, E. I.; *Journal of Food Composition and Analysis* **2007**, *20*, 19.
15. Dixon, R. A.; Steele, C. L.; *Trends In Plant Sci.* **1999**, *4*, 394.
16. Yunes, R. A.; Calixto, J. B.; *Plantas Medicinais sob a Ótica da Moderna Química Medicinal*, 1 ed., Chapecó, 2001.

17. Wagner, H.; Wiesenauer, M. *Fitoterapia: Fitofármacos, Farmacologia e Aplicações Clínicas*, 2 ed., Pharmabooks: São Paulo, 2006.
18. Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosman, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R.; *Farmacognosia*; 2 ed.; Editora da UFSC/ Editora da UFRGS: Porto Alegre/ Florianópolis, 2000.
19. Park, Y. K.; Aguiar, C. L.; Alencar, S. M.; Mascarenhas, H. A. A.; Scamparini, A. R. P.; *Cienc. Tecnol. Aliment.* **2001**, *3*, 156.
20. Carrão-Panizzi, M. C.; *Pesq. Agropec. Bras.* **1996**, *31*, 691.
21. Eldridge, A. C.; Kwolek, W. F.; *J. Agric. Food Chem.* **1983**, *31*, 394.
22. Carrão-Panizzi, M. C.; Kitamura, K.; Beléia, A. D. P.; Oliveira, M. C. N.; *Breed. Sci.* **1998**, *48*, 409.
23. Carrão-Panizzi, M. C.; Simão, A. S.; Kikuchi, A.; *Pesq. Agropec. Bras.* **2003**, *38*, 897.
24. Piubelli, G. C.; Hoffmann-Campo, C. B.; Arruda, I. C.; Lara, F. M.; *Neotrop. Entomol.* **2003**, *32*, 127.
25. Piubelli, G. C.; Hoffmann-Campo, C. B.; de Arruda, I. C.; Franchini, J. C.; Lara, F. M.; *J. Chem. Ecol.* **2003**, *29*, 1223.
26. Hoffmann-Campos, C. B.; Neto, J. A. R.; Oliveira, M. C. N.; Oliveira, L. J.; *Pesq. Agropec. Bras.* **2006**, *41*, 1453.
27. Robards, K.; Antolovich, M.; *Analyst* **1997**, *122*, 11R.
28. Cliffe, S.; Fawer, M. S.; Maier, G.; Takata, K.; Ritter, G.; *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 1824.
29. Van Rensburg, E.; Engelbrecht, A. H. P.; *J. Food Sci.* **1986**, *51*, 1067.
30. Greenham, J.; Williams, C.; Harborne, J. *Phytochem. Anal.* **1995**, *6*, 211.
31. Drawert, F.; Pivernetz, H.; Leupold, G.; Ziegler, A.; *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* **1980**, *6*(5), 131.
32. Oleszek, W.; Amiot, M. J.; Aubert, S. Y.; *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 1261.
33. Nishiura, M.; Esaki, S.; Kamiya, S.; *Agric. Biol. Chem.* **1969**, *33*, 1109.
34. Veldhuis, M. K.; Swift, L. J.; Clifford Scott, W. *J. Agric. Food Chem.* **1970**, *18*, 590.
35. Earle Coffin, D.; *J. Agric. Food Chem.* **1971**, *19*, 513.
36. Drawert, F.; Leupold, G.; Pivernetz, H.; *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* **1980**, *6*(6), 189.

37. Creaser, C. S.; Koupai-Abyazani, M. R.; Stephenson, G. R.; *Analyst* **1992**, *117*, 1105.
38. Baj, A.; Bombardelli, E.; Gabetta, B.; Martinelli, E. M.; *J. Chromatogr.* **1983**, *279*, 365.
39. Baldi, A.; Romani, A.; Mulinacci, N.; Vincieri, F. F.; Casetta, B.; *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 2104.
40. Hadj-Mahammed, M.; Meklati, B. Y.; *Lebensm.-Wiss. Technol.* **1987**, *20*, 111.
41. Garcia, J. F.; Barcelo, D.; *J. High Resolut. Chromatogr.* **1993**, *16*, 633.
42. Genovese, M. I.; Lajolo, F. M.; *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **2001**, *21*, 86.
43. Barbosa, A. C. L.; Hassimotto, N. M. A.; Lajolo, F. M.; Genovese, M. I.; *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **2006**, *26*, 921.
44. Carrão-Panizzi, M. C.; Favoni, S. P. G.; Kikuchi, A.; *Braz. Arch. Biol. Technol.* **2002**, *45*, 515.
45. Rostagno, M. A.; Palma, M.; Barroso, C. G.; *J. Chromatogr., A* **2003**, *1012*, 119.
46. Heimler, D.; Vignolini, P.; Galardi, C.; Pinelli, P.; Romani, A.; *Chromatographia* **2004**, *59*, 361.
47. Peñalvo, J. L.; Nurmi, T.; Adlercreutz, H.; *Food Chem.* **2004**, *87*, 297.
48. César, I. C.; Braga, F. C.; Soares, C. D. V.; Nunan, E. A.; Pianetti, G. A.; Condessa, F. A.; Barbosa, T. A. F.; Campos, L. M. M.; *J. Chromatogr., B* **2006**, *836*, 74.
49. Ávila, M. R.; Braccini, A. L.; Scapim, C. A.; Mandarino, J. M. G.; Albrecht, L. P.; Filho, P. S. V.; *Rev. Bras. Sementes* **2007**, *29*, 111.
50. Cho, S. Y.; Lee, Y. N.; Park, H. J.; *Food Chem.* **2009**, *117*, 312.
51. Lee, J. H.; Choung, M. G. *Food Chem.* **2011**, *129*, 577.
52. Klump, S. P.; Allred, M. C.; MacDonald, J. L.; Ballam, J. M. *Journal of AOAC International* **2001**, *84*, 1865.
53. Escarpa, A.; González, M. C.; Blasco, A. J.; Rogerio, M. C.; Hervás, M. *Electroanalysis* **2007**, *19*, 952.
54. Klejdus, B.; Vacek, J.; Adam, V.; Zehnálek, J.; Kizek, R.; Trnková, L.; Kubán, V.; *J. Chromatogr., B* **2004**, *806*, 101.
55. Zhang, X.; Zheng, J.; Gao, H.; *Anal. Lett.* **2001**, *34*, 1901.
56. Fogliatto, D. K.; Barbosa, A. M. J.; Ferreira, V. S.; *Colloids Surf., B* **2010**, *78*, 243.
57. Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A.; *Princípios de Análise Instrumental*, 6^a ed., Bookman: Porto Alegre, 2009.

58. Harris, D. C.; *Análise Química Quantitativa*, 7^a ed., LTC: Rio de Janeiro, 2008.
59. Zuman, P.; *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2001**, *31*, 281.
60. Bard, J. A.; Faulkner, L. R. *Electrochemical methods: fundamentals and application*, 2^a ed.; John Wiley: New York, 2001.
61. Ewing, G. W.; *Métodos Instrumentais de Análise Química*, Edgard Blücher: São Paulo, 1972.
62. Mendham, J.; Denney, R. C.; Barnes, J. D.; Thomas, M. J. K.; *Análise Química Quantitativa*, 6^a ed., LTC: Rio de Janeiro, 2002.
63. Souza, D.; Machado, S. A. A.; Avaca, L. A.; *Quim. Nova* **2003**, *26*, 81.
64. Brett, A. M. O.; Brett, C. M. A.; *Electroquímica, Princípios, Métodos, e Aplicações*, Almedina: Coimbra, 1996.
65. Wang, J.; *Analytical Electrochemistry*, 3 ed., Wiley-VCH, 2006.
66. Kessinger, P. T.; Heineman, W. R.; *J. Chem. Educ.* **1983**, *60*, 702.
67. Mabbott, G. A.; *J. Chem. Educ.* **1983**, *60*, 697.
68. Timbola, A. K.; Souza, C. D.; Giacomelli, C.; Spinelli, A.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2006**, *17*, 139.
69. Blasco, A. J.; González, M. C.; Escarpa, A.; *Anal. Chim. Acta* **2004**, *511*, 71.
70. Sousa, W. R.; Rocha, C.; Cardoso, C. L.; Silva, D. H. S.; Zanoni, V. B. *Journal of Food Composition and Analysis* **2004**, *17*, 619.
71. Kilmartin, P. A.; Hsu, C. F.; *Food Chem.* **2003**, *82*, 501.
72. Kilmartin, P. A.; Zou, H.; Waterhouse, A. L.; *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 1957.
73. Korbut, O.; Buckova, M.; Labuda, J.; Grundler, P.; *Sensors* **2003**, *3*, 1.
74. Mannino, S.; Brenna, O.; Buratti, S.; Cosio, M. S.; *Electroanalysis* **1998**, *10*, 908.
75. Engelkemeir, D. W.; Geissman, T. A.; Crowell, W. R.; Friess, S. L.; *J. Am. Chem. Soc.* **1947**, *69*, 155.
76. Geissman, T. A.; Friess, S. L.; *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, *71*, 3893.
77. Zoulis, N. E.; Constantinos, E. E.; *Anal. Chim. Acta* **1996**, *320*, 255.
78. Reichart, E.; Obendorf, D.; *Anal. Chim. Acta* **1998**, *360*, 179.
79. Obendorf, D.; Reichart, E.; *Electroanalysis* **1995**, *7*, 1075.
80. El-Shahawi, M. S.; Bashammakh, A. S.; El-Mogy, T.; *Anal. Sci.* **2006**, *22*, 1351.
81. Ensafi, A. A.; Hajjan, R.; *Electroanalysis* **2006**, *18*, 579.
82. Temerk, Y. M.; Ibrahim, H. S. M.; Schuhmann, W.; *Microchim. Acta* **2006**, *153*, 7.
83. Mendes, R. K.; Claro-Neto, S.; Cavalheiro, E. T. G.; *Talanta* **2002**, *57*, 909.

84. Toledo, R. A.; Santos, M. C.; Cavalheiro, E. T. G.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *381*, 1161.
85. Mendes, R. K.; Cervini, P.; Cavalheiro, E. T. G.; *Talanta* **2006**, *68*, 708.
86. Toledo, R. A.; Santos, M. C.; Honório, K. M.; Silva, A. B. F.; Cavalheiro, E. T. G.; Mazo, L. H.; *Anal. Lett.* **2006**, *39*, 507.
87. Cervini, P.; Cavalheiro, E. T. G.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2008**, *19*, 836.
88. Semaan, F. S.; Pinto, E. M.; Cavalheiro, E. T. G.; Brett, C. M. A.; *Electroanalysis* **2008**, *21*, 2287.
89. Semaan, F. S.; Cavalheiro, E. T. G.; Brett, C. M. A.; *Anal. Lett.* **2009**, *42*, 1119.
90. Toledo, R. A.; Vaz, C. M. P.; *Microchem. J.* **2007**, *86*, 161.
91. Malagutti, A. R.; Zuin, V. G.; Cavalheiro, E. T. G.; Mazo, L. H.; *Electroanalysis* **2006**, *18*, 1028.
92. Rostagno, M. A.; Villares, A.; Guillamón, E.; García-Lafuente, A.; Martínez, J. A.; *J. Chromatogr., A* **2009**, *1216*, 2.
93. Delmonte, P.; Perry, J.; Rader, J. I.; *J. Chromatogr., A* **2006**, *1107*, 59.
94. Miller, J. C.; Miller, J. N.; *Statistic for Analytical Chemistry*, Ellis Horwood PTR Prentice Hall: New York, 1993.
95. Oliveira, A. C.; Vaz, C. M. P.; Silva, J. G.; Silva, M. R. L.; Castro, C. S. P.; Mascaro, L. H.; *33^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Águas de Lindóia, 2010.
96. Wu, L.; Laughlin Jr, J. B.; Dewald, H. D.; *Electroanalysis* **1997**, *9*, 796.
97. Ghica, M. E.; Brett, A. M. O.; *Electroanalysis* **2005**, *17*, 313.
98. Laviron, E.; *J. Electroanal. Chem.* **1979**, *101*, 19.
99. Mahal, H. S.; Kapoor, S.; Satpati, A. K.; Mukherjee, T.; *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 24197.
100. Tsukamoto, C.; Shimida, S.; Igita, K.; Kudou, S.; Kokubun, M.; Okubo, K.; Kitamura, K.; *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 1184.

VIII – ANEXO I

OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS VOLTAMÉTRICOS E DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS ÓTIMAS PARA A DETERMINAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM AMOSTRAS DE SOJA

1. Otimização dos parâmetros voltamétricos e das condições experimentais ótimas para a determinação de metabólitos secundários em amostras de soja, utilizando-se a DPCAdSV e o HMDE

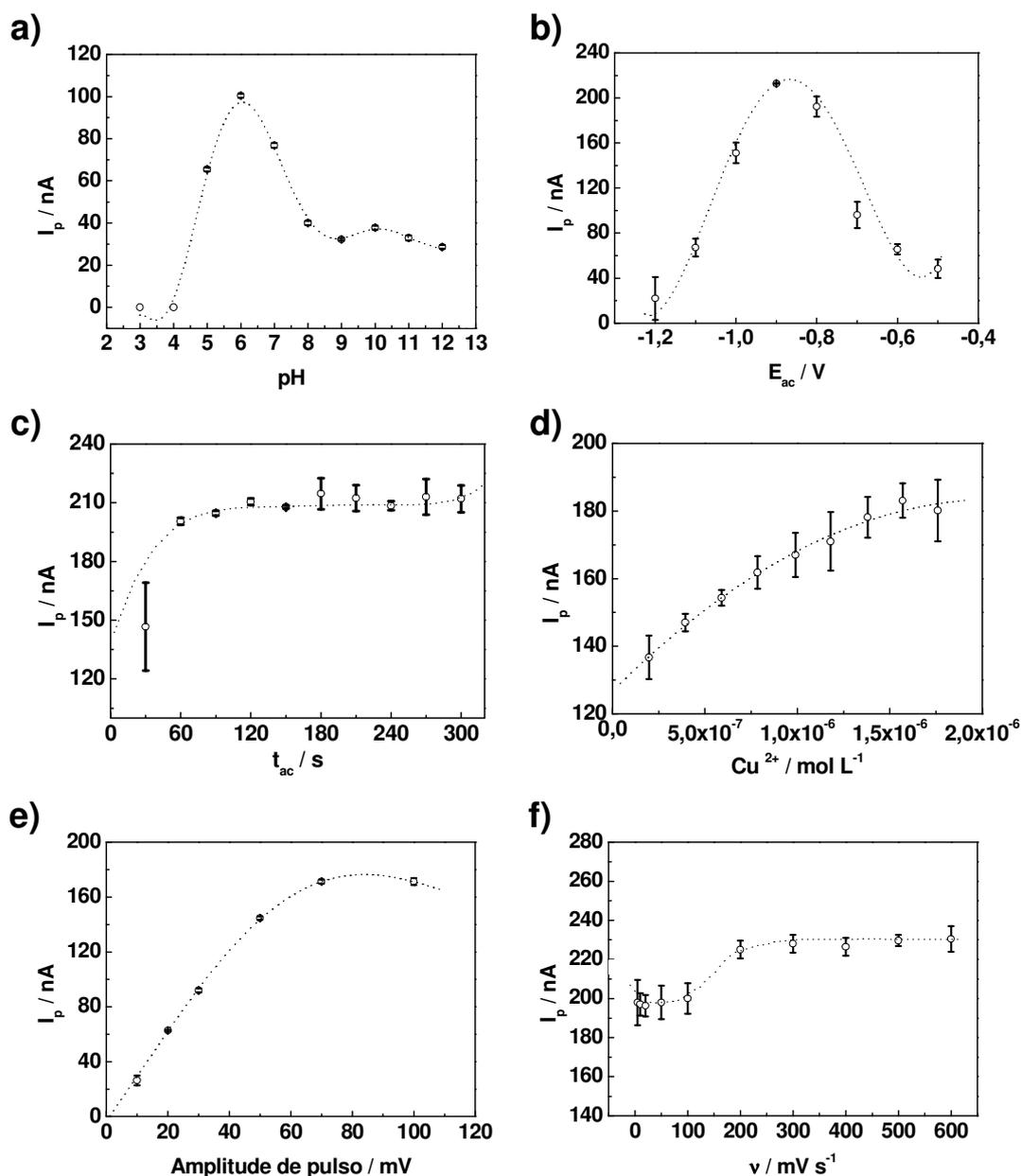


Figura 61. Otimização dos parâmetros voltamétricos e das condições experimentais ótimas, utilizando-se a DPCAdSV, para a rotina $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ em 10 mL de eletrólito suporte. a) Estudo do pH; b) Estudo do potencial de acumulação (E_{ac}); c) Estudo do tempo de acumulação (t_{ac}); d) Estudo da concentração de Cu^{2+} ; e) Estudo da amplitude de pulso; f) Estudo da velocidade de varredura (v). $E_i = 0,100$ V, $E_f = -0,400$ V, Eletrodo de trabalho: HMDE, Eletrodo de referência: Ag/AgCl (KCl 3 mol L⁻¹).

2. Otimização dos parâmetros voltamétricos e das condições experimentais ótimas para a determinação de metabólitos secundários em amostras de soja, utilizando-se a DPV e o HMDE

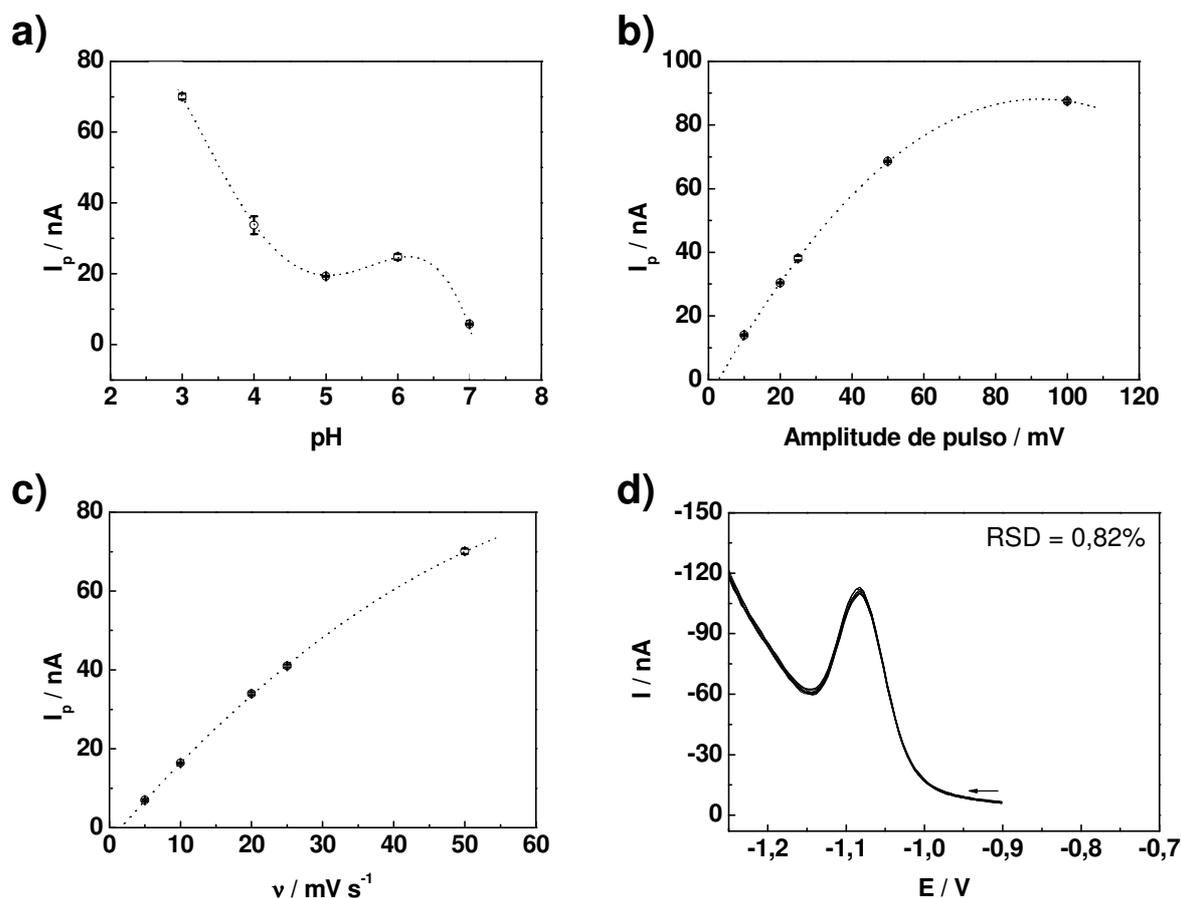


Figura 62. Otimização dos parâmetros voltamétricos e das condições experimentais ótimas, utilizando-se a DPV, para a daidzeína $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. a) Estudo do pH; b) Estudo da amplitude de pulso; c) Estudo da velocidade de varredura (v); d) Repetibilidade do HMDE. $E_i = -0,700 \text{ V}$; $E_f = -1,700 \text{ V}$, Eletrodo de trabalho: HMDE, Eletrodo de referência: Ag/AgCl ($\text{KCl } 3 \text{ mol L}^{-1}$).

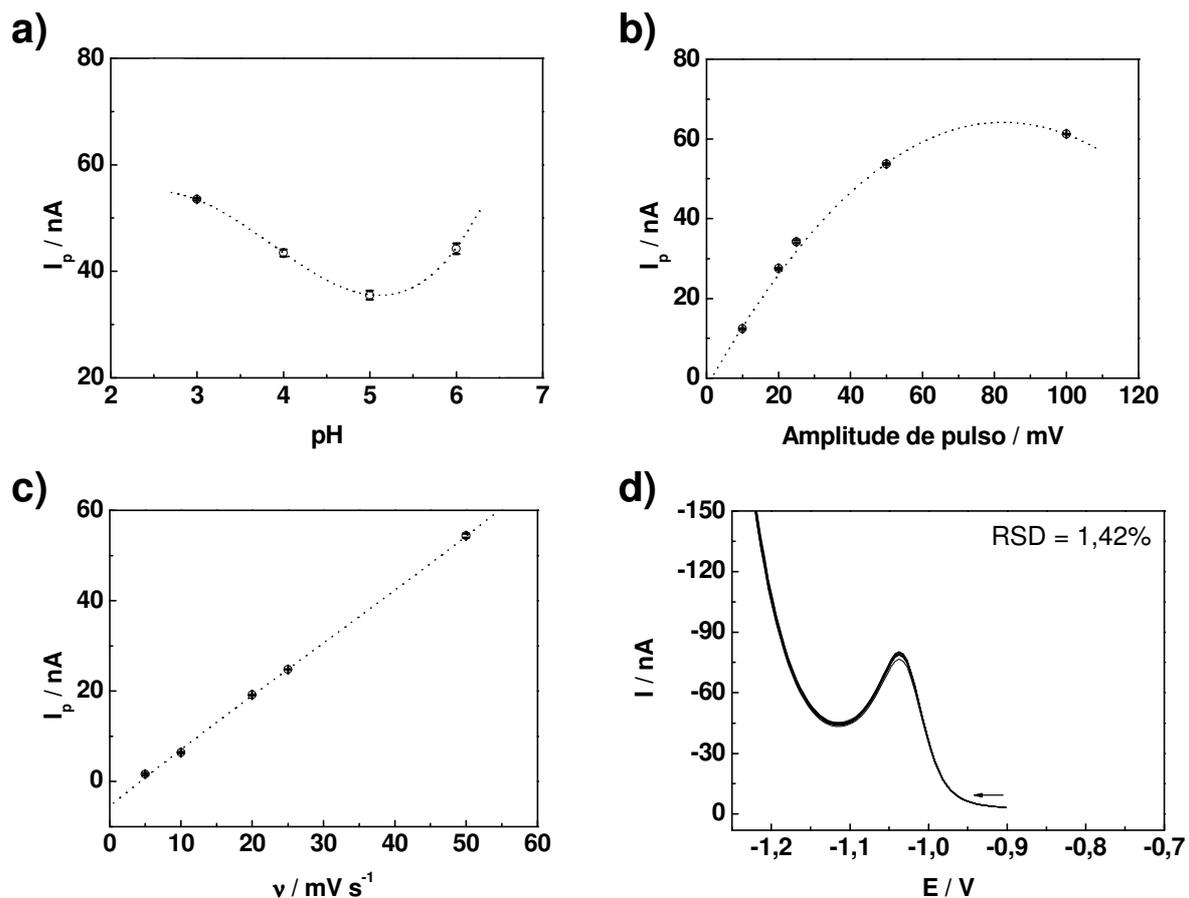


Figura 63. Otimização dos parâmetros voltamétricos e das condições experimentais ótimas, utilizando-se a DPV, para a daidzina $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. a) Estudo do pH; b) Estudo da amplitude de pulso; c) Estudo da velocidade de varredura (v); d) Repetibilidade do HMDE. $E_i = -0,700 \text{ V}$; $E_f = -1,700 \text{ V}$, Eletrodo de trabalho: HMDE, Eletrodo de referência: Ag/AgCl ($\text{KCl } 3 \text{ mol L}^{-1}$).

3. Otimização dos parâmetros voltamétricos e das condições experimentais ótimas para a determinação de metabólitos secundários em amostras de soja, utilizando-se a DPV e o eletrodo de grafite

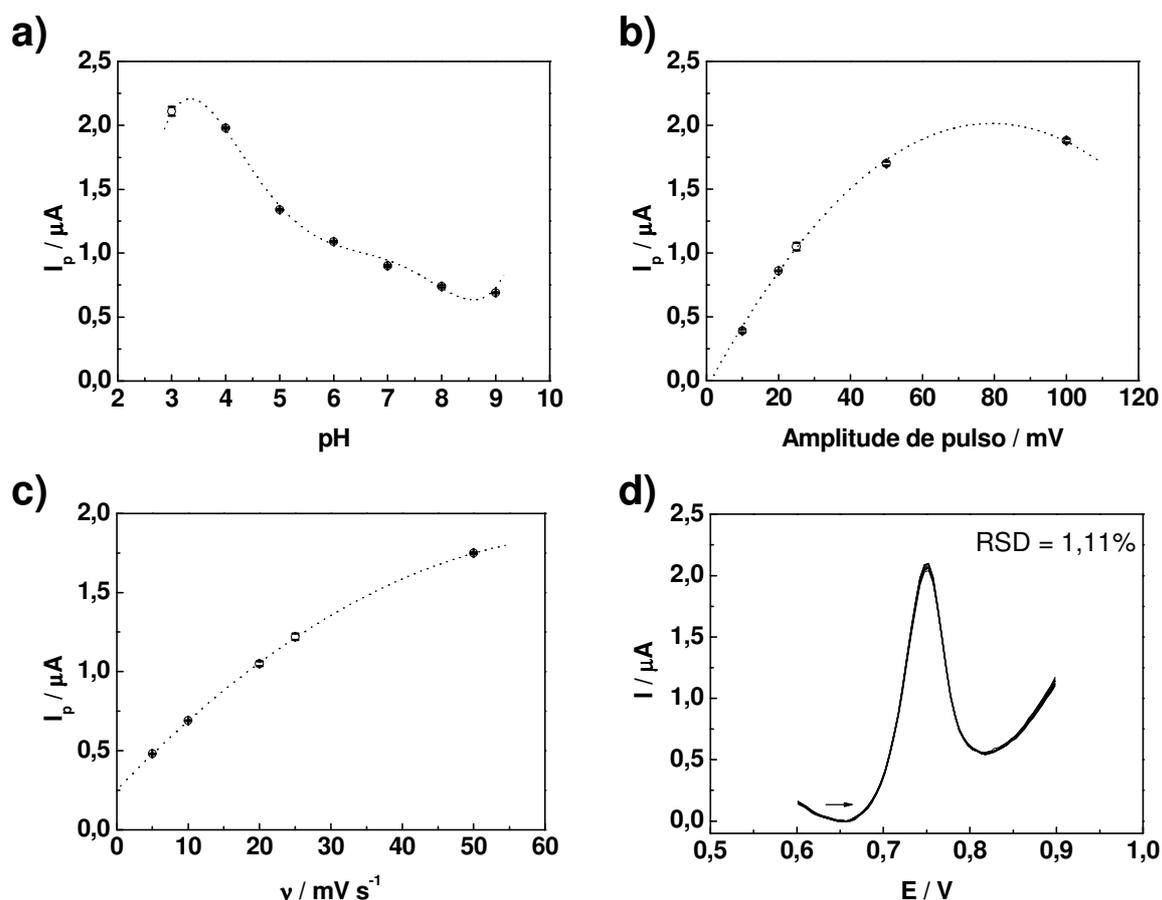


Figura 64. Otimização dos parâmetros voltamétricos e das condições experimentais ótimas, utilizando-se a DPV, para a daidzeína $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. a) Estudo do pH; b) Estudo da amplitude de pulso; c) Estudo da velocidade de varredura (v); d) Repetibilidade do eletrodo de grafite. $E_i = 0,200 \text{ V}$; $E_f = 0,600 \text{ V}$, Eletrodo de trabalho: Grafite, Eletrodo de referência: Ag/AgCl (KCl 3 mol L^{-1}).

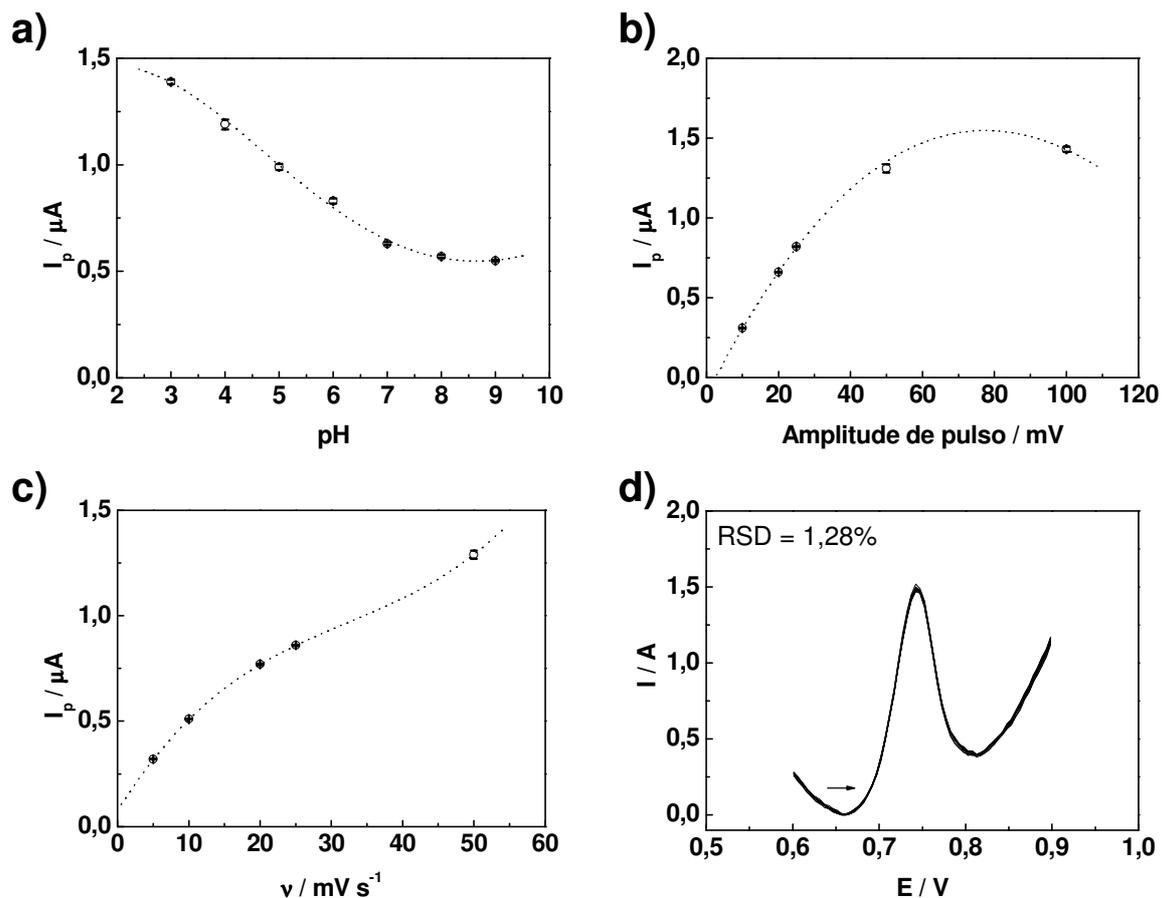


Figura 65. Otimização dos parâmetros voltamétricos e das condições experimentais ótimas, utilizando-se a DPV, para a genisteína $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. a) Estudo do pH; b) Estudo da amplitude de pulso; c) Estudo da velocidade de varredura (v); d) Repetibilidade do eletrodo de grafite. $E_i = 0,200 \text{ V}$; $E_f = 0,600 \text{ V}$, Eletrodo de trabalho: Grafite, Eletrodo de referência: Ag/AgCl ($\text{KCl } 3 \text{ mol L}^{-1}$).

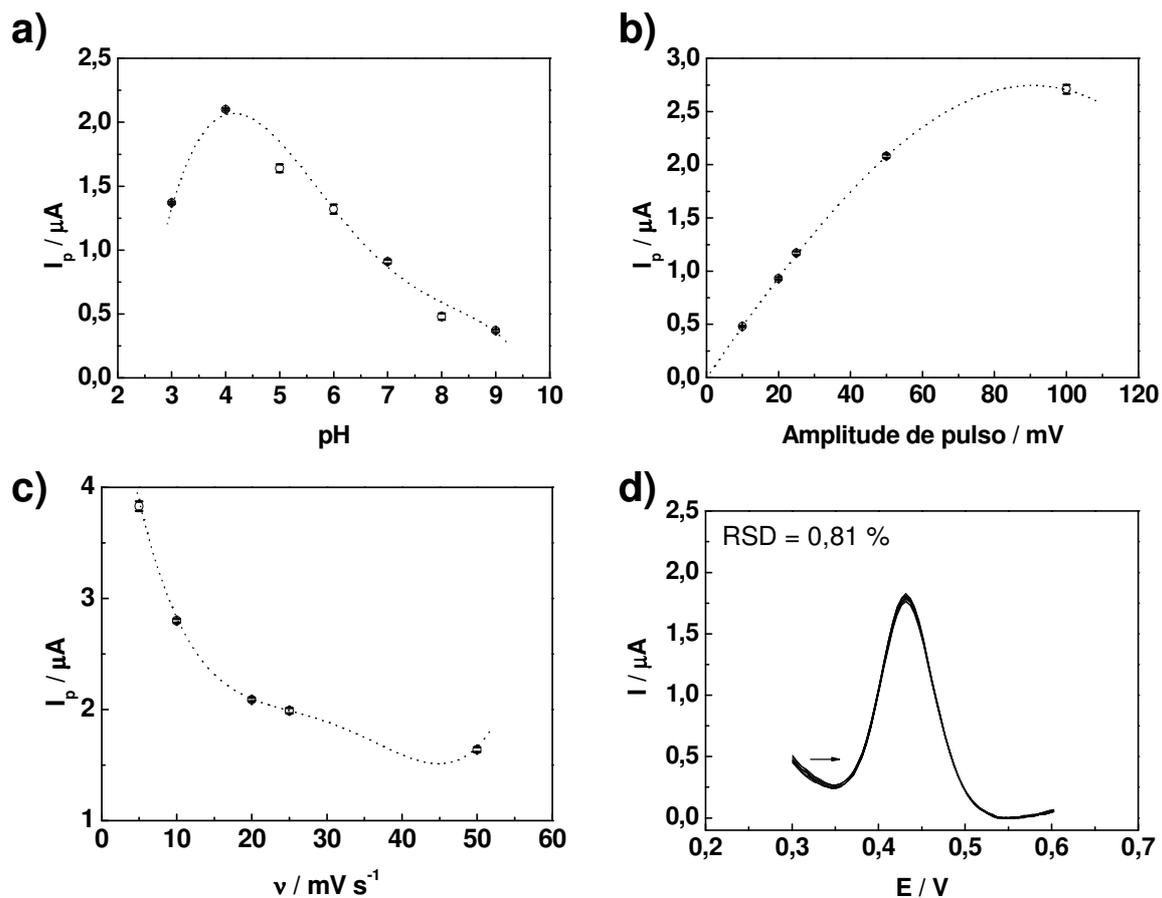


Figura 66. Otimização dos parâmetros voltamétricos e das condições experimentais ótimas, utilizando-se a DPV, para a rotina $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. a) Estudo do pH; b) Estudo da amplitude de pulso; c) Estudo da velocidade de varredura (v); d) Repetibilidade do eletrodo de grafite. $E_i = 0,200 \text{ V}$; $E_f = 0,600 \text{ V}$, Eletrodo de trabalho: Grafite, Eletrodo de referência: Ag/AgCl (KCl 3 mol L^{-1}).

4. Otimização dos parâmetros voltamétricos e das condições experimentais ótimas para a determinação de metabólitos secundários em amostras de soja, utilizando-se a DPV ou a DPAdSV e o eletrodo de GC

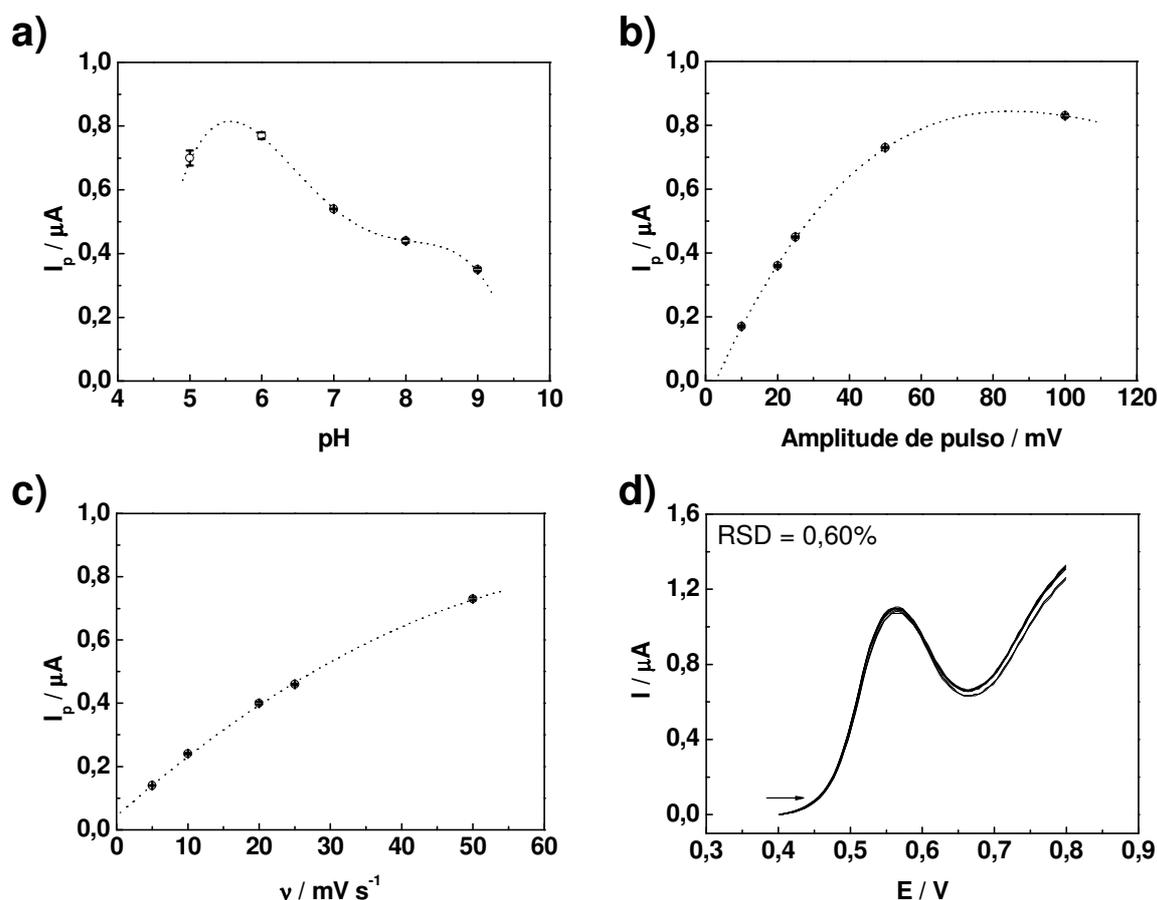


Figura 67. Otimização dos parâmetros voltamétricos e das condições experimentais ótimas, utilizando-se a DPV, para a daidzeína $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. a) Estudo do pH; b) Estudo da amplitude de pulso; c) Estudo da velocidade de varredura (v); d) Repetibilidade do eletrodo de GC. $E_i = 0,200 \text{ V}$; $E_f = 1,000 \text{ V}$, Eletrodo de trabalho: GC, Eletrodo de referência: Ag/AgCl ($\text{KCl } 3 \text{ mol L}^{-1}$).

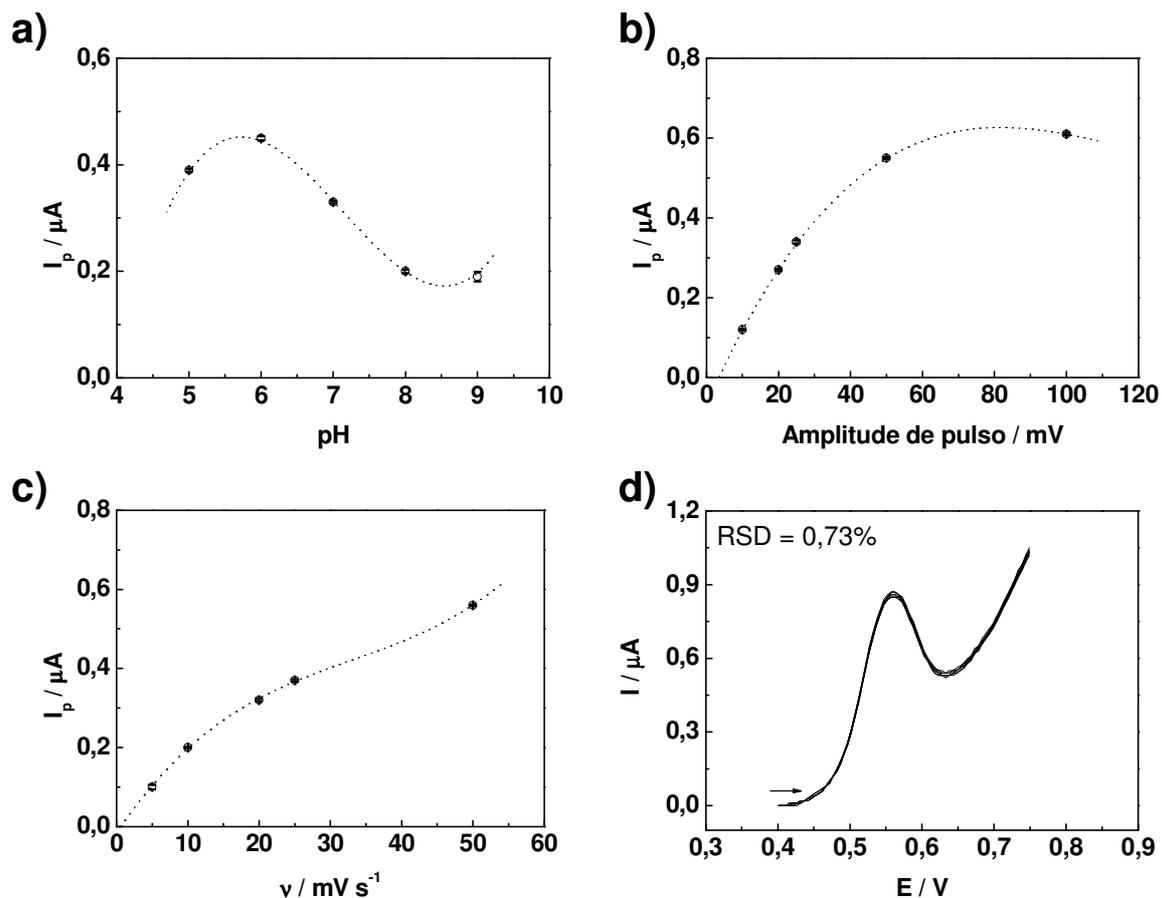


Figura 68. Otimização dos parâmetros voltamétricos e das condições experimentais ótimas, utilizando-se a DPV, para a genisteína $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. a) Estudo do pH; b) Estudo da amplitude de pulso; c) Estudo da velocidade de varredura (v); d) Repetibilidade do eletrodo de GC. $E_i = 0,200 \text{ V}$; $E_f = 1,000 \text{ V}$, Eletrodo de trabalho: GC, Eletrodo de referência: Ag/AgCl ($\text{KCl } 3 \text{ mol L}^{-1}$).

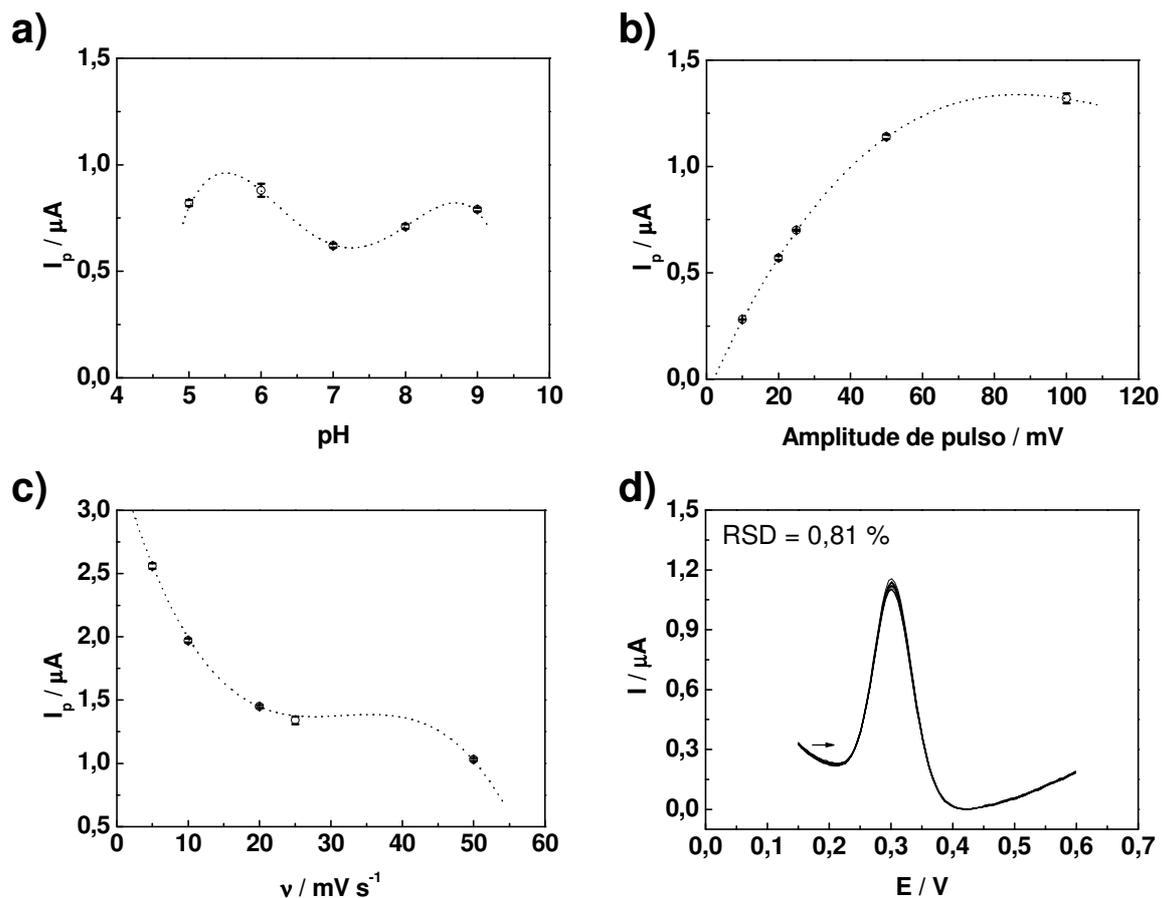


Figura 69. Otimização dos parâmetros voltamétricos e das condições experimentais ótimas, utilizando-se a DPV, para a rotina $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. a) Estudo do pH; b) Estudo da amplitude de pulso; c) Estudo da velocidade de varredura (v); d) Repetibilidade do eletrodo de GC. $E_i = 0,200 \text{ V}$; $E_f = 1,000 \text{ V}$, Eletrodo de trabalho: GC, Eletrodo de referência: Ag/AgCl (KCl 3 mol L^{-1}).

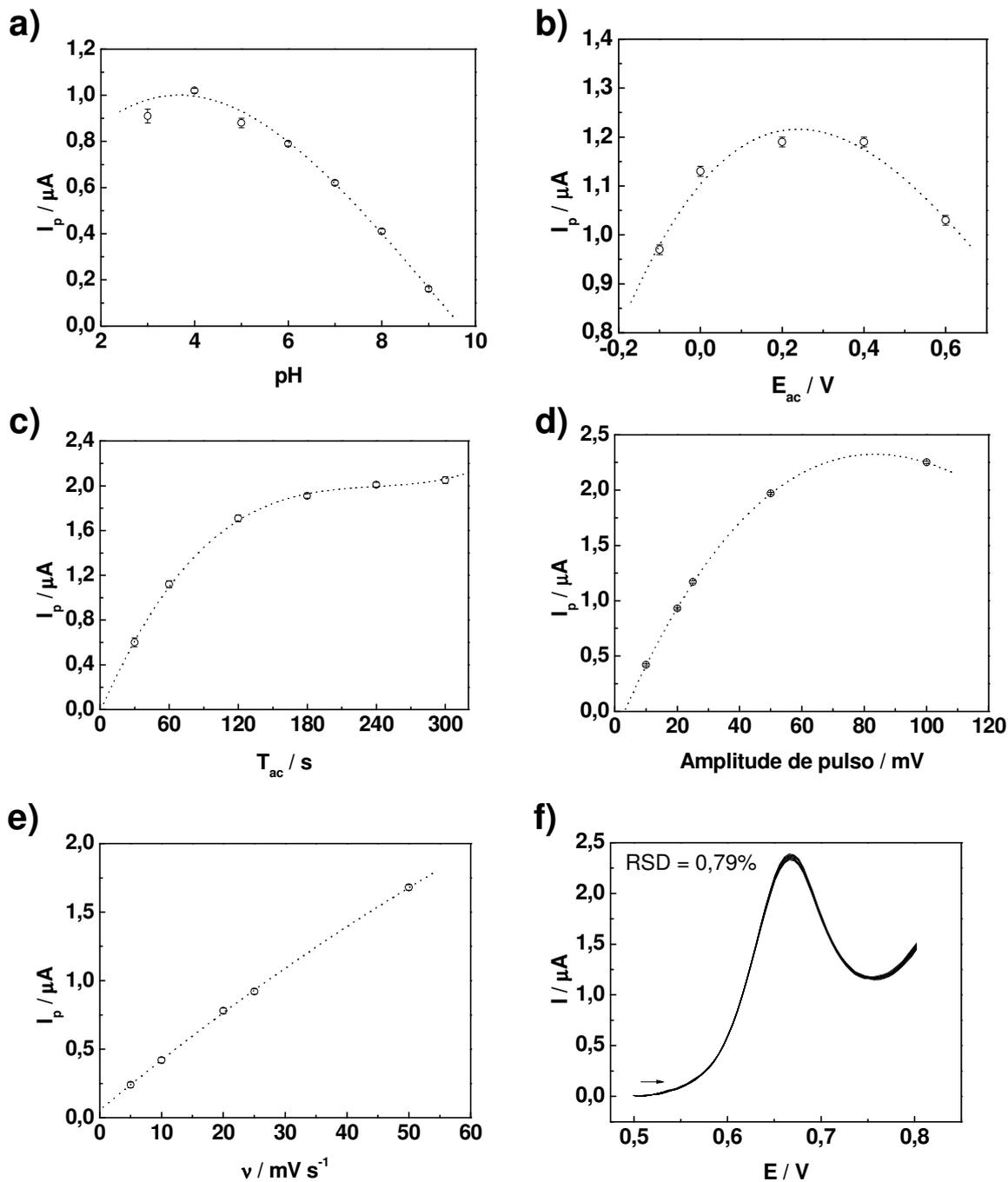


Figura 70. Otimização dos parâmetros voltamétricos e das condições experimentais ótimas, utilizando-se a DPAdSV, para a genisteína $6,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. a) Estudo do pH; b) Estudo do potencial de acumulação (E_{ac}); c) Estudo do tempo de acumulação (t_{ac}); d) Estudo da amplitude de pulso; e) Estudo da velocidade de varredura (v); f) Repetibilidade do eletrodo de GC. $E_i = 0,300 \text{ V}$; $E_f = 0,900 \text{ V}$, Eletrodo de trabalho: GC, Eletrodo de referência: Ag/AgCl (KCl 3 mol L^{-1}).

IX – ANEXO II

**TRABALHOS PUBLICADOS E/OU
SUBMETIDOS A PERIÓDICOS
INDEXADOS, RESUMOS EM CONGRESSO
OU OUTROS TIPOS DE PRODUÇÃO
BIBLIOGRÁFICA NO PERÍODO**



DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS VOLTAMÉTRICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE RUTINA E GENISTEÍNA EM GRÃOS E FOLHAS DE SOJA

Jonatas G. da Silva^{1,2}, Mariana R. L. e Silva^{1,2}, Aline C. de Oliveira^{3,4}, Maria Carolina B. Moraes¹,
Luzia Helena C. Lima¹, Jurandir R. de Souza², Lúcia Helena Mascaró⁴, Carlos M. P. Vaz³ e
Clarissa S. P. de Castro^{1*}

¹Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, CP 2372, CEP 70.770-917, Brasília – DF

²Instituto de Química, Universidade de Brasília, CP 4394, CEP 70.919-970, Brasília – DF

³Embrapa Instrumentação Agropecuária, CP 741, CEP 13.560-970, São Carlos – SP

⁴Departamento de Química – UFSCar, CP 676, CEP 13.565-905, São Carlos - SP

*clarissa@cenargen.embrapa.br

Projeto Componente: PC2 Plano de Ação: 01.05.1.001.02.02

Resumo

A rutina e a genisteína são metabólitos secundários que atuam no sistema de defesa da soja contra insetos-praga. Neste trabalho, dois métodos voltamétricos, empregando os eletrodos de mercúrio (HMDE) e de carbono vítreo e as técnicas voltamétricas de pulso diferencial e de redissolução catódica, foram desenvolvidos para a determinação de rutina e genisteína. Os métodos desenvolvidos apresentaram baixos limites de detecção e quantificação, boa repetibilidade e sensibilidade, tornando-se excelentes alternativas para a determinação de rutina e genisteína em grãos e folhas de soja.

Palavras-chave: rutina, genisteína, soja, eletrodo de mercúrio, eletrodo de carbono vítreo, voltametria

Introdução

A soja é a oleaginosa mais produzida e consumida no mundo. Uma das consequências das grandes áreas cultivadas com soja está relacionada ao aumento de pragas. Nos últimos anos, o desenvolvimento de cultivares de soja resistentes tem sido uma ferramenta alternativa para controle de pragas em substituição aos inseticidas químicos. Um dos principais responsáveis pela resistência da soja a insetos-praga são os metabólitos secundários, principalmente os flavonóides (PIUBELI et al., 2005; ZHU e PARK, 2005). O desenvolvimento de métodos para a determinação destes metabólitos, em diferentes tecidos das plantas de soja, poderá fornecer dados relevantes sobre como esses

compostos são usados no meio ambiente pelas plantas na defesa contra insetos-praga. Atualmente os métodos de cromatografia líquida e de espectrometria de massas têm sido utilizados na determinação de flavonóides; porém, esses métodos são de alto custo, exigem processos laboriosos de preparação de amostra e muitas vezes não preservam a forma química de como esses compostos são encontrados na planta. Os métodos eletroquímicos superam essas desvantagens, pois são métodos não destrutivos, de baixo custo, de alta sensibilidade; podendo ser levados para o campo e por essa razão têm sido aplicados na determinação de flavonóides em suco, chá, medicamentos e fluídos biológicos utilizando eletrodos de mercúrio e carbono (TEMERK et al., 2006; ENSAFI e



DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS VOLTAMÉTRICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE RUTINA E GENISTEÍNA EM GRÃOS E FOLHAS DE SOJA

Jonatas G. da Silva^{1,2}, Mariana R. L. e Silva^{1,2}, Aline C. de Oliveira^{3,4}, Maria Carolina B. Moraes¹,
Luzia Helena C. Lima¹, Jurandir R. de Souza², Lúcia Helena Mascaro⁴, Carlos M. P. Vaz³ e
Clarissa S. P. de Castro^{*}

¹Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, CP 2372, CEP 70.770-917, Brasília – DF

²Instituto de Química, Universidade de Brasília, CP 4394, CEP 70.919-970, Brasília – DF

³Embrapa Instrumentação Agropecuária, CP 741, CEP 13.560-970, São Carlos – SP

⁴Departamento de Química – UFSCar, CP 676, CEP 13.565-905, São Carlos - SP

*clarissa@cenargen.embrapa.br

Projeto Componente: PC2 Plano de Ação: 01.05.1.001.02.02

Resumo

A rutina e a genisteína são metabólitos secundários que atuam no sistema de defesa da soja contra insetos-praga. Neste trabalho, dois métodos voltamétricos, empregando os eletrodos de mercúrio (HMDE) e de carbono vítreo e as técnicas voltamétricas de pulso diferencial e de redissolução catódica, foram desenvolvidos para a determinação de rutina e genisteína. Os métodos desenvolvidos apresentaram baixos limites de detecção e quantificação, boa repetibilidade e sensibilidade, tornando-se excelentes alternativas para a determinação de rutina e genisteína em grãos e folhas de soja.

Palavras-chave: rutina, genisteína, soja, eletrodo de mercúrio, eletrodo de carbono vítreo, voltametria

Introdução

A soja é a oleaginosa mais produzida e consumida no mundo. Uma das conseqüências das grandes áreas cultivadas com soja está relacionada ao aumento de pragas. Nos últimos anos, o desenvolvimento de cultivares de soja resistentes tem sido uma ferramenta alternativa para controle de pragas em substituição aos inseticidas químicos. Um dos principais responsáveis pela resistência da soja a insetos-praga são os metabólitos secundários, principalmente os flavonóides (PIUBELI et al., 2005; ZHU e PARK, 2005). O desenvolvimento de métodos para a determinação destes metabólitos, em diferentes tecidos das plantas de soja, poderá fornecer dados relevantes sobre como esses

compostos são usados no meio ambiente pelas plantas na defesa contra insetos-praga. Atualmente os métodos de cromatografia líquida e de espectrometria de massas têm sido utilizados na determinação de flavonóides; porém, esses métodos são de alto custo, exigem processos laboriosos de preparação de amostra e muitas vezes não preservam a forma química de como esses compostos são encontrados na planta. Os métodos eletroquímicos superam essas desvantagens, pois são métodos não destrutivos, de baixo custo, de alta sensibilidade; podendo ser levados para o campo e por essa razão têm sido aplicados na determinação de flavonóides em suco, chá, medicamentos e fluídos biológicos utilizando eletrodos de mercúrio e carbono (TEMERK et al., 2006; ENSAFI e

HAJJAN, 2006). O presente trabalho tem como objetivo desenvolver métodos para a determinação dos flavonóides rutina e genisteína (Fig. 1) em grãos e folhas de soja, empregando os eletrodos de mercúrio (HMDE) e de carbono vítreo (GC) e as técnicas voltamétricas de pulso diferencial (DPV) e de redissolução catódica (CSV).

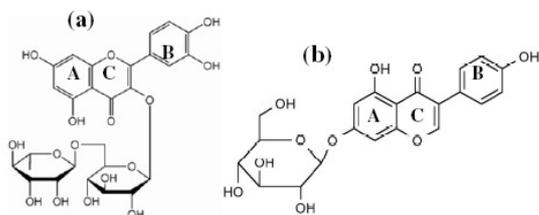


Fig.1 : Estruturas Químicas dos flavonóides Rutina (a) e Genisteína (b).

Materiais e métodos

Todas as medidas voltamétricas foram realizadas em triplicata, utilizando-se o analisador voltamétrico Metrohm 797 e uma célula eletroquímica composta pelos eletrodos GC ou HMDE (trabalho), Ag/AgCl (KCl 3 mol L⁻¹) (referência) e platina (auxiliar). As soluções padrão de rutina e genisteína foram preparadas em uma mistura etanol-água 1:1 (v/v). Inicialmente foram otimizados os parâmetros voltamétricos e as condições experimentais dos métodos: eletrólito suporte, potencial de deposição, amplitude de pulso, velocidade de varredura, tempo de deposição e concentração de Cu(II). Em seguida foram obtidas as curvas analíticas pelo método de adição de padrão para cada um dos métodos.

Resultados e discussão

Foram desenvolvidos dois métodos voltamétricos para a determinação de rutina e genisteína em grãos e folhas de soja.

O primeiro método, onde se utilizou a CSV e o HMDE para a determinação de rutina, baseia-se no aparecimento de um sinal ($E = -0,150 \text{ V}$) nos voltamogramas (Fig. 2) que corresponde ao processo de redução do complexo formado entre os íons Cu(II) e a rutina.

Os parâmetros voltamétricos e as condições experimentais otimizadas para a determinação de rutina utilizando-se a CSV e o HMDE são mostrados na Tabela 1.

A curva analítica (Fig. 2, inserção), para a rutina, apresentou a equação $I_{pc} \text{ (nA)} = 10,07 + 1,86 \times 10^8 [\text{Rutina}]$ ($r = 0,9999$) e linearidade entre

$1,96 \times 10^{-7}$ a $1,35 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, com limite de detecção $7,00 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ e limite de quantificação $2,20 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, calculados a partir de: $LD = 3Sb/b$; $LQ = 10Sb/b$, onde Sb é o desvio padrão das medidas do branco e b é a inclinação da curva analítica.

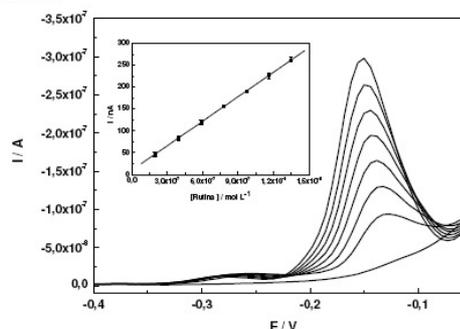


Fig. 2: Voltamogramas de redissolução catódica de pulso diferencial para 160 μL de Cu(II) $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em 10 mL de tampão fosfato pH = 6,00 com adições sucessivas de 20 μL de Rutina $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. $E_d = -1,0 \text{ V}$, $t_d = 180 \text{ s}$, $E_i = 0,1 \text{ V}$; $E_f = -0,4 \text{ V}$, $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$, Eletrodo de trabalho: HMDE, Eletrodo de referência: Ag/AgCl (KCl 3 mol L⁻¹).

Tabela 1: Parâmetros voltamétricos e condições experimentais otimizadas para a determinação de rutina utilizando-se a CSV e o HMDE.

Parâmetros	Rutina
Eletrólito suporte	Tampão Fosfato pH 6,00
Potencial de deposição	- 1,0 V
Amplitude do pulso	70 mV
Velocidade de varredura	50 mV s ⁻¹
Tempo de deposição	180 s
Concentração de Cu(II)	$1,57 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$

O segundo método, onde se utilizou a DPV e o GC para a determinação de rutina e genisteína, baseia-se no aparecimento de um sinal ($E = 0,250 \text{ V}$ - Fig 3; $E = 0,580 \text{ V}$ - Fig.4) nos voltamogramas (Figs. 3 e 4) que corresponde ao processo de oxidação dos grupos hidroxilas dos anéis B de ambos os flavonóides.

Os parâmetros voltamétricos e as condições experimentais otimizadas para a determinação de rutina e genisteína utilizando-se a DPV e o GC são mostrados na Tabela 2.

O estudo para repetibilidade de resposta do eletrodo de GC para a determinação de rutina e genisteína apresentou RSD menor que 2% (n=10). A Figura 3 apresenta os voltamogramas de pulso diferencial obtidos para rutina no intervalo de concentração de

$1,96 \times 10^{-6}$ a $4,78 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ e equação $I_{pa}(nA) = -297,79 + 2,66 \times 10^8 [Rutina]$ ($r = 0,9991$) (Fig. 3, inserção), com LD $2,06 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e LQ $6,85 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹.

O método desenvolvido para a determinação de rutina, empregando o HMDE e a CSV, apresentou limite de detecção mais baixo que o método utilizando o eletrodo de GC e a DPV.

A Figura 4 apresenta os voltamogramas de pulso diferencial obtidos para genisteína no intervalo de concentração de $9,90 \times 10^{-7}$ a $6,57 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ e equação $I_{pa}(nA) = -2,55 + 5,89 \times 10^7 [Genisteína]$, com coeficiente de correlação de 0,9989 (Fig. 4, inserção) e LD $5,89 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e LQ $1,95 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹.

Observou-se que os potenciais de oxidação da rutina (0,25V) e da genisteína (0,58V) são diferentes, possibilitando uma possível determinação dos dois flavonóides em uma única varredura utilizando o segundo método.

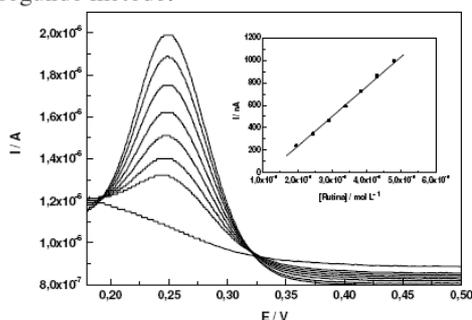


Fig. 3: Voltamogramas de pulso diferencial em 10 mL de tampão fosfato pH = 7,00 com adições sucessivas de 20 µL de rutina 1×10^{-4} mol L⁻¹. $E_i = 0,15V$; $E_f = 0,6 V$, $v = 0,005 V s^{-1}$, Eletrodo de trabalho: GC, Eletrodo de referência: Ag/AgCl (KCl 3 mol L⁻¹).

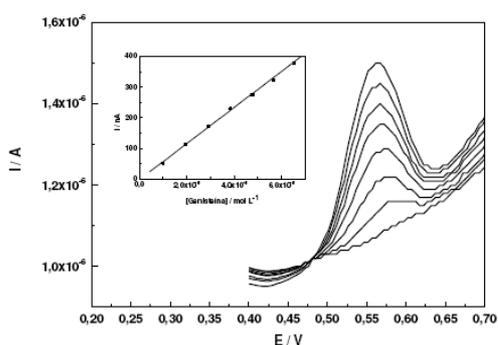


Fig. 4: Voltamogramas de pulso diferencial em 10 mL de tampão fosfato pH = 7,00 com adições sucessivas de 100 µL de genisteína 1×10^{-4} mol L⁻¹. $E_i = 0,4V$; $E_f = 0,7 V$, $v = 0,005 V s^{-1}$, Eletrodo de trabalho: GC, Eletrodo de referência: Ag/AgCl (KCl 3 mol L⁻¹).

Tabela 2: Parâmetros voltamétricos e condições experimentais otimizadas para a determinação de rutina e genisteína utilizando-se a DPV e o GC.

Parâmetros	Rutina	Genisteína
Eletrólito suporte	Tampão Fosfato pH 7,00	Tampão Fosfato pH 6,00
Amplitude do pulso	50 mV	50 mV
Velocidade de varredura	5 mV s ⁻¹	50 mV s ⁻¹

Os métodos desenvolvidos estão sendo aplicados na determinação de rutina e genisteína em grãos e folhas de diferentes cultivares de soja (IAC 100, Sylvania, BRQ-903065 e Dowling).

Conclusões

Os métodos voltamétricos desenvolvidos para a determinação de rutina e genisteína, utilizando os eletrodos HMDE e GC e as técnicas CSV e DPV, apresentaram boa sensibilidade e baixos limites de detecção e quantificação, tornando-se excelentes alternativas para a determinação desses flavonóides em uma única varredura em grãos e folhas de soja. Os primeiros resultados da aplicação dos métodos desenvolvidos na análise de quatro cultivares de soja já estão sendo obtidos e informações relevantes sobre como esses flavonóides são usados no meio ambiente pelas plantas na defesa contra insetos-praga poderão num futuro próximo serem obtidas.

Agradecimentos

CENARGEN, UnB, CNPDIA, UFSCar, CNPq e CAPES.

Referências

- PIUBELI, G.C.; HOFFMANN-CAMPO, C.B.; MOSCARDI, F.; MIYAKUBO, S.H.; OLIVEIRA, M.C.N.; *Journal of Chemical Ecology*, v. 31, n. 7. p.1509-1525, 2005.
 ZHU, J.W.; PARK, K.C.; *Journal of Chemical Ecology*, v. 31, n. 7. p. 1733-1746, 2005.
 TEMERK, Y.M.; IBRAHIM, H.S.M.; SCHUHMANN, W.; *Microchimica Acta*, v. 153, p. 7-13, 2006.
 ENSAFI, A.A.; HAJJAN, R.; *Electroanalysis*, v. 18, n. 6, p. 579-585, 2006.



AVALIAÇÃO DAS POTENCIALIDADES ANALÍTICAS DE ELETRODO COMPÓSITO GPU E ELETRODO COMPÓSITO CNTs/PU NA DETERMINAÇÃO DE GENISTEÍNA

Aline Carlos de Oliveira¹(PQ)*, Carlos Manoel Pedro Vaz¹(PQ), Jonatas Gomes da Silva (PG)², Clarissa Silva Pires de Castro (PQ)³, Lúcia Helena Mascaro⁴(PQ)

¹ Embrapa Instrumentação Agropecuária, São Carlos – SP – Brasil

² Instituto de Química, Universidade de Brasília, Brasília – DF – Brasil

³ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília – DF – Brasil

⁴ Departamento de Química - UFSCar, São Carlos - SP – Brasil

*alineplis@yahoo.com.br

Projeto Componente: 01.05.1.001.02.02

Plano de Ação: 01.02.5.001.03.02

Resumo

A avaliação das potencialidades analíticas de eletrodos à base poliuretana (PU) para a determinação de genisteína foi realizada por DPV e utilizando os eletrodos compósitos GPU e CNTs/PU. Curvas analíticas foram obtidas para genisteína com região linear entre $9,92 \times 10^{-7}$ a $7,52 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ para o eletrodo GPU e entre $4,98 \times 10^{-7}$ a $9,26 \times 10^{-6}$ para o eletrodo compósito CNTs/PU, com limite de detecção de $2,70 \times 10^{-7}$ e $2,00 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, respectivamente. Esta pequena diminuição no limite de detecção ao utilizar o eletrodo compósito CNTs/PU foi atribuída à maior condução eletrônica dos CNTs.

Palavras-chave: (genisteína, eletrodo compósito GPU e eletrodo compósito CNTs/PU)

Introdução

Desde a sua apresentação em 2002, o eletrodo compósito Grafite/Poliuretana (GPU) (MENDES et al. 2002) vêm despertando grande interesse devido as suas propriedades e potenciais aplicações. O emprego de outras formas de carbono no preparo de eletrodos compósitos também vem atraindo a atenção de inúmeros grupos de pesquisas. Dentre estas formas, pode-se destacar os nanotubos de carbono (CNTs) (IJIMA et al.1991), devido as suas propriedades químicas, eletrônicas e mecânicas. Entre as diversas aplicações dos eletrodos compósitos à base de PU encontram-se muitas na área de eletroanalítica, sendo de interesse investigar o uso desses eletrodos em determinações de compostos orgânicos. Entre esses compostos encontra-se a genisteína que é um flavonóide

amplamente encontrado em frutas e vegetais como a soja. Esse flavonóide, juntamente com inúmeros metabólicos secundários, é responsável pelas funções defensivas contra microorganismos e pestes. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar as características deste tipo de eletrodos compósitos na determinação de genisteína, para isto foram preparados eletrodos compósitos GPU e eletrodos compósitos CNTs/PU e utilizou-se a técnica de voltametria de pulso diferencial.

Materiais e métodos

O eletrodo compósito GPU foi preparado pela mistura de grafite (Aldrich) e resina poliuretana, na proporção de 60% (m/m) de grafite (MENDES et al. 2002). A confecção dos eletrodos foi feita por moldagem do compósito na forma de tarugos com diâmetro de 3 mm, dos quais foram cortadas

pastilhas com 1 cm de comprimento. As pastilhas foram conectadas ao fio de cobre através de resina do tipo epóxi de prata e, este conjunto, foi selado em seringas de insulina usando resina, a qual é um isolante elétrico.

O eletrodo compósito CNTs/PU foi preparado da mesma maneira, mas utilizou-se a proporção de 50% (m/m) de CNTs. Esta proporção foi selecionada devido às dificuldades de homogeneização do material.

Voltamogramas de pulso diferencial para solução de genisteína $5,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ em tampão BR pH 2,0 foram obtidos em diferentes velocidades de varredura e amplitudes de pulso, para a avaliação das melhores condições experimentais usando o eletrodo compósito GPU 60% (m/m) e o eletrodo compósito CNTs/PU 50% (m/m).

Curvas analíticas foram obtidas para genisteína no intervalo de concentração entre $9,92 \times 10^{-7}$ a $7,52 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ para o eletrodo compósito GPU e entre $4,98 \times 10^{-7}$ a $9,26 \times 10^{-6}$ para o eletrodo compósito CNTs/PU, sob as melhores condições de velocidade de varredura e amplitude de pulso.

Resultados e discussão

Eletrodo Compósito GPU

O desempenho do eletrodo compósito GPU 60% (m/m) na determinação de genisteína foi avaliado por voltametria de pulso diferencial. Assim, inicialmente, foi realizado um estudo para verificar o efeito da amplitude de pulso sobre a resposta do eletrodo GPU. A amplitude de pulso foi variada entre 10 e 100 mV. Foi utilizada uma solução de genisteína $5,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ em tampão BR pH 2,0. Também se desenvolveu um estudo variando a velocidade de varredura entre 10 e 100 mV s⁻¹ a fim de avaliar o efeito deste parâmetro sobre a resposta do eletrodo GPU. Os parâmetros otimizados são apresentados na Tabela 1. Na Figura 1a é apresentado o voltamograma de pulso diferencial para a genisteína obtido com o eletrodo compósito GPU nas melhores condições

Tabela 1: Parâmetros otimizados

Parâmetro	Intervalo	Escolhido
Amp. de Pulso / mV	10 - 100	100
Vel. de Varredura / mV s ⁻¹	10 - 100	10

Após a otimização dos parâmetros experimentais, uma curva analítica foi obtida para genisteína utilizando o eletrodo GPU. A Figura 2 mostra a

curva resultante, cuja equação obtida foi $I_{pa} (10^{-7}A) = -0,456 (10^{-7}A \text{ mol L}^{-1}) + 1,44 [\text{genisteína}] (10^{-6} \text{ mol L}^{-1})$, com $r = 0,9997$ ($n = 9$) no intervalo de concentração de $9,92 \times 10^{-7}$ a $7,52 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, com limite de detecção de $2,70 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹.

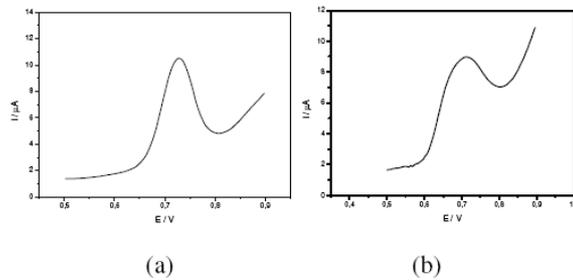


Fig. 1: Voltamogramas de pulso diferencial obtidos com o eletrodo GPU a 10 mV s⁻¹ e amplitude de pulso de 100 mV (a) e eletrodo compósito CNTs/PU 25 mV s⁻¹ e amplitude de pulso de 100 mV (b) utilizando solução de genisteína $5,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ em tampão BR pH 2,0.

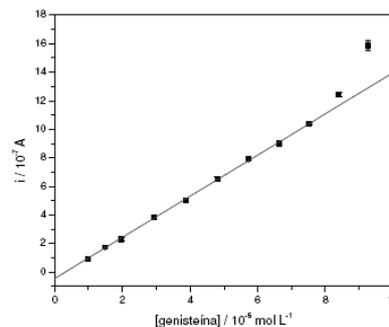


Fig. 2: Curva analítica de genisteína obtida para o eletrodo GPU 60% (m/m) em tampão BR pH 2,0, $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ e amplitude de pulso de 100 mV.

Eletrodo Compósito CNTs/PU

Primeiramente foi investigado o efeito da amplitude de pulso sobre a resposta do eletrodo compósito CNTs/PU 50% (m/m), que foi avaliada entre 10 e 100 mV, utilizando voltametria de pulso diferencial em solução de genisteína $5,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ em tampão BR pH 2,0. Em seguida foi avaliado o efeito da velocidade de varredura para solução de genisteína nas mesmas condições. A avaliação da velocidade de varredura foi efetuada entre 10 e 100 mV s⁻¹. Os parâmetros otimizados são apresentados na Tabela 2. O voltamograma de pulso diferencial obtido para a genisteína nas condições otimizadas é apresentado na Figura 1b.

Tabela 2: Parâmetros otimizados

Parâmetro	Intervalo	Escolhido
Amp. de Pulso / mV	10 - 100	100
Vel. de Varredura / mV s ⁻¹	10 - 100	25

Pode-se observar na Fig. 1 que o processo de oxidação da genisteína ocorre em torno de 730 mV tanto para o eletrodo GPU como para o eletrodo composto CNTs/PU. Pode-se observar ainda, que as correntes de pico apresentaram valores próximos. Era esperado que ao utilizar o eletrodo composto CNTs/PU a corrente de pico para o processo de oxidação da genisteína fosse maior. No entanto, este fato não ocorreu devido, provavelmente, à menor quantidade de CNTs empregado no preparo do eletrodo composto. Contudo, estas observações só ocorrem em altas concentrações de genisteína. Para concentrações da ordem de 10⁻⁷ mol L⁻¹, as correntes de pico encontradas para a genisteína utilizando o eletrodo composto CNTs/PU foram maiores que as encontradas com o eletrodo GPU e isto indica uma maior atividade superficial do eletrodo composto CNTs/PU.

Após otimizar as condições experimentais para o eletrodo composto CNTs/PU 50% (m/m) foi obtida uma curva analítica para o sistema. A Figura 2 mostra a curva resultante, cuja equação obtida foi $I_{pa} (10^{-7}A) = -0,412 (10^{-7}A \text{ mol L}^{-1}) + 1,73 [\text{genisteína}] (10^{-6} \text{ mol L}^{-1})$, com $r = 0,9998$ ($n = 11$) no intervalo de concentração de $4,98 \times 10^{-7}$ a $9,26 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, com limite de detecção de $2,00 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹.

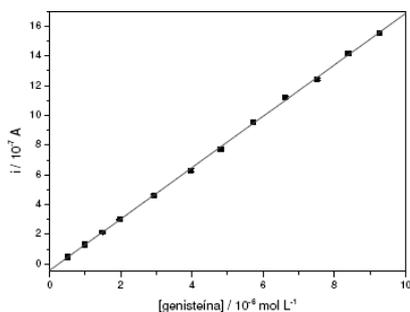


Fig. 2: Curva analítica de genisteína obtida para o eletrodo composto CNTs/PU 50% (m/m) em tampão BR pH 2,0, $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$ e amplitude de pulso de 100 mV.

Foram comparadas figuras de mérito como região linear e limite de detecção para o sistema utilizando eletrodo composto GPU e eletrodo composto CNTs/PU. A Tabela 3 resume os resultados obtidos.

Tabela 3: Figuras de mérito referentes à determinação de genisteína usando eletrodo GPU 60% (m/m) e eletrodo composto CNTs/PU 50% (m/m)

Método	Região linear/ mol L ⁻¹	n	r	LD /mol L ⁻¹
GPU	$9,92 \times 10^{-7} - 7,52 \times 10^{-6}$	9	0,9997	$2,70 \times 10^{-7}$
CNTs/PU	$4,98 \times 10^{-7} - 9,26 \times 10^{-6}$	11	0,9998	$2,00 \times 10^{-7}$

Nota-se que ao utilizar o eletrodo composto CNTs/PU 50% (m/m) ocorre uma diminuição no limite de detecção o que foi atribuída à maior condução eletrônica dos CNTs. Esta diminuição no limite de detecção não foi tão acentuada devido provavelmente, à menor composição da fase condutora no eletrodo composto, visto que dificuldades de homogeneização foram observadas para composições maiores que 50% (m/m) de CNTs. Contudo, é possível observar um aumento na sensibilidade ao utilizar o eletrodo composto CNTs/PU.

Conclusões

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que eletrodos à base de poliuretana apresentam potencialidades analíticas na determinação de genisteína. Pode-se observar que o eletrodo composto CNTs/PU tem maior sensibilidade para a determinação do flavonóide genisteína.

Agradecimentos

CNPQ, FINEP, EMBRAPA

Referências

- IJIMA, S. *Nature*, 354, 56-58, 1991.
 Mendes, R. K.; Claro-Neto, S.; Cavalheiro, E. T. G. *Talanta*, 57, 909-913, 2002.

Desenvolvimento de Metodologia Analítica para a Determinação de Rutina Utilizando Eletrodo de Carbono Vítreo

Jonatas G. da Silva^{1,2} * (PG), Mariana R. L. e Silva^{1,2} (IC), Aline C. de Oliveira^{3,4} (PQ), Maria Carolina B. Moraes¹ (PQ), Luzia Helena C. Lima¹ (PQ), Jurandir R. de Souza² (PQ), Carlos M. P. Vaz (PQ)³ e Clarissa S. P. de Castro¹ (PQ) jonatasg@yahoo.com.br

¹ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, CP 2372, CEP 70.770-917, Brasília – DF

² Instituto de Química, Universidade de Brasília, CP 4394, CEP 70.919-970, Brasília – DF

³ Embrapa Instrumentação Agropecuária, CP 741, CEP 13560-970, São Carlos – SP

⁴ Departamento de Química - UFSCar, CP 676, CEP 13.565-905, São Carlos - SP

Palavras Chave: Rutina, Eletrodo de Carbono vítreo, Voltametria

Introdução

A soja possui alto teor de metabólitos secundários, principalmente os flavonóides, polifenóis responsáveis pela resistência da soja a insetos-praga.^{1,2} Estudos recentes mostraram que cultivares de soja com alta quantidade de rutina, flavonóide glicosilado, apresentaram grande resistência à lagarta da soja, *Anticarsia gematallis*. Atualmente os métodos de cromatografia líquida e de espectrometria de massas têm sido utilizados na determinação de flavonóides; porém, esses métodos são de alto custo, exigem processos laboriosos de preparação de amostra e muitas vezes não preservam a forma química de como esses compostos são encontrados na planta. Os métodos eletroquímicos superam essas desvantagens, pois são métodos não destrutivos, de baixo custo, de alta sensibilidade; podendo ser levados para o campo e por essa razão têm sido aplicados na determinação de flavonóides em suco, chá, medicamentos e fluidos biológicos^{3,4} utilizando eletrodos de mercúrio e carbono. O presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de uma metodologia analítica utilizando o eletrodo de carbono vítreo (GC) e a voltametria de pulso diferencial (DPV) para a determinação de rutina.

Resultados e Discussão

Inicialmente, realizou-se um estudo para a seleção do eletrólito suporte e determinação dos parâmetros voltamétricos ótimos: tampão fosfato pH 7,00, amplitude de pulso 50 mV e velocidade de varredura 5 mVs⁻¹. Uma solução estoque de rutina 1x10⁻³ mol L⁻¹ foi preparada em uma mistura etanol-água 1:1 (v/v). Todas as medidas voltamétricas foram realizadas em triplicata, utilizando-se o analisador voltamétrico Metrohm 797 e uma célula eletroquímica composta pelos eletrodos GC (trabalho), Ag/AgCl (KCl 3 mol L⁻¹) (referência) e platina (auxiliar). O estudo para repetibilidade de resposta do eletrodo de GC para a quantificação de rutina apresentou RSD de 1,6% (n=10). A Figura 1 apresenta os voltamogramas de pulso diferencial obtidos para rutina no intervalo de concentração de 1,96x10⁻⁶ a 4,78x10⁻⁶ mol L⁻¹ e equação $I_{pa}(nA) = -297,79 + 2,66 \times 10^8 [Rutina]$, com coeficiente de correlação de 0,9991. Os valores do Limite de

Detecção (2,06x10⁻⁷ mol L⁻¹) e do Limite de Quantificação (6,85x10⁻⁷ mol L⁻¹) foram calculados por meio das equações LD = 3Sb/b e LQ = 10Sb/b, onde Sb é o desvio padrão das medidas do branco e b é a inclinação da curva analítica.

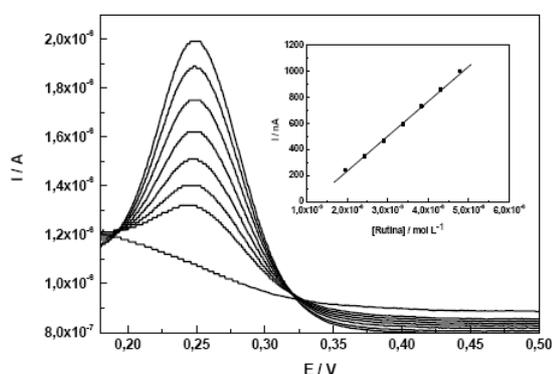


Figura 1. Voltamogramas de pulso diferencial em 10 mL de tampão fosfato pH = 7,00 com adições sucessivas de 20 µL de Rutina 1 x 10⁻⁴ mol L⁻¹. E_i = 0,15V; E_f = 0,5 V, v = 0,005 V s⁻¹, Eletrodo de trabalho: GC, Eletrodo de referência: Ag/AgCl (KCl 3 mol L⁻¹).

Conclusões

A metodologia eletroanalítica desenvolvida, para a determinação de rutina, utilizando o eletrodo de carbono vítreo e a voltametria de pulso diferencial, apresentou baixos limites de detecção e quantificação, boa repetibilidade e sensibilidade, possibilitando a sua aplicação no estudo de cultivares de soja da Embrapa.

Agradecimentos

CENARGEN, UnB, CNPDIA, UFSCar, CNPq e CAPES.

¹ Piubeli, G.C.; Hoffmann-Campo, C.B.; Moscardi, F.; Miyakubo, S.H.; Oliveira, M.C.N.; *J.Chem. Ecol.* 2005, 31, 1509.

² Zhu, J.W.; Park, K.C.; *J.Chem. Ecol.* 2005, 31, 1733.

³ Temerk, Y.M.; Ibrahim, H.S.M.; Schuhmann, W.; *Microchimica Acta* 2006, 153, 7.

⁴ Ensafi, A.A.; Hajjan, R.; *Electroanalysis* 2006, 18, 579.

Desenvolvimento de Método Voltamétrico para a Determinação de Rutina em Grãos e Folhas de Soja

Mariana R. L. e Silva^{1,2} (IC) *, Jonatas G. da Silva^{1,2} (PG), Aline C. de Oliveira^{3,4} (PQ), Maria Carolina B. Moraes¹ (PQ), Luzia Helena C. Lima¹ (PQ), Jurandir R. de Souza² (PQ), Carlos M. P. Vaz (PQ)³ e Clarissa S. P. de Castro¹ (PQ) marlyana_lopes@yahoo.com.br

¹Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, CP 2372, CEP 70.770-917, Brasília – DF

²Instituto de Química, Universidade de Brasília, CP 4394, CEP 70.919-970, Brasília – DF

³Embrapa Instrumentação Agropecuária, CP 741, CEP 13560-970, São Carlos – SP

⁴Departamento de Química - UFSCar, CP 676, CEP 13.565-905, São Carlos – SP

Palavras Chave: Rutina, Eletrodo de Mercúrio, Voltametria, Soja

Introdução

A soja é a oleaginosa mais produzida e consumida no mundo. Uma das conseqüências das grandes áreas cultivadas com soja está relacionada ao aumento de pragas. Nos últimos anos, o desenvolvimento de cultivares de soja resistentes tem sido uma ferramenta alternativa para controle de pragas em substituição aos inseticidas químicos. Um dos principais responsáveis pela resistência da soja a insetos-praga são os metabólitos secundários, principalmente os flavonóides.^{1,2} O desenvolvimento de métodos para a determinação destes metabólitos, em diferentes tecidos das plantas de soja, poderão fornecer dados relevantes sobre como esses compostos são usados no meio ambiente pelas plantas na defesa contra insetos-praga. Os métodos voltamétricos de redissolução têm sido aplicados na determinação do flavonóide de rutina, na forma complexada com íons Cu(II), em chá verde.³ Neste contexto, este trabalho tem como objetivo desenvolver um método para a determinação de rutina em grãos e folhas de soja, empregando a voltametria de redissolução catódica (CSV).

Resultados e Discussão

A determinação eletroanalítica da rutina, na forma complexada com íons Cu(II), foi realizada por meio da CSV utilizando-se o analisador voltamétrico Metrohm 797 e uma célula eletroquímica composta pelos eletrodos HMDE (trabalho), Ag/AgCl (KCl 3 mol L⁻¹) (referência) e platina (auxiliar). As soluções padrão de rutina foram preparadas em etanol-água 1:1 (v/v). Inicialmente foram otimizados os parâmetros voltamétricos e as condições experimentais do método: eletrólito suporte tampão fosfato pH 6,00, potencial de deposição 1,0 V, amplitude de pulso 70 mV, velocidade de varredura 60 mV s⁻¹, tempo de deposição 180 s e concentração de Cu(II) 1,57x10⁻⁶ mol L⁻¹. Em seguida foi obtida a curva analítica pelo método de adição de padrão (Figura 1). A curva analítica apresentou a equação $I_{pc} \text{ (nA)} = 10,07 + 1,86 \times 10^8 [\text{Rutina}]$ ($r = 0,9999$) e linearidade entre

1,96x10⁻⁷ a 1,35x10⁻⁶ mol L⁻¹, com limite de detecção 7,00x10⁻⁹ mol L⁻¹ e limite de quantificação 2,20x10⁻⁸ mol L⁻¹, calculados a partir de: LD = 3Sb/b ; LQ = 10Sb/b, onde Sb é o desvio padrão das medidas do branco e b é a inclinação da curva analítica.

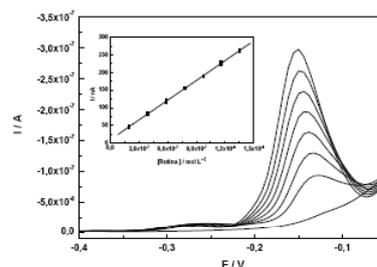


Figura 1. Voltamogramas de redissolução catódica de pulso diferencial para 160 μL de Cu^{2+} 1×10^{-4} mol L⁻¹ em 10 mL de tampão fosfato pH = 6,00 com adições sucessivas de 20 μL de Rutina 1×10^{-4} mol L⁻¹. $E_d = -1,0$ V, $t_d = 180$ s, $E_i = 0,1\text{V}$; $E_f = -0,4$ V, $v = 0,060$ V s⁻¹, Eletrodo de trabalho: HMDE, Eletrodo de referência: Ag/AgCl (KCl 3 mol L⁻¹).

O método desenvolvido foi aplicado na determinação de rutina em grãos e folhas de duas cultivares de soja (Pioneer P98R62 e IAC-100) e os primeiros resultados indicaram a ausência deste flavonóide nas plantas.

Conclusões

O método desenvolvido, empregando a CSV, apresentou boa sensibilidade e baixos limites de detecção e quantificação, tornando-se uma excelente alternativa para a determinação de rutina em grãos e folhas de soja.

Agradecimentos

CENARGEN, UnB, CNPDIA, UFSCar, CNPq e CAPES.

¹ Piubeli, G.C.; Hoffmann-Campo, C.B.; Moscardi, F.; Miyakubo, S.H.; Oliveira, M.C.N.; *J. Chem. Ecol.* **2005**, *31*, 1509.

² Zhu, J.W.; Park, K.C.; *J. Chem. Ecol.* **2005**, *31*, 1733.

³ Malagutti, A.R.; Zuin, V.G.; Cavalheiro, E.T.G.; Mazo, L.H.; *Electroanalysis* **2006**, *18*, 1028.

Avaliação das potencialidades analíticas do eletrodo compósito GPU na determinação de genisteína na presença de rutina

Aline Carlos de Oliveira¹ (PQ)*, Carlos Manoel Pedro Vaz¹(PQ), Jonatas Gomes da Silva (PG)², Clarissa Silva Pires de Castro (PQ)³, Lúcia Helena Mascaro⁴ (PQ)

1 Embrapa Instrumentação Agropecuária, São Carlos – SP – Brasil

2 Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília – DF – Brasil

3 Instituto de Química, Universidade de Brasília, Brasília – DF – Brasil

4 Departamento de Química - UFSCar, São Carlos - SP – Brasil

*alineplis@yahoo.com.br

Palavras Chave: GPU, genisteína, voltametria de pulso diferencial.

Introdução

O desenvolvimento de eletrodos compósitos à base de carbono tem se mostrado uma alternativa promissora na busca de novos materiais eletródicos. Dentre esses eletrodos, pode-se destacar o eletrodo compósito à base de grafite e poliuretana (GPU), que desde sua apresentação, em 2002¹, vem despertando grande interesse devido as suas propriedades e potenciais aplicações, especialmente em determinações de compostos orgânicos. Entre esses compostos encontra-se a genisteína que é um flavonóide amplamente encontrado em frutas e vegetais como a soja. Esse flavonóide, juntamente com inúmeros metabólitos secundários, é responsável pelas funções defensivas contra microorganismos e pestes. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar a possível aplicação do compósito GPU na determinação de genisteína na presença do flavonóide rutina.

Resultados e Discussão

O desempenho do eletrodo compósito GPU 60% (m/m) na determinação de genisteína foi avaliado por voltametria de pulso diferencial. Assim, inicialmente, foi realizado um estudo para verificar o efeito da amplitude de pulso sobre a resposta do eletrodo GPU. A amplitude de pulso foi variada entre 10 e 100 mV. Foi utilizada uma solução de genisteína $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão BR pH 2,0. Também se desenvolveu um estudo variando a velocidade de varredura entre 10 e 100 mV s^{-1} a fim de avaliar o efeito deste parâmetro sobre a resposta do eletrodo GPU. Os parâmetros otimizados são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros otimizados

Parâmetro	Intervalo	Escolhido
Amp. de Pulso / mV	10 - 100	100
Vel. de Varredura / mV s^{-1}	10 - 100	10

Após a otimização dos parâmetros experimentais, uma curva analítica foi obtida para genisteína

15^o Encontro Nacional de Química Analítica e 3^o Congresso Iberoamericano de Química Analítica.

utilizando o eletrodo GPU. A Figura 1 mostra a curva resultante, cuja equação obtida foi $I_{pa} (10^{-7} \text{ A}) = -0,456 (10^{-7} \text{ A mol L}^{-1}) + 1,44 [\text{genisteína}] (10^{-6} \text{ mol L}^{-1})$, com $r = 0,9997$ ($n = 9$) no intervalo de concentração de $9,92 \times 10^{-7}$ a $7,52 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, com limite de detecção de $2,67 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$.

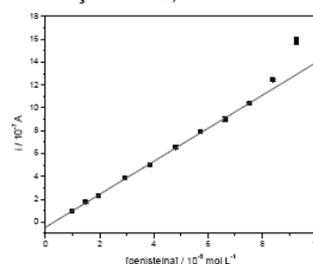


Figura 1. Curva analítica de genisteína obtida para o eletrodo GPU 60% (m/m) em tampão BR pH 2,0, $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ e amplitude de pulso de 100 mV.

O efeito do flavonóide rutina, também presente em soja, sobre a resposta do eletrodo GPU 60% (m/m) na determinação de genisteína foi avaliado. Nesse caso foram realizadas curvas de recuperação fixando a concentração de genisteína e variando-se a concentração de rutina. Os resultados obtidos neste estudo apresentaram coeficiente de recuperação de 91% (para concentração de rutina 50 vezes maior que a concentração de genisteína) e estão dentro dos valores permitidos pela AOAC (entre 70 e 130%). Esses resultados indicam que há possibilidade para uma futura aplicação destes eletrodos na análise de genisteína em amostra de soja.

Conclusões

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que eletrodo GPU 60 % (m/m) apresentam potencialidades analíticas para determinação de genisteína.

Agradecimentos

FAPESP, CAPES e CNPq

¹Mendes, R. K.; Claro-Neto, S. e Cavalheiro, E. T. G.. *Talanta*, 2002, 57, 909.

XIV Encontro do Talento Estudantil/2009

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA A DETERMINAÇÃO DE GENISTEÍNA UTILIZANDO ELETRODO DE CARBONO VÍTREO (Development of an analytical methodology for the determination of genistein using a glassy carbon electrode)

Silva, J.G.,¹ Silva, M.R.L.,² Oliveira, A.C.,³ Moraes, M.C.B.,⁴ Lima, L.H.C.,⁵ Souza, J.R.,⁶ Vaz, C.M.P.,⁷ Castro, C.S.P.⁸

A soja é a oleaginosa mais produzida e consumida no mundo. Uma das conseqüências das grandes áreas cultivadas com soja está relacionada ao aumento de pragas. Nos últimos anos, o desenvolvimento de cultivares de soja resistentes tem sido uma ferramenta alternativa para controle de pragas em substituição aos inseticidas químicos. Um dos principais responsáveis pela resistência da soja a insetos-praga são os metabólitos secundários, principalmente os flavonóides. Atualmente os métodos de cromatografia líquida e de espectrometria de massas têm sido utilizados na determinação de flavonóides; porém, esses métodos são de alto custo, exigem processos laboriosos de preparação de amostra e muitas vezes não preservam a forma química de como esses compostos são encontrados na planta. Os métodos eletroquímicos superam essas desvantagens, pois são métodos não destrutivos, de baixo custo, de alta sensibilidade; podendo ser levados para o campo e por essa razão têm sido aplicados na determinação de flavonóides em suco, chá, medicamentos e fluídos biológicos utilizando eletrodos de mercúrio e carbono. O presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de uma metodologia analítica utilizando o eletrodo de carbono vítreo (GC) e a voltametria de pulso diferencial (DPV) para a determinação do flavonóide genisteína. Inicialmente, realizou-se um estudo para a seleção do eletrólito suporte e determinação dos parâmetros voltamétricos ótimos: tampão fosfato pH 6,00, amplitude de pulso 50 mV e velocidade de varredura 50 mVs⁻¹. Uma solução estoque de genisteína 1x10⁻³ mol L⁻¹ foi preparada em uma mistura etanol-água 1:1 (v/v). Todas as medidas voltamétricas foram realizadas em triplicata, utilizando-se o analisador voltamétrico Metrohm 797 e uma célula eletroquímica composta pelos eletrodos GC (trabalho), Ag/AgCl (KCl 3 mol L⁻¹) (referência) e platina (auxiliar). O estudo para repetibilidade de resposta do eletrodo de GC para a quantificação de genisteína apresentou RSD menor que 1,0% (n=10). A curva analítica, obtida pelo método de adição de padrão, apresentou a equação $I_{pa}(nA) = -8,38 + 5,71 \times 10^7 [Genisteína]$ ($r = 0,9988$), e linearidade entre 1x10⁻⁶ a 1x10⁻⁵ mol L⁻¹, com limite de detecção 1,20x10⁻⁷ mol L⁻¹ e limite de quantificação 3,99x10⁻⁷ mol L⁻¹, calculados a partir de: LD = 3Sb/b ; LQ = 10Sb/b, onde Sb é o desvio padrão das medidas do branco e b é a inclinação da curva analítica. A metodologia eletroanalítica desenvolvida, para a determinação de genisteína, utilizando o eletrodo de carbono vítreo e a voltametria de pulso diferencial, apresentou baixos limites de detecção e quantificação, boa repetibilidade e sensibilidade, possibilitando a sua aplicação no estudo de cultivares de soja da Embrapa quanto à identificação e quantificação de flavonóides.

Apoio: CENARGEN, UnB, CNPDIA, UFSCar, CNPq e CAPES.

¹Químico, Doutorando, Universidade de Brasília - UnB

²Química, Graduanda, Universidade de Brasília - UnB

³Química, Pós-doutoranda, Universidade Federal de São Carlos - UFSCar

⁴Química, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

⁵Bióloga, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

⁶Químico, Ph.D., Universidade de Brasília - UnB

⁷Físico, Ph.D., Embrapa Instrumentação Agropecuária

⁸Química, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

XIV Encontro do Talento Estudantil/2009

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO ELETROQUÍMICO PARA A DETERMINAÇÃO DE FLAVONÓIDES EM SOJA UTILIZANDO ELETRODO DE MERCÚRIO (Development and validation of an electrochemical method for determination of flavonoids in soybean using a mercury electrode)

Silva, M.R.L.,¹ Silva, J.G.,² Oliveira, A.C.,³ Moraes, M.C.B.,⁴ Lima, L.H.C.,⁵ Souza, J.R.,⁶ Vaz C.M.P.,⁷ Castro C.S.P.⁸

A cultura da soja (*Glycine max*) no Brasil e no resto mundo, apresentou nas últimas décadas, um crescimento de mais de 100% de área cultivada quando comparado à década de 70. Vários estudos vêm demonstrando que algumas variedades de soja apresentam uma eficiente defesa contra insetos herbívoros. Estas variedades mais resistentes a insetos-praga apresentam alto teor de flavonóides, metabólitos secundários com importantes funções defensivas contra microorganismos e pestes. Portanto, a identificação e quantificação de possíveis flavonóides que possam ser usados no campo em armadilhas, no desenvolvimento de plantas melhoradas geneticamente, apresentam grande interesse e potencial para sua utilização no manejo de pragas. Neste contexto, este trabalho tem como objetivo desenvolver um método para a determinação dos flavonóides rutina e genisteína, na forma complexada com íons Cu(II), em grãos e folhas de soja, empregando a voltametria de redissolução catódica (CSV) e o eletrodo de mercúrio (HMDE). Para a realização das medidas voltamétricas, utilizou-se o analisador voltamétrico Metrohm 797 e uma célula eletroquímica composta pelos eletrodos HMDE, Ag/AgCl e platina. Inicialmente, foram otimizados os parâmetros voltamétricos e as condições experimentais para a detecção e quantificação de rutina e genisteína em soja: eletrólitos suporte tampão fosfato 6,00 (rutina) e tampão fosfato 7,00 (genisteína), potencial de deposição 1,0 V (para ambos), amplitude de pulso 70 mV (para ambos), velocidade de varredura 50 mV s⁻¹ (para ambos), tempo de deposição 180 s (para ambos) e concentração de Cu(II) 1,57x10⁻⁶ mol L⁻¹ (para ambos). Em seguida, as curvas analíticas foram obtidas pelo método de adição padrão, apresentando para a rutina equação $I_{pc} \text{ (nA)} = 10,07 + 1,86 \times 10^8 [\text{Rutina}]$ ($r = 0,9999$) e linearidade entre 1,96x10⁻⁷ a 1,35x10⁻⁶ mol L⁻¹, com limite de detecção 7,00x10⁻⁹ mol L⁻¹ e limite de quantificação 2,20x10⁻⁸ mol L⁻¹; e para a genisteína equação $I_{pc} \text{ (nA)} = 4,09 + 1,78 \times 10^7 [\text{Genisteína}]$ ($r = 0,9980$) e linearidade entre 9,71x10⁻⁷ a 4,88x10⁻⁶ mol L⁻¹, com limite de detecção 6,9 x10⁻⁸ mol L⁻¹ e limite de quantificação 2,3x10⁻⁷ mol L⁻¹. O método desenvolvido apresentou boa sensibilidade e baixos limites de detecção e quantificação e foi aplicado na determinação de rutina em grãos e folhas de duas cultivares de soja (Pioneer P98R62 e IAC-100). Os primeiros resultados indicaram a ausência deste flavonóide nas plantas. O estudo de recuperação variou entre 96 e 100% indicando que não há interferência da matriz. Apoio: CENARGEN, UnB, CNPDIA, UFSCar, CNPq e CAPES.

¹Química, Graduanda, Universidade de Brasília - UnB

²Químico, Doutorando, Universidade de Brasília - UnB

³Química, Pós-doutoranda, Universidade Federal de São Carlos - UFSCar

⁴Química, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

⁵Bióloga, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

⁶Químico, Ph.D., Universidade de Brasília - UnB

⁷Físico, Ph.D., Embrapa Instrumentação Agropecuária

⁸Química, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia



Circular Técnica

Brasília, DF
Dezembro, 2009

Autores

Mariana Rodrigues Lopes e Silva
Graduanda, Química
Universidade de Brasília
marynana_lopes@yahoo.com.br

Jonatas Gomes da Silva
Doutorando, Químico
Universidade de Brasília
jonatasg@yahoo.com.br

Aline Carlos de Oliveira
Pós-doutoranda, Química
Universidade Federal de
São Carlos
alineplis@yahoo.com.br

Maria Carolina Blassioli Moraes
PhD, Química
Embrapa Recursos Genéticos e
Biotecnologia
mcbmorae@cenargen.embrapa.br

Luzia Helena Corrêa Lima
PhD, Bióloga
Embrapa Recursos Genéticos e
Biotecnologia
luzia@cenargen.embrapa.br

Jurandir Rodrigues de Souza
PhD, Químico
Universidade de Brasília
rdsouza@unb.br

Carlos Manoel Pedro Vaz
PhD, Físico
Embrapa Instrumentação
Agropecuária
Vaz@cnpdia.embrapa.br

Clarissa Silva Pires de Castro
PhD, Química
Embrapa Recursos Genéticos e
Biotecnologia
clarissa@cenargen.embrapa.br



Desenvolvimento e validação de um método eletroquímico para a determinação de rutina em soja utilizando-se eletrodo de mercúrio

Introdução

A cultura de soja (*Glycine max*) apresentou um aumento de mais de 100% em termos de áreas cultivadas desde a década de 70, expandindo-se não só para o Cerrado, mas também para as regiões Norte e Nordeste (PORTUGAL, 1999). Essa expansão se deve, principalmente, à grande importância dessa cultura, uma vez que é a principal fonte de óleo e proteína vegetal para o consumo animal e humano.

Uma das consequências desse crescimento de áreas cultivadas foi um aumento no número de pragas, sendo o percevejo o principal exemplo (BELORE et al., 2003). Esses insetos atuam, preferencialmente, sugando os grãos da oleaginosa e causando danos crescentes à produção, uma vez que afetam o rendimento e a qualidade das sementes, além de causar distúrbios fisiológicos.

As plantas possuem um sistema de defesa que lhes confere resistência contra insetos, fungos e bactérias. Um eficiente sistema de defesa da planta que pode ser manipulado e utilizado no monitoramento integrado de pragas é o sistema químico, composto geralmente por metabólitos secundários voláteis e não voláteis, que podem ser induzidos ou constitutivos (DICKE e van LOON, 2000; ARAB e BENTO, 2006; HEIL, 2008). Estudos apontam que algumas variedades de soja apresentam uma eficiente defesa contra insetos herbívoros (RIBEIRO et al., 2007, MICHHEREFF et al., 2009). Estas variedades mais resistentes a pragas apresentam diferentes características físicas e químicas que as tornam mais resistentes. Dentre as características químicas, os principais compostos responsáveis pela resistência a pragas são os flavonoides. Portanto, a identificação e a quantificação desses metabólitos secundários nas diferentes cultivares podem gerar importantes informações para os melhoristas na escolha das cultivares, visando ao melhoramento, tanto o clássico quanto o transgênico. Desta forma, é possível avaliar e conhecer mais claramente quais os efeitos e o porquê da resistência, e inclusive auxiliar a busca de genes responsáveis pela produção desses metabólitos secundários (PEREZ e ORMENONUNEZ, 2005; PICKETT et al., 2007; PIUBELLI et al., 2003a, 2003b; MORAES et al., 2005; PAREJA et al., 2007; BUKOVINSZKY et al., 2005).

Para a utilização correta dos metabólitos secundários no monitoramento integrado de pragas, faz-se necessário o conhecimento a respeito da forma como esses compostos são usados no meio ambiente pelas plantas, isto é, importa conhecer a taxa de liberação, a quantidade produzida e sua interação alelopática entre planta-herbívoro e planta-herbívoro-inimigo natural (MORAES et al., 2008, 2009, HEIL, 2008). Atualmente, vários métodos analíticos têm sido propostos para a identificação e a quantificação de metabólitos secundários em soja, tais como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e a cromatografia gasosa (CG), combinados ou não a espectrometria de massas (MS). No entanto, essas técnicas apresentam algumas desvantagens: são de grande porte, o que dificulta

a adaptação delas ao campo; têm altos custos, devido à manutenção dos equipamentos e a gastos com reagentes; exigem laboriosos processos de preparação da amostra (como etapas de separação e pré-tratamento), grandes quantidades de solventes de alta pureza e técnicos especializados; e as análises são mais suscetíveis a interferentes e não preservam a amostra.

Nesse contexto, os métodos eletroquímicos apresentam vantagens, uma vez que podem ser adaptados ao campo, possuem tempo de análise e custos reduzidos, apresentam alta sensibilidade e baixos limites de detecção, além de permitirem a análise direta da amostra e não serem destrutivos. Por isso, os métodos eletroquímicos vêm sendo utilizados para avaliar a capacidade antioxidante de flavonoides e ácidos fenólicos e quantificá-los em alimentos, medicamentos e fluidos biológicos.

A possibilidade de uso desses compostos se deve à sua eletroatividade, ou seja, à facilidade com que os metabólitos secundários sofrem reações de óxido-redução em eletrodos inertes. Na maioria dos trabalhos publicados, a voltametria adsorviva de redissolução catódica (CAAdSV), combinada com os eletrodos de mercúrio gota pendente (HMDE) e de carbono, têm sido o método e os eletrodos de trabalho mais utilizados para a determinação de diversos flavonoides (rutina, naringina, fisetina, galangina, morina, quercetina, ramelina, hesperidina, hesperitina) em sucos, chás, medicamentos e fluidos biológicos, na forma livre ou complexada com íons metálicos – (Cu(II) e Hg(II)). Dessa forma, esses métodos eletroanalíticos proporcionam processos de análise mais eficientes (rápidos, diretos e com custos reduzidos) e com limites de detecção da ordem de 10^{-9} mol L⁻¹ e quantificação da ordem de 10^{-8} mol L⁻¹ (TEMERK et al., 2006; ENSAFI e HAJJAN, 2006; ZOULIS e CONSTANTINOS, 1996; REICHART e OBENDORF, 1998).

A CAAdSV consiste basicamente em duas etapas: na primeira, ocorre adsorção ou acumulação do complexo formado pela molécula orgânica (rutina) com o metal – (Cu(II)), sobre a superfície do HMDE, por um tempo determinado; na segunda etapa, empregando-se a técnica de pulso diferencial (DP), ocorre a redução do complexo Cu(II)-rutina (TEMERK et al., 2006; ENSAFI e HAJJAN, 2006). No voltamograma adsorvivo de redissolução catódica (Figura 1), para

rutina $5,87 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ em tampão fosfato pH 6 na presença de Cu(II) $1,57 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, observa-se um sinal em -0,150 V correspondente à redução do complexo Cu(II)-rutina. Este sinal é proporcional à concentração de rutina na célula eletroquímica, podendo ser utilizado na detecção e quantificação desse flavonoide em grãos e folhas de soja.

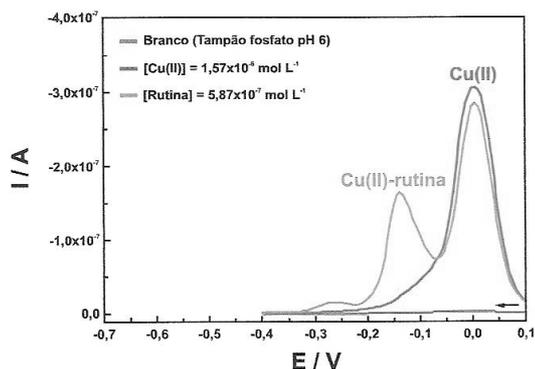


Figura 1. Voltamogramas adsorvivos de redissolução catódica de pulso diferencial para 160 μ L de Cu(II) $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ em 10 mL de tampão fosfato pH 6 com 60 μ L Rutina $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. $E_{sc} = -1,000$ V, $t_{ac} = 180$ s, $E_i = 0,100$ V; $E_f = -0,400$ V, $v = 50$ mV s⁻¹, Eletrodo de trabalho: HMDE, Eletrodo de referência: Ag/AgCl (KCl 3 mol L⁻¹).

O objetivo deste trabalho é o desenvolvimento e a validação de um método de análise para a determinação de rutina (Figura 2) em grãos e folhas de soja, empregando a CAAdSV com DP.

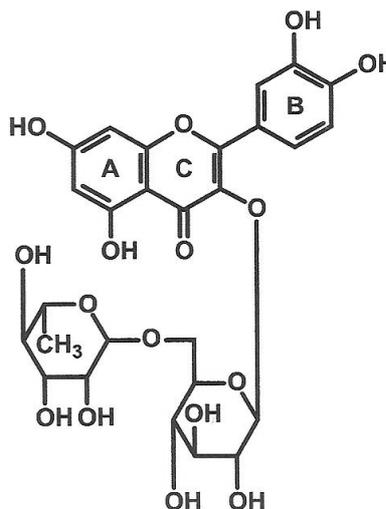


Figura 2. Estrutura química da rutina.

Parte experimental

Equipamentos

As medidas voltamétricas foram realizadas em triplicata, utilizando-se o analisador voltamétrico 797 VA Computrace (Metrohm, Suíça) e uma célula eletroquímica composta pelos eletrodos HMDE (eletrodo de trabalho), Ag/AgCl (KCl 3 mol L⁻¹) (eletrodo de referência) e platina (eletrodo auxiliar). As medidas de CAAdSV foram realizadas no intervalo de potencial de -0,100 V (potencial inicial, E_i) a -1,100 V (potencial final, E_f) com os seguintes parâmetros: potencial de acumulação (E_{ac}) de -1,000 V, tempo de acumulação (t_{ac}) de 180 s, tempo de equilíbrio (t_e) de 10 s, área do eletrodo de mercúrio de 0,3 mm², amplitude de pulso de 70 mV e velocidade de varredura (v) de 50 mV s⁻¹. Determinou-se o pH das soluções com a utilização do medidor de pH 3030 Jenway (Reino Unido) e o eletrodo de pH combinado DME-CV1/Digimed (Brasil).

Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e as soluções foram preparadas com água ultrapura (Millipore, EUA). Preparou-se a solução estoque de rutina (Sigma-Aldrich, Brasil) 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹ em uma mistura etanol-água 1:1 (v/v). A solução-padrão de cobre 1000 mg L⁻¹ foi adquirida da Fluka (Suíça). As soluções de tampão Britton-Robinson (B-R) na faixa de pH 3 – 12 foram preparadas com a utilização dos ácidos fosfórico, acético e bórico (Sigma-Aldrich, Brasil). As soluções de tampão fosfato no intervalo de pH 3 – 12 foram preparadas com a utilização de fosfato de sódio dibásico, fosfato de potássio monobásico e ácido fosfórico (Sigma-Aldrich, EUA). Utilizaram-se hidróxido de sódio e ácido clorídrico (Sigma-Aldrich, Alemanha), ambos concentrados, para ajustar os valores de pH. As folhas de soja IAC-100 (Embrapa Hortaliças, Brasil), produzidas em casa de vegetação (T = 27 ± 2 °C, UR = 70%), foram colhidas no estágio de crescimento V6 (FEHR e CAVINESS, 1977). Os grãos de soja P98R62 (Pioneer Sementes, Brasil) foram coletados na região Centro-Oeste do país (15°56'20.06"S Latitude, 47°34'54.14"O Longitude). As folhas e os grãos de soja foram preparados para a análise voltamétrica por meio da utilização do procedimento padrão da Embrapa Soja para extração de isoflavonoides (CARRÃO-PANIZZI et al., 2002; PARK, 2001).

Procedimento

A influência do eletrólito suporte e do pH na corrente do complexo Cu(II)-rutina, utilizando-se a CAAdSV, foi estudada por meio da adição de 100 μL de Cu(II) 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ e 100 μL de rutina 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ na célula eletroquímica contendo 10 mL de tampão B-R (4,0 x 10⁻² mol L⁻¹ H₃PO₄, 4,0 x 10⁻² mol L⁻¹ CH₃COOH e 4,0 x 10⁻² mol L⁻¹ H₃BO₃) ou tampão fosfato (2,0 x 10⁻² mol L⁻¹ H₃PO₄; 1,2 x 10⁻³ – 5,7 x 10⁻² mol L⁻¹ Na₂HPO₄; 1,2 x 10⁻¹ – 4,5 x 10⁻³ mol L⁻¹ KH₂PO₄ e 4,6 x 10⁻³ – 7,7 x 10⁻² mol L⁻¹ Na₃PO₄) no intervalo de pH 3 – 12.

Realizou-se o estudo da influência do potencial de acumulação (no intervalo de -1,200 – -0,500 V), da amplitude de pulso (no intervalo de 10 – 100 mV), da velocidade de varredura (no intervalo de 5 – 600 mV s⁻¹) e do tempo de acumulação (no intervalo de 30 – 300 mV) na corrente do complexo Cu(II)-rutina, utilizando-se a CAAdSV, por meio da adição de 100 μL de Cu(II) 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ e 100 μL de rutina 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ na célula eletroquímica contendo 10 mL de tampão fosfato pH 6.

Verificou-se o efeito da concentração de cobre na corrente do complexo Cu(II)-rutina, utilizando-se a CAAdSV, por meio da adição de 100 μL de rutina 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ com adições sucessivas de 20 μL de Cu(II) 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ na célula eletroquímica contendo 10 mL de tampão fosfato pH 6.

Obteve-se a curva analítica, utilizando-se a CAAdSV, por meio de adições sucessivas de 20 μL de rutina 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ na célula eletroquímica contendo 10 mL de tampão fosfato pH 6 e 160 μL de Cu(II) 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹.

Determinou-se a rutina em amostra de soja por meio de adições sucessivas de 20 ou 50 μL de rutina 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ na célula eletroquímica contendo 10 mL de tampão fosfato pH 6, 160 μL de Cu(II) 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ e 40 ou 50 μL da amostra de soja.

Resultados e discussão

Os parâmetros voltamétricos e as condições experimentais otimizadas para a determinação de rutina, utilizando-se a CAAdSV com DP, são mostrados na tabela abaixo:

Tabela 1. Parâmetros voltamétricos e condições experimentais otimizadas para a determinação de rutina, utilizando-se a CAdSV com DP.

Eletrólito suporte e pH	Tampão fosfato pH 6
Potencial de acumulação	-1,000 V
Amplitude de pulso	70 mV
Velocidade de varredura	50 mV s ⁻¹
Tempo de acumulação	180 s
Concentração de Cu ²⁺	1,6 x 10 ⁻⁶ mol L ⁻¹

Após a otimização dos parâmetros voltamétricos, obteve-se a curva analítica para a rutina em tampão fosfato pH 6. A curva analítica (Figura 3), no intervalo de concentração de $2,0 \times 10^{-7}$ a $1,4 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, apresentou a equação I_{pc} (nA) = $10,070 + 1,9 \times 10^8$ [Rutina] ($r = 0,999$), com Limite de Detecção (LD) $7,0 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹ e Limite de Quantificação (LQ) $2,2 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹, calculados a partir de: LD = 3Sb/b; LQ = 10Sb/b, em que Sb é o desvio padrão das medidas do branco e b é a inclinação da curva analítica (MILLER e MILLER, 1993).

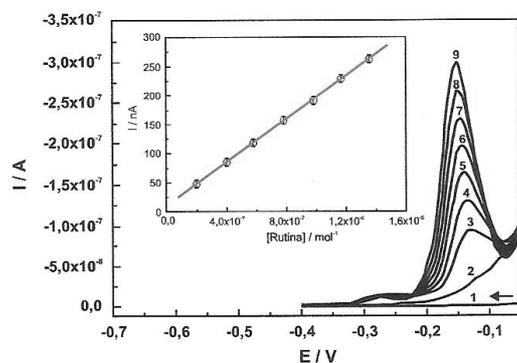


Figura 3. Voltamogramas adsorptivos de redissolução catódica de pulso diferencial obtidos para Cu(II) $1,6 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ (2) em 10 mL de tampão fosfato pH 6 (1) em diferentes concentrações de rutina: $2,0 \times 10^{-7}$ (3); $3,9 \times 10^{-7}$ (4); $5,9 \times 10^{-7}$ (5); $7,8 \times 10^{-7}$ (6); $9,7 \times 10^{-7}$ (7); $1,2 \times 10^{-6}$ (8) e $1,4 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ (9). Inserção: Curva analítica. $E_{acc} = -1,000$ V, $t_{acc} = 180$ s, $E_i = 0,100$ V; $E_s = -0,400$ V, amplitude de pulso = 70 mV, $v = 50$ mV s⁻¹, Eletrodo de trabalho: HMDE, Eletrodo de referência: Ag/AgCl (KCl 3 mol L⁻¹).

Utilizou-se o método desenvolvido, juntamente com o método de adição de padrão, para a determinação de rutina em duas cultivares de soja. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 2. Observa-se que

nos grãos da cultivar P98R62 não foi detectada rutina. Este resultado já era esperado, pois em grãos de soja os principais isoflavonoides presentes são a genistina, daidzina e suas formas agliconas (CARRÃO-PANIZZI et al., 2002). No entanto, para as folhas da cultivar IAC 100, este flavonoide foi detectado com concentração média de 0,197 mg/g. Este valor foi muito inferior ao encontrado por Piubelli et al. (2005) utilizando HPLC na determinação de rutina em folhas de soja do mesmo genótipo (IAC 100), produzidas em casa de vegetação ($T = 23 \pm 2$ °C, UR = 78%) na região Sul do Brasil (temperatura média local de 23 °C). Entretanto, esta diferença pode ser atribuída às altas temperaturas da região Centro-Oeste do Brasil (temperatura média de 27 °C, reproduzida em casa de vegetação) durante o desenvolvimento dos grãos, pois demonstrou-se que a temperatura foi o principal fator na determinação dos níveis de flavonoides em grãos de soja (TSUKAMOTO et al., 1995). Carrão-Panizzi et al. (1995, 1999) também observaram uma variação na concentração de flavonoides entre cultivares de soja produzidas em diferentes regiões do país. A recuperação de rutina adicionada variou de 94 a 105%, indicando ausência de efeito de matriz.

Tabela 2. Determinação de rutina em amostras de soja.

P98R62 (Grãos)	-	-
IAC 100 (Folhas)	$0,197 \pm 0,038$	$0,972 \pm 0,082^b$

^aValores médios para três determinações independentes.
^bPiubelli et al. (2005).

Conclusão

O método eletroanalítico desenvolvido, baseado na acumulação do complexo Cu(II)-rutina no HMDE, apresentou baixos limites de detecção e quantificação para a rutina, além de uma faixa de recuperação indicativa de que não há interferência de matriz. Aplicou-se este método com sucesso na determinação de rutina em grãos e folhas de duas cultivares de soja. A diferença entre o resultado obtido na determinação de rutina nas folhas da cultivar IAC 100 (cultivada na região Centro-Oeste), utilizando-se CAdSV, e o resultado encontrado na literatura para a mesma cultivar produzida na região Sul do Brasil, utilizando-se HPLC, sugere que a temperatura durante o desenvolvimento do grão é um fator importante na determinação

dos níveis de flavonoides em grãos de soja. Os resultados obtidos podem ser aplicados futuramente no manejo integrado de pragas e em programas de melhoramento genético, contribuindo para a sustentabilidade de sistemas agrícolas baseados na produção de soja.

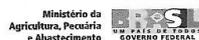
Referências bibliográficas

- ARAB, A.; BENTO, J. M. S. Plant volatiles: new perspectives for research in Brazil. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 35, n. 2, p. 151-158, 2006.
- BELORE, L. C.; RAMIRO, Z. A.; FARIA, A. M.; MARINO, C. A. B. Danos causados por percevejo (Hemiptera: Pentatomidae) em cinco cultivares de soja (GLYCINE MAX) no município de Araçatuba, SP. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 70, n. 2, p. 169-175, 2003.
- BUKOVINSZKY, T.; GOLS, R.; POSTHUMUS, M. A.; VET, L. E. M.; VAN LENTEREN, J. C. Variation in plant volatiles and attraction of the parasitoid *Diadegma semiclausum* (Hellén). **Journal of Chemical Ecology**, Amsterdam, v. 31, n. 3, p. 461-480, 2005.
- CARRÃO-PANIZZI, M. C.; BELÉIA, A. D. P.; KITAMURA, K., OLIVEIRA, M. C. N. Effects of genetics and environment on isoflavone content of soybean from different regions of Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 10, p. 1787-1795, 1999.
- CARRÃO-PANIZZI, M. C.; FAVONI, S. P. G.; KIKUCHI, A. Extration time for soybean isoflavone determination. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 45, n. 4, p. 515-518, 2002.
- CARRÃO-PANIZZI, M. C.; KITAMURA, K.; Isoflavone content in Brazilian soybean cultivars. **Breeding Science**, Kyoto, v. 45, n. 3, p. 295-300, 1995.
- DICKE, M; van LOON, J. J. A. Multitrophic effects of herbivore- induced plant volatiles in an evolutionary context. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v.9, p. 237-249, 2000.
- ENSAFI, A. A.; HAJJAN, R. Determination of rutin in pharmaceutical compounds and tea using cathodic adsorptive stripping voltammetry. **Electroanalysis**, Weinheim, v. 18, n. 6, p. 579-585, 2006.
- FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. **Stages of soybean development**. Ames: Iowa State University, 1977. 12p. (Special Report, 80).
- HEIL M. Indirect defence via tritrophic interactions. **New Phytologist**, London, v. 178, n. 1, p. 41-61, 2008.
- MICHEREFF, M. F. F.; MORAES, M. C. B.; DINIZ, I. R.; LAUMANN, R. A.; BORGES, M. Interação tri-trófica soja-Euschistus heros (Hemiptera: Pentatomidae) - *Telenomus podisi* (Hymenoptera: Scelionidae). In: ENCONTRO BRASILEIRO DE ECOLOGIA QUÍMICA, 6, 2009, Viçosa, MG. **Resumos**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2009. p. 59.
- MILLER, J. A.; MILLER, J. N. Statistics for analytical chemistry. 3.ed. New York: Ellis Horwood, 1993. 233 p.
- MORAES, M. C. B.; LAUMANN, R. A.; PIRES, C. S.; SUJI, E. R.; BORGES, M. Induced volatiles in soybean and pigeon pea plants artificially infested with the neotropical brown stink bug, *Euschistus heros*, and their effect on the egg parasitoid, *Telenomus podisi*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 33, p. 227-237, 2005.
- MORAES, M. C. B.; LAUMANN, R. A.; PAREJA, M.; SERENO, F. T. P. S; MICHEREFF, M. F. F.; BIRKETT, M. A.; PICKETT, J. A.; BORGES, M. Attraction of the stink bug egg parasitoid *Telenomus podisi* to defence signals from soybean activated by treatment with *cis*-jasmone. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 131, n. 2, p. 178-188, 2009.
- MORAES, M. C. B.; PAREJA, M.; LAUMANN, R. A.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; BORGES, M. Response of the parasitoid *Telenomus podisi* to induced volatiles from soybean damaged by stink bug herbivory and oviposition. **Journal of Plant Interactions**, London, v. 3, n. 2, p. 1742-1756, 2008.
- PAREJA, M.; MORAES, M. C. B; CLARK, S. J.; BIRKETT, M. A.; POWELL, W. Response of the aphid parasitoid *Aphidius funebris* to volatiles from undamaged and aphid-infested *Centaurea nigra*. **Journal of Chemical Ecology**, Amsterdam, v. 33, n. 4, p. 695-710, 2007.

- 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. **Ciencia y Tecnología Alimentaria**, Ciudad de México, v. 3, n. 3, p. 156-160, 2001.
- PEREZ, F. J.; ORMENONUNEZ, J. Difference in hydroxamic acid content in roots and root exudates of wheat (*Triticum aestivum* L.) and rye (*Secale cereale* L.); possible role in allelopathy. **Journal of Chemical Ecology**, Amsterdam, v. 17, n. 6, p. 1037-1043, 1991.
- PICKETT, J. A.; BIREKTT, M. A.; MORAES, M. C. B.; BRUCE, T. J. A.; CHAMBERLAIN, K.; GORDON-WEEKS, R.; MATTHES, J. A.; NAPIER, J. A. SAMRT, L. E.; WADHAMS, L. J., WOODCOCK, C. M. *Cis*-Jasmone as allelopathic agent in inducing plant defence. **Allelopathy journal**, v. 19, n. 1, p. 109-118, 2007.
- PIUBELLI, G. C.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; ARRUDA, I. C.; FRANCHINI, J. C.; LARA, F. M. Flavonoid Increase in Soybean as a Response to *Nezara viridula* Injury and its effect on insect-feeding preference. **Journal of Chemical Ecology**, Amsterdam, v. 29, n. 5, p. 1223-1233, 2003b.
- PIUBELLI, G. C.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; ARRUDA, I. C.; LARA, F. M. Nymphal development, lipid content, growth and weight gain of *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera; pentatomidae) fed on soybean genotypes. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 32, n. 1, p. 127-132, 2003a.
- PIUBELLI, G. C.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; MOSCARDI, F.; MIYAKUBO, S. H.; OLIVEIRA, M. C. N. Are chemical compounds important for soybean resistance to *Anticarsia gemmatilis*?. **Journal of Chemical Ecology**, Amsterdam, v. 31, n. 7, p. 1509-1525. 2005.
- PORTUGAL, A. D. State of the soybean agribusiness in Brazil. In: KAUFFMANN (Ed.). World soybean research conference, 6., Soybean Feeds the World, 1999, Chicago. **Proceeding**. Superior printing: Champaign, IL, 1999. p. 39-45.
- REICHART, E.; OBENDORF, D. Determination of naringin in grapefruit juice by cathodic stripping differential pulse voltammetry at the hanging mercury drop electrode **Analytica Chimica Acta**, Shannon, v. 360, n. 1-3, p. 179-187, 1998.
- RIBEIRO, M. L. L.; MANDARINO, J. M. G.; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; OLIVEIRA, M. C. N.; CAMPO, C. B. H.; NEPOMUCENO, A. L.; IDA, E. I. Isoflavone content and β -glucosidase activity in soybean cultivars of different maturity groups. **Journal of Food Composition and Analysis**, Jena, v. 20, p.19-24, 2007.
- TEMERK, Y. M.; IBRAHIM, H. S. M.; SCHUHMANN, W. Cathodic adsorptive stripping voltammetric determination of the antitumor drug rutin in pharmaceuticals, human urine, and blood serum. **Microchimica Acta**, Vienna, v. 153, n. 1-2, p. 7-13, 2006.
- TSUKAMOTO, C.; SHIMADA, S.; IGITA, K.; KUDOU, S.; KOKUBUN, M.; OKUBO, K.; KITAMURA, K. Factors affecting isoflavone content in soybean seeds: changes in isoflavones, saponins, and composition of fatty acids at different temperatures during seed development. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Davis, v. 43, n. 5, p. 1184-1192, 1995.
- UNDERTRUP, A. G.; RAVNSKOV, S.; HANSEN, H. C. B.; FOMSGAARD, I. S. Biotransformation of 2-Benzoxazolinone to 2-Amino-(3*H*)-Phenoxazin-3-one and 2-Acetylamino-(3*H*)-Phenoxazin-3-one in Soil. **Journal of Chemical Ecology**, Amsterdam, v. 31, n. 5, p. 1205-1222, 2005.
- WU, L.; JAMES B. LAUGHLIN JUNIOR, J. B.; DEWALD, H. D. Voltammetry and LCEC of isoflavones. **Electroanalysis**, Weinheim, v. 9, n. 10, p. 796-799, 1997.
- ZOULIS, N. E.; CONSTANTINOS, E. E. Preconcentration at a carbon-paste electrode and determination by adsorptive-stripping voltammetry of rutin and other flavonoids. **Analytica Chimica Acta**, Shannon, v. 320, n. 2-3, p. 255-261, 1996.

**Circular
Técnica, 85**

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Endereço: Parque Estação Biológica (PqEB) - Avenida
W5 Norte; Caixa Postal 02372 - Brasília, DF - Brasil;
CEP: 70770-900
Fone: (61) 3448-4700
Fax: (61) 3340-3624
E-mail: sac@cenargen.embrapa.br
1ª edição
Publicação *on line* (2009)



**Comitê
Local de
Publicações**

Presidente: *Lúcio Brunale*
Secretária-Executiva: *Lígia Sardinha Fortes*
Membros: *José Roberto de Alencar Moreira, Diva Maria de Alencar Dusi, Regina Maria Dechechi G. Carneiro, Samuel Rezende Paiva e Jonny Everson Scherwinski Pereira.*
Membros suplentes: *João Batista Tavares da Silva e Margot Alves Nunes Dode.*

Expediente

Revisão de texto: *José Cesamildo Cruz Magalhães*
Normalização bibliográfica: *Ana Flávia do Nascimento Dias*
Tratamento das ilustrações: *Cíntia Pereira da Silva*
Editoração eletrônica: *Cíntia Pereira da Silva*



Autores

Jonatas Gomes da Silva
Doutorando, Químico
Universidade de Brasília
jonatasg@yahoo.com.br

Mariana Rodrigues Lopes e Silva
Graduanda, Química
Universidade de Brasília
marynana_lopes@yahoo.com.br

Aline Carlos de Oliveira
Pós-doutoranda, Química
Universidade Federal de
São Carlos
alineplis@yahoo.com.br

Maria Carolina Blassioli Moraes
PhD, Química
Embrapa Recursos Genéticos e
Biotecnologia
mcbmorae@cenargen.embrapa.br

Luzia Helena Corrêa Lima
PhD, Bióloga
Embrapa Recursos Genéticos e
Biotecnologia
luzia@cenargen.embrapa.br

Jurandir Rodrigues de Souza
PhD, Químico
Universidade de Brasília
rodsouza@unb.br

Carlos Manoel Pedro Vaz
PhD, Físico
Embrapa Instrumentação
Agropecuária
vaz@cnpdia.embrapa.br

Clarissa Silva Pires de Castro
PhD, Química
Embrapa Recursos Genéticos e
Biotecnologia
clarissa@cenargen.embrapa.br



Desenvolvimento de metodologia analítica para a determinação de genisteína utilizando-se eletrodo de carbono vítreo

Introdução

A cultura da soja (*Glycine max*) no Brasil e no mundo apresentou nas últimas décadas um crescimento de mais de 100% de área cultivada, quando comparada à década de 1970. A soja, inicialmente cultivada apenas na região Sul, expandiu-se para o Cerrado e, mais recentemente, para as regiões Norte e Nordeste do Brasil (PORTUGAL, 1999). Tal fato se deve à importância da soja – principal fonte de proteínas e óleo vegetal para consumo humano e animal – e à alta tecnologia utilizada em sua produção.

Uma das consequências das grandes áreas cultivadas com soja é o aumento de pragas que atacam essa oleaginosa, causando danos crescentes à produção. Os percevejos são considerados as principais pragas do cultivo da soja, pois se alimentam sugando, preferencialmente, os grãos, afetando o rendimento, a qualidade das sementes e seu potencial germinativo. Além destes danos diretos, o ataque de percevejos na soja pode ocasionar produção de sementes com baixo vigor e menor conteúdo de óleo e proteínas, assim como distúrbios fisiológicos (BELORE et al., 2003). Estes distúrbios afetam a maturação normal das plantas atacadas, cujas folhas permanecem verdes ao final do ciclo (retenção foliar), o que dificulta a colheita (BORKERT et al., 1994).

As plantas, apesar de sésseis e aparentemente indefesas, apresentam um sistema de defesa eficiente contra insetos, fungos e bactérias. Um sistema de defesa eficiente da planta que pode ser manipulado e utilizado no monitoramento integrado de pragas é o sistema químico, composto de metabólitos secundários voláteis e não voláteis, que podem ser induzidos ou constitutivos (DICKE e van LOON, 2000; ARAB e BENTO, 2006; HEIL, 2008). Já é bastante conhecido que plantas danificadas por herbivoria induzem a produção de metabólitos secundários, aumentando a eficiência da defesa química. Por exemplo, plantas de trigo danificadas por áfidos apresentam maior quantidade de ácidos hidroxâmicos, que têm ação deterrente sobre esta praga (BRUCE et al., 2003; MORAES et al., 2008). Além da defesa por meio de ação direta sobre o herbívoro, os metabólitos secundários também podem agir de forma indireta, já que plantas de soja, quando danificadas por herbivoria provocada por percevejos, liberam uma mistura de compostos voláteis que atraem os parasitoides de ovos, como o *Telenomus podisi* (MORAES et al., 2005, 2008b). Vários estudos vêm demonstrando que algumas variedades de soja apresentam uma eficiente defesa contra insetos herbívoros (RIBEIRO et al., 2007; MICHEREFF et al., 2009). Estas variedades mais resistentes a pragas apresentam diferentes características físicas e químicas que as tornam mais resistentes. Dentre as características químicas, os principais compostos responsáveis pela resistência a pragas são os flavonoides. Portanto, a identificação e quantificação desses metabólitos secundários nas diferentes cultivares geram importante informação para os melhoristas na escolha das cultivares para o melhoramento, tanto o clássico quanto o transgênico. Desta forma, é possível avaliar e conhecer mais claramente quais são os efeitos e o porquê da resistência,

como também atuar na busca de genes responsáveis pela produção desses metabólitos secundários (PEREZ e ORMENONUNEZ, 2005; PICKETT et al., 2007; PIUBELLI et al., 2003a, 2003b, 2005; MORAES et al., 2005; PAREJA et al., 2007; BUKOVINSZKY et al., 2005).

Para a utilização correta dos metabólitos secundários no monitoramento integrado de pragas, faz-se necessário o conhecimento sobre a forma que esses compostos são utilizados no meio ambiente pelas plantas, isto é, qual a taxa de liberação, a quantidade produzida e sua interação alelopática entre planta e herbívoro e entre planta, herbívoro e o seu inimigo natural (MORAES et al., 2008a, 2009; HEIL, 2008). Atualmente vários métodos analíticos têm sido propostos para a identificação e quantificação de metabólitos secundários em soja utilizando-se técnicas de grande porte (difíceis de serem adaptadas ao campo) e de alto custo (manutenção dos equipamentos), como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e a cromatografia gasosa (GC), associadas ou não à espectrometria de massas (MS). Todas essas técnicas exigem laboriosos processos de preparação de amostra (etapas de separações e pré-tratamentos), grandes quantidades de gases e solventes de alta pureza e técnicos altamente especializados, além das respostas obtidas serem bastante influenciadas por interferentes e não preservarem os metabólitos secundários durante a análise. Portanto, é necessário desenvolver e validar métodos sensíveis, seletivos e rápidos para a determinação de metabólitos secundários em soja. Os métodos eletroquímicos preenchem bem todos esses requisitos, pois são métodos não destrutivos, de baixo custo e de alta sensibilidade, os quais permitem a determinação direta, rápida, simultânea e precisa de diversos analitos em uma única varredura, sem a necessidade de etapa de pré-tratamento e podem ser adaptados ao campo. Devido a todas essas vantagens, os métodos eletroquímicos vêm sendo utilizados para avaliar a capacidade antioxidante de flavonoides e ácidos fenólicos e quantificá-los em alimentos, medicamentos e fluidos biológicos.

A voltametria é uma técnica eletroquímica que estuda as relações entre o potencial, a corrente e o tempo durante a eletrólise da espécie de interesse (analito). Nesta técnica, um potencial variável (sinal de excitação) é aplicado sobre uma célula eletroquímica, e uma resposta de corrente, que é proporcional à concentração do analito, desenvolve-se em função

do sinal de excitação. A voltametria é amplamente utilizada em análises químicas de rotina e de pesquisa (SKOOG et al., 2002; HARRIS, 2008).

Na voltametria de pulso diferencial (DPV), uma série de pulsos de amplitude constante (10-100 mV) são superpostos a uma rampa linear de potencial (sinal de excitação). São realizadas duas medidas de corrente, uma antes da aplicação do pulso e outra antes do fim do pulso. A diferença de corrente (Δi) por pulso é registrada em função do aumento linear do potencial. O resultado é uma curva diferencial, que consiste em um máximo cuja altura é diretamente proporcional à concentração do analito (SKOOG et al., 2002; HARRIS, 2008).

A voltametria cíclica (CV) utiliza ondas triangulares como sinais de excitação para o eletrodo de trabalho. Após aplicar uma rampa de potencial linear, a rampa é invertida para trazer o potencial de volta ao seu valor inicial. O ciclo pode ser repetido diversas vezes. A voltametria cíclica fornece essencialmente informações qualitativas extremamente importantes sobre as velocidades e os mecanismos de processos de oxidação/redução, sendo geralmente empregada no estudo de sistemas desconhecidos (SKOOG et al., 2002; HARRIS, 2008).

Métodos voltamétricos baseados na oxidação de flavonoides e ácidos fenólicos no eletrodo de carbono têm sido empregados para a identificação e quantificação destes compostos em diferentes amostras. O eletrodo de carbono vítreo (GC) foi empregado na análise de flavonoides e ácidos fenólicos, utilizando-se a DPV, com limites de detecção da ordem de 10^{-6} mol L⁻¹ (BLASCO et al., 2004). Escarpa et al. (2007) desenvolveram um método amperométrico de análise em fluxo, empregando o eletrodo de GC e a genisteína como padrão, para a determinação de isoflavonoides totais em suplemento alimentar e leite à base de soja. O eletrodo de pasta de carbono foi utilizado por Klejdus et al. (2004) na determinação isoflavonoides em amostras de alimentos à base de soja mediante HPLC com detecção eletroquímica.

O presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de uma metodologia analítica em que sejam utilizados o eletrodo de carbono vítreo (GC) e a DPV para a determinação de genisteína.

Parte experimental

Equipamentos

As medidas voltamétricas foram realizadas em triplicata, utilizando-se o analisador voltamétrico 797 VA Computrace (Metrohm, Suíça) e uma célula eletroquímica composta por um eletrodo de GC ($\Phi = 2$ mm) como eletrodo de trabalho, Ag/AgCl (KCl 3 mol L⁻¹) como eletrodo de referência e platina como eletrodo auxiliar. As medidas de DPV foram realizadas no intervalo de potencial de 0,300 V (potencial inicial, E_i) a 1,000 V (potencial final, E_f) com amplitude de pulso de 50 mV e velocidade de varredura (v) de 50 mV s⁻¹. As medidas de voltametria cíclica (CV) foram realizadas no intervalo de potencial de 0 V (E_i) a 1,200 V (potencial de inversão, E_w) e $v = 100$ mV s⁻¹. Determinou-se o pH das soluções com o emprego do medidor de pH 3030 Jenway (Reino Unido) e do eletrodo de pH combinado DME-CV1/Digimed (Brasil).

Tratamento mecânico e eletroquímico do eletrodo de trabalho

Antes de se iniciar as medidas voltamétricas, o eletrodo de GC foi polido em suspensão aquosa de alumina 1 μ m (Sigma-Aldrich, Brasil) e limpo com acetona (Sigma-Aldrich, Brasil) no ultrassom, em um banho modelo 2840 DA (Odontobrás, Brasil) durante 5 minutos. Entre cada medida voltamétrica, o eletrodo foi limpo eletroquimicamente por cinco ciclos entre 0 e 1,800 V.

Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e as soluções foram preparadas com água ultrapura (Millipore, EUA). A solução estoque de genisteína (LC Laboratories, Canadá) 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹ foi preparada em uma mistura etanol/água, 1/1 (v/v). As soluções de tampão Britton-Robinson (BR) na faixa de pH 5 – 9 foram preparadas utilizando-se os ácidos fosfórico, acético e bórico (Sigma-Aldrich, Brasil). As soluções de tampão fosfato no intervalo de pH 5 – 9 foram preparadas com a utilização de fosfato de sódio dibásico e fosfato de potássio monobásico (Sigma-Aldrich, EUA). Hidróxido de sódio e ácido clorídrico concentrados (Sigma-Aldrich, Alemanha) foram utilizados para ajustar os valores de pH.

Procedimento

Antes do desenvolvimento da metodologia analítica, realizou-se o estudo do processo de oxidação/redução da genisteína na superfície do eletrodo

de GC, utilizando-se a CV, por meio da adição de 500 μ L de genisteína 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹ na célula eletroquímica contendo 10 mL de tampão fosfato pH 6.

Estudou-se a influência do eletrólito suporte e do pH na corrente de oxidação da genisteína, utilizando-se a DPV, por meio da adição de 100 μ L de genisteína 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹ na célula eletroquímica contendo 10 mL de tampão B-R (4,0 x 10⁻² mol L⁻¹ H₃PO₄, 4,0 x 10⁻² mol L⁻¹ CH₃COOH e 4,0 x 10⁻² mol L⁻¹ H₃BO₃) ou tampão fosfato (1,2 x 10⁻³ – 5,7 x 10⁻² mol L⁻¹ Na₂HPO₄ e 1,2 x 10⁻¹ – 4,5 x 10⁻³ mol L⁻¹ KH₂PO₄), no intervalo de pH 5 – 9.

Realizou-se o estudo da influência da amplitude de pulso (no intervalo de 10 – 100 mV) e da velocidade de varredura (no intervalo de 5 – 50 mV s⁻¹) na corrente de oxidação da genisteína, utilizando-se a DPV, por meio da adição de 100 μ L de genisteína 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹ na célula eletroquímica contendo 10 mL de tampão fosfato pH 6.

Para o estudo da repetibilidade de resposta do eletrodo de GC, utilizando-se a DPV, a corrente de oxidação da genisteína foi medida em dez repetições, em uma célula eletroquímica contendo 10 mL de tampão fosfato pH 6 e 100 μ L de genisteína 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹.

Obteve-se a curva analítica, utilizando-se a DPV, por meio de adições sucessivas de 10 μ L de genisteína 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹ na célula eletroquímica contendo 10 mL de tampão fosfato pH 6.

Resultados e discussão

No voltamograma cíclico (Figura 1a) para genisteína 5,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ em tampão fosfato pH 6, observa-se apenas um sinal em 0,650 V, correspondente à oxidação do grupo 4'-hidróxi do anel B (Figura 1b). A ausência de um sinal correspondente à redução do grupo 4'-quinona indica um processo de oxidação/redução irreversível (WU et al., 1997).

Para detecção e quantificação da genisteína, realizou-se um estudo por voltametria de pulso diferencial para verificar em qual meio e pH se observa a maior resposta de corrente de oxidação da genisteína. Os voltamogramas da Figura 2 mostram as correntes anódicas da genisteína em tampão fosfato no intervalo de pH 5 – 9.

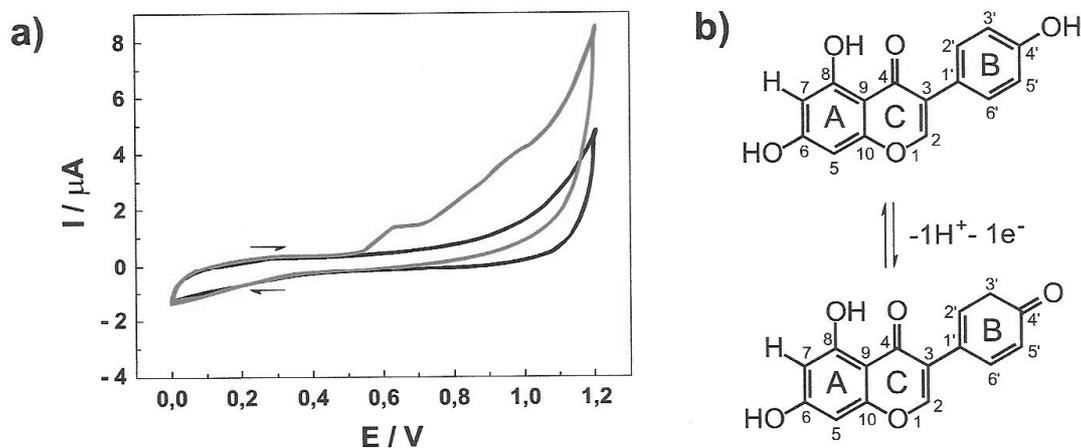


Figura 1. a) Reação de oxidação da genisteína; b) voltamogramas cíclicos para genisteína $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (—) em tampão fosfato pH 6 (—). $E_i = 0 \text{ V}$, $E_w = 1,200 \text{ V}$, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$, Eletrodo de trabalho: GC, Eletrodo de referência: Ag/AgCl (KCl 3 mol L^{-1}).

Observa-se que o potencial e a intensidade da corrente de oxidação da genisteína dependem do pH do meio. O melhor perfil voltamétrico e a melhor intensidade da corrente de oxidação foram obtidos em tampão fosfato pH 6. Foram realizados ensaios em tampão Britton-Robinson pH 5 – 9; porém, as intensidades das correntes de oxidação da genisteína foram menores do que as obtidas em tampão fosfato. Portanto, o tampão fosfato pH 6 foi escolhido para a determinação de genisteína.

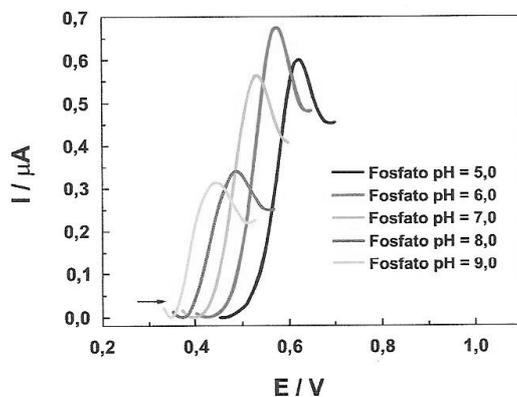


Figura 2. Voltamogramas de pulso diferencial em 10 mL de eletrólito suporte para genisteína $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. $E_i = 0,300 \text{ V}$; $E_f = 1,000 \text{ V}$, $v = 50 \text{ V s}^{-1}$, Eletrodo de trabalho: GC, Eletrodo de referência: Ag/AgCl (KCl 3 mol L^{-1}).

A Figura 3 mostra o efeito da variação da amplitude de pulso na corrente de oxidação da genisteína para valores entre 10 e 100 mV.

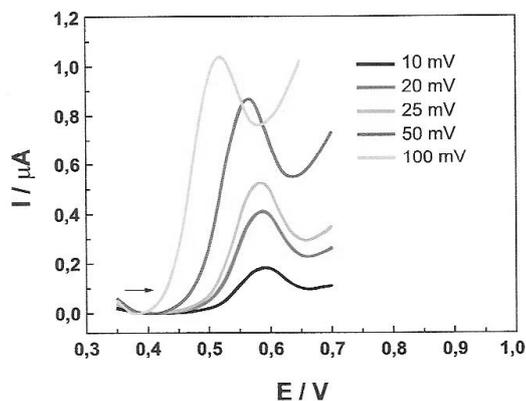


Figura 3. Voltamogramas de pulso diferencial em 10 mL de tampão fosfato pH 6 para genisteína $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. $E_i = 0,300 \text{ V}$; $E_f = 1,000 \text{ V}$, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, Eletrodo de trabalho: GC, Eletrodo de referência: Ag/AgCl (KCl 3 mol L^{-1}).

Variando-se a amplitude de pulso entre 10 e 100 mV, observa-se um aumento da intensidade da corrente e um deslocamento do potencial de oxidação. Para a amplitude de pulso de 100 mV, a genisteína apresentou um sinal voltamétrico de maior intensidade, porém mais largo. Dessa forma, optou-se por utilizar uma amplitude de pulso de 50 mV para a determinação de genisteína, uma vez que para este valor obteve-se um melhor perfil voltamétrico.

Na Figura 4, são mostrados os voltamogramas de pulso diferencial para a genisteína em tampão fosfato pH 6, variando-se a velocidade de varredura de 5 a 50 mV s^{-1} . Observa-se um aumento da intensidade

da corrente de oxidação da genisteína com o aumento da velocidade de varredura. Assim, para a determinação de genisteína, optou-se por utilizar a velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} .

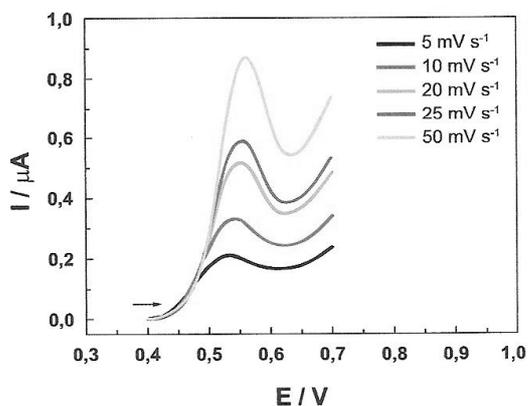


Figura 4. Voltamogramas de pulso diferencial em 10 mL de tampão fosfato pH 6 para genisteína $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. $E_i = 0,300 \text{ V}$; $E_f = 1,000 \text{ V}$, $v = 5\text{-}50 \text{ mV s}^{-1}$, Eletrodo de trabalho: GC, Eletrodo de referência: Ag/AgCl (KCl 3 mol L^{-1}).

O estudo para repetibilidade de resposta do eletrodo (Figura 5) visando à quantificação da genisteína apresentou um desvio padrão relativo (RSD) menor do que 1% ($n = 10$). Portanto, o eletrodo de GC utilizado apresenta repetibilidade adequada para a quantificação desse isoflavonoide por DPV, quando limpo eletroquimicamente por cinco ciclos entre 0 e $1,800 \text{ V}$.

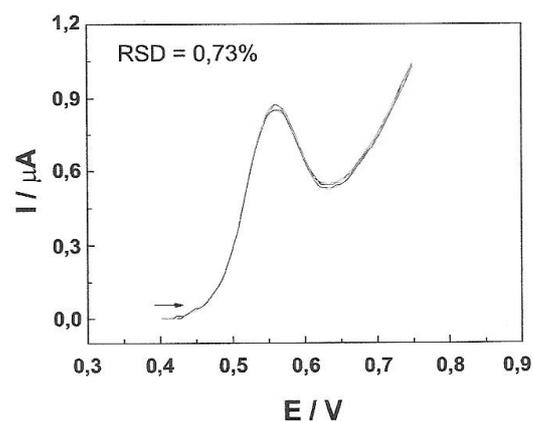


Figura 5. Voltamogramas de pulso diferencial em 10 mL tampão fosfato pH 6 para genisteína $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ($n = 10$). $E_i = 0,300 \text{ V}$; $E_f = 1,000 \text{ V}$, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, Eletrodo de trabalho: GC, Eletrodo de referência: Ag/AgCl (KCl 3 mol L^{-1}).

Após a otimização das condições experimentais para o eletrodo de GC, utilizando-se a técnica DPV, obteve-se a curva analítica para a genisteína em tampão fosfato pH 6.

Na Figura 6a são mostrados os voltamogramas de pulso diferencial obtidos para a genisteína no intervalo de concentração de $1,0 \times 10^{-6}$ a $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e equação $I_{pa} (\text{nA}) = -8,388 + 5,7 \times 10^7 [\text{Genisteína}]$ (Figura 6b), com coeficiente de correlação de 0,998, Limite de Detecção (LD) $1,2 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ e Limite de Quantificação (LQ) $4,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, calculados a partir de: $\text{LD} = 3\text{Sb}/b$; $\text{LQ} = 10\text{Sb}/b$, em que Sb é o desvio padrão das medidas do branco e b é a inclinação da curva analítica (MILLER e MILLER, 1993).

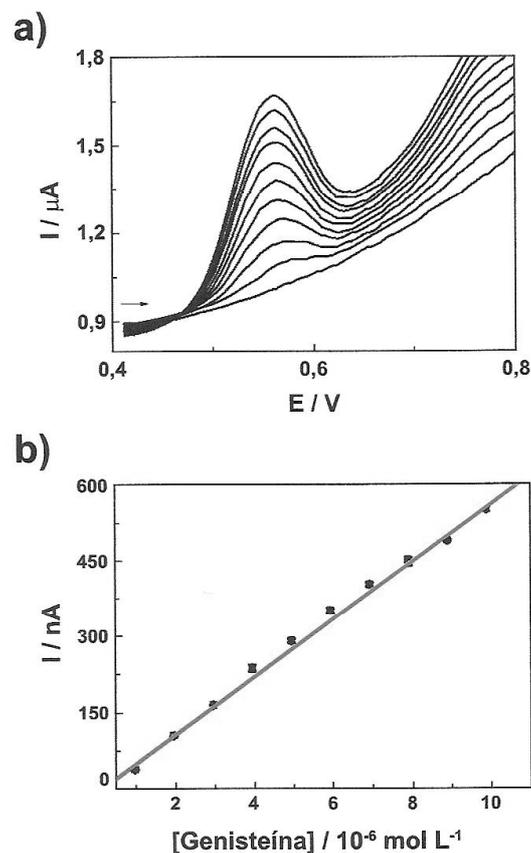


Figura 6. a) Voltamogramas de pulso diferencial em 10 mL de tampão fosfato pH 6 com adições sucessivas de 10 mL de genisteína $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; b) Curva analítica. $E_i = 0,300 \text{ V}$; $E_f = 0,800 \text{ V}$, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, Eletrodo de trabalho: GC, Eletrodo de referência: Ag/AgCl (KCl 3 mol L^{-1}).

Conclusão

A metodologia eletroanalítica desenvolvida para a determinação de genisteína, utilizando-se o eletrodo de GC e a técnica de DPV, apresentou boa sensibilidade e repetibilidade e baixos limites de detecção e quantificação, possibilitando sua aplicação no estudo de cultivares de soja da Embrapa quanto à identificação e quantificação de isoflavonoides. As quantidades médias de genisteína encontradas em sementes de soja de 18 cultivares brasileiras variou entre 2,18 mg/100g e 0,41mg/100 g (RIBEIRO et al., 2007). Esses valores estão dentro do limite de quantificação do método desenvolvido para a medida por voltametria de pulso diferencial $3,99 \times 10^{-7}$ mol/L (aproximadamente 0,1 mg) de genisteína. Estudos estão sendo conduzidos para avaliar a ação de interferentes provenientes da matriz e para avaliar as quantidades necessárias de amostra.

Referências bibliográficas

- ARAB, A.; BENTO, J. M. S. Plant volatiles: new perspectives for research in Brazil. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 35, n. 2, p. 151-158, 2006.
- BELORE, L.C.; RAMIRO, Z. A.; FARIA, A. M.; MARINO, C. A. B. Danos causados por percevejo (Hemiptera: Pentatomidae) em cinco cultivares de soja (GLYCINE MAX) no município de Araçatuba, SP. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 70, n. 2, p. 169-175, 2003.
- BLASCO, A. J.; GONZÁLEZ, M. C.; ESCARPA, A. Electrochemical approach for discriminating and measuring predominant flavonoids and phenolic acids using differential pulse voltammetry: towards an electrochemical index of natural antioxidants. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 511, n. 1, p. 71-81, 2004.
- BORKERT, C. M.; YORINORI, J. T.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; ALMEIDA, A. M. R.; FERREIRA, L. P.; SFREDO, G. J. Seja o doutor da sua soja. **Jornal Informações Agronômicas**, Piracicaba, n. 66, p. 1-17, 1994.
- BRUCE, T. J. A.; MARTIN, L. J.; PICKETT, J. A.; PYE, B. J.; SMART, L. E.; WADHAMS, L. J. *cis*-Jasmone treatment induces resistance in wheat plants against the grain aphid, *Sitobion avenae* (Fabricius) (Homoptera: Aphididae). **Pest Management science**, London, v. 59, n. 9, p.1031-1036, 2003.
- BUKOVINSZKY, T.; GOLS, R.; POSTHUMUS, M. A.; VET, L. E. M.; VAN LENTEREN, J. C. Variation In Plant Volatiles and Attraction Of The Parasitoid *Diadegma semiclausum* (Hellén). **Journal of Chemical Ecology**, Amsterdam, v. 31, n. 3, p. 461-480, 2005.
- DICKE, M.; van LOON, J. J. A. Multitrophic effects of herbivore-induced plant volatile in an evolutionary context. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 9, p.237-249, 2000.
- ESCARPA, A.; GONZÁLEZ, M. C.; BLASCO, A. J.; ROGERIO, M. C.; HERVÁS, M. Evaluation of Accuracy of Electrochemical Isoflavonoid Index for the Determination of Total Isoflavones in Soy Samples. **Electroanalysis**, Weinheim, v. 19, n. 9, p. 952-957, 2007.
- HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**, 7 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2008, 886 p.
- HEIL, M. Indirect defence via tritrophic interactions. **New Phytologist**, London, v.178, n. 1, p. 41-61, 2008.
- KLEJDUS, B.; VACEK, J.; ADAM, V.; ZEHNÁLEK, J.; KIZEK, R.; TRNKOVÁ, L.; KUBÁN, V. Determination of isoflavones in soybean food and human urine using liquid chromatography with electrochemical detection. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 806, n. 2, p. 101-111, 2004.
- MICHEREFF, M. F. F.; MORAES, M. C. B.; DINIZ, I. R.; LAUMANN, R. A.; BORGES, M. **Interação tri-trófica soja - Euschistus heros (Hemiptera: Pentatomidae) – Telenomus podisi (Hymenoptera:Scelionidae)**. In: ENCONTRO DO TALENTO ESTUDANTIL DA EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA, 14., 2009, Brasília, DF. Anais: resumos dos trabalhos. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2009. Resumo 080. p. 121
- MILLER, J.; MILLER, J. **Statistics for Analytical Chemistry**. 3 ed. New York: Ellis Horwood PTR Prentice Hall, 1993. 233 p.
- MORAES, M. C. B.; LAUMANN, R. A.; PAREJA, M.; SERENO, F. T. P. S.; MICHEREFF, M. F. F.; BIRKETT,

- M. A.; PICKETT, J. A.; BORGES, M. Attraction of the stink bug egg parasitoid *Telenomus podisi* to defence signals from soybean activated by treatment with *cis*-jasmone. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, Amsterdam, v. 131, n. 2, p. 178-188, 2009.
- MORAES, M. C. B.; BIRKETT, M. A.; GORDON-WEEKS, R.; SMART, L. E.; MARTIN J. L. *cis*-Jasmone induces accumulation of defence compounds in wheat, *Triticum aestivum*. *Phytochemistry*, Jena, v. 69, n. 1, p. 9-17, 2008b.
- MORAES, M. C. B.; LAUMANN, R. A.; PIRES, C. S.; SUJI, E. R.; BORGES, M. Induced Volatiles in Soybean and Pigeon Pea Plants Artificially Infested with the Neotropical Brown Stink Bug, *Euschistus heros*, and their effect on the Egg Parasitoid, *Telenomus podisi*. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, Amsterdam, v. 33, p. 227-237, 2005.
- MORAES, M. C. B.; PAREJA, M.; LAUMANN, R. A.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; BORGES, M. Response of the parasitoid *Telenomus podisi* to induced volatiles from soybean damaged by stink bug herbivory and oviposition. *Journal of Plant Interactions*, London, v. 3, n. 2, p. 1742-1756, 2008a.
- PAREJA, M.; MORAES, M. C. B.; CLARK, S. J.; BIRKETT, M. A.; POWELL, W. Response of the Aphid Parasitoid *Aphidius funebris* to Volatiles from Undamaged and Aphid-infested *Centaurea nigra*. *Journal of Chemical Ecology*, Amsterdam, v. 33, n. 4, p. 695-710, 2007.
- PEREZ, F. J.; ORMENONUNEZ, J. Difference in hydroxamic acid content in roots and root exudates of wheat (*Triticum aestivum* L.) and rye (*Secale cereale* L.): Possible role in allelopathy. *Journal of Chemical Ecology*, Amsterdam, v. 17, n. 6, p. 1037-1043, 1991.
- PICKETT, J. A.; BIRKETT, M. A.; MORAES, M. C. B.; BRUCE, T. J. A.; CHAMBERLAIN, K.; GORDON-WEEKS, R.; MATTHES, J. A.; NAPIER, J. A. SMART, L. E.; WADHAMS, L. J., WOODCOCK, C. M. *cis*-Jasmone as allelopathic agent in inducing plant defence. *Allelopathy journal*, v. 19, n. 1, p. 109-118, 2007.
- PIUBELLI, G. C.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; ARRUDA, I. C.; Franchini, J. C.; Lara, F. M. Nymphal development, lipid content, growth and weight gain of *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera; pentatomidae) fed on soybean genotypes. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, v. 32, n. 1, p. 127-132, 2003a.
- PIUBELLI, G. C.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; ARRUDA, I. C.; FRANCHINI, J. C.; LARA, F. M. Flavonoid Increase in Soybean as a Response to *Nezara viridula* Injury and Its Effect on Insect-Feeding Preference. *Journal of Chemical Ecology*, Amsterdam, v. 29, n. 5, p. 1223-1233, 2003b.
- PIUBELLI, G. C.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; MOSCARDI, F.; MIYAKUBO, S. H.; OLIVEIRA, M. C. N. Are Chemical Compounds Important for Soybean Resistance to *Anticarsia gemmatilis*?. *Journal of Chemical Ecology*, Amsterdam, v. 31, n. 7, p. 1509-1525. 2005.
- PORTUGAL, A. D. State of the soybean agribusiness in Brazil. In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 6., Chicago. Proceedings... Champaign, IL: Superior Printing, 1999.
- RIBEIRO, M. L. L.; MANDARINO, J. M. G.; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; OLIVEIRA, M. C. N.; CAMPO, C. B. H.; NEPOMUCENO, A. L.; IDA, E. I. Isoflavone content and β -glucosidase activity in soybean cultivars of different maturity groups. *Journal of Food Composition and Analysis*, Jena, v. 20, p.19-24, 2007.
- SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. *Princípios de Análise Instrumental*, 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009, 1056 p.
- UNDERTRUP, A. G.; RAVNSKOV, S.; HANSEN, H. C. B.; FOMSGAARD, I. S. Biotransformation of 2-Benzoxazolinone to 2-Amino-(3H)-Phenoxazin-3-one and 2-Acetylamino-(3H)-Phenoxazin-3-one in Soil. *Journal of Chemical Ecology*, Amsterdam, v. 31, n. 5, p. 1205-1222, 2005.
- WU, L.; LAUGHLIN JR, J. B.; DEWALD, H. D. Voltammetry and LCEC of isoflavones. *Electroanalysis*, Weinheim, v. 9, n. 10, p. 796-799, 1997.

**Circular
Técnica, 87**

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Endereço: Parque Estação Biológica (PqEB) - Avenida
W5 Norte; Caixa Postal 02372 - Brasília, DF - Brasil;
CEP: 70770-900

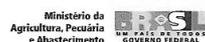
Fone: (61) 3448-4700

Fax: (61) 3340-3624

E-mail: sac@cenargen.embrapa.br

1ª edição

Publicação *on line* (2009)

**Comitê
Local de
Publicações**

Presidente: *Lúcio Brunale*

Secretária-Executiva: *Lígia Sardinha Fortes*

Membros: *José Roberto de Alencar Moreira, Diva Maria de
Alencar Dusi, Regina Maria Dechechi G. Carneiro, Samuel
Rezende Paiva e Jonny Everson Scherwinski Pereira.*

Membros suplentes: *João Batista Tavares da Silva e
Margot Alves Nunes Dode.*

Expediente

Revisão de texto: *José Cesamildo Cruz Magalhães*

Normalização bibliográfica: *Ana Flávia do Nascimento Dias*

Tratamento das ilustrações: *Cíntia Pereira da Silva*

Editoração eletrônica: *Cíntia Pereira da Silva*



Analytical applications of the GPU electrode for determination of daidzein

A. C. Oliveira^{(1)*}, C. M. P. Vaz⁽¹⁾, J. G. Silva^(2,3), C. S. P. Castro⁽³⁾, W. T. L. Silva⁽¹⁾, M. E. Saide⁽¹⁾ and L. H. Mascaro⁽⁴⁾

(1) Embrapa Instrumentação Agropecuária, São Carlos – SP – Brasil

(2) Instituto de Química-LQAA, Universidade de Brasília, Brasília – DF – Brasil

(3) Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-LSA, Brasília – DF – Brasil

(4) Departamento de Química – UFSCar-LIEC, São Carlos - SP – Brasil

*alineplis@yahoo.com.br

Abstract – The performance of the GPU composite electrode over the daidzein determination was evaluated by differential pulse voltammetry (DPV). Parameters such as pulse amplitude, sweep rate were optimized. A calibration curve was obtained with linear region between 9.92×10^{-7} and 8.50×10^{-6} mol L⁻¹ and detection limit of 1.31×10^{-7} .

Since the earlier 1960s many different procedures to prepare solid carbon-based electrodes for electroanalytical use have been proposed. Among these solid electrode materials one can highlight the composites in which the carbon is dispersed in polymeric matrices. Mendes et al. [1] first described the preparation and use of the graphite–polyurethane composite electrode (GPU). The advantages of GPU electrode, such as their properties and potential applications, especially in the determination of organic compounds attracted very recently considerable attention for the electroanalytical applications.

Daidzein is a flavonoid widely found in fruits and vegetables such as soybeans. This flavonoid, along with others numerous secondary metabolites, is involved in direct and indirect plant defense against insect herbivores and pathogens [2]. For these reasons, the rapid determination and reliable quantification of daidzein are important for genetic manipulation of plants and the search for alternative pest management tools. Since most flavonoids are electrochemically active at moderate oxidation potentials, electrochemical methods are preferable with the advantages of higher sensitivity and less interference from non-electroactive substances. Thus, the present work describes the performance of GPU for the determination of daidzein in a differential pulse voltammetric procedure.

Differential pulse voltammetric measurement was performed at GPU electrode in 5.0×10^{-5} mol L⁻¹ daidzein solution in BR buffer pH 2. The voltammogram obtained for the electrode is presented in Fig. 1, from which it is possible to observe one anodic peak at 730 mV which is a characteristic of daidzein oxidation. The peak current is associated with the oxidation of the 4'-hydroxyl electron-donating group at ring B. The influence of the parameters pulse amplitude and scan rate on the anodic peak was studied with the purpose of increasing the signal obtained for daidzein. Thus, the effect of the pulse amplitude on the GPU electrode response was investigated between 10 and 100 mV in 5.0×10^{-5} mol L⁻¹ daidzein solution in BR buffer pH 2. The highest analytical signal was obtained at 100 mV. After that, the scan rate was studied ranging from 5 to 50 mV. The best scan rate for DPV was 10 mV s⁻¹. Thus, these experimental conditions were selected for further experiments. Under the optimized conditions, a linear response of anodic peak current as a function of the daidzein concentration was obtained (Fig.2) in the investigated range 9.92×10^{-7} – 8.40×10^{-6} mol L⁻¹ (n=10). In this range, a limit of detection of 1.31×10^{-7} mol L⁻¹ can be found. Thus, these results suggest that the GPU electrode is suitable for the determination of daidzein in soybeans, represent good sensitivity, rapid responses and fast response.

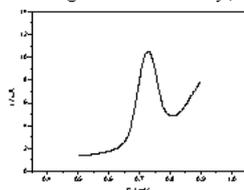


Figure 1: Differential pulse voltammogram obtained at GPU electrode using 5.0×10^{-5} mol L⁻¹ daidzein solution in BR buffer. Scan rate 10 mV s⁻¹ and pulse amplitude 100 mV.

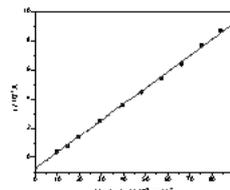


Figure 2: Analytical curve obtained for daidzein at the GPU electrode.

[1] Mendes, R. K., S. Claro-Neto and E. T. G. Cavalheiro, *Talanta*, 57 (2002) 909.

[2] G. C. Piubelli, C. B. Hoffman-Campo, F. Moscardi, S. H. Miyakubo and M. C. N. Oliveira, *J. Chem. Ecol.* 31 (2005) 1509.



II Simpósio sobre Inovação e Criatividade Científica na Embrapa

Brasília, 28 a 30 de abril 2010

Desenvolvimento e Validação de Métodos Eletroquímicos de Análise para a Determinação de Flavonóides em Soja

Autor(es): Jonatas G. da Silva^{1,2}, Thiago V. de Freitas, Aline C. de Oliveira³, Maria Carolina B. Moraes¹, Luzia Helena C. Lima¹, Jurandir R. de Souza², Lúcia Helena Mascaro⁴, Carlos M. P. Vaz³ e Clarissa S. P. de Castro¹

Unidade(s): ¹Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

²Instituto de Química - LQAA, Universidade de Brasília

³Embrapa Instrumentação Agropecuária

⁴Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos

A soja é a oleaginosa mais produzida e consumida no mundo. Uma das conseqüências das grandes áreas cultivadas com soja está relacionada ao aumento de pragas. Nos últimos anos, o desenvolvimento de cultivares de soja resistentes tem sido uma ferramenta alternativa para controle de pragas em substituição aos inseticidas químicos. Um dos principais responsáveis pela resistência da soja a insetos-praga são os metabólitos secundários, principalmente os flavonóides. Atualmente os métodos de cromatografia líquida e de espectrometria de massas têm sido utilizados na determinação de flavonóides; porém, esses métodos são de alto custo, exigem processos laboriosos de preparação de amostra e muitas vezes não preservam a forma química de como esses compostos são encontrados na planta. Os métodos eletroquímicos superam essas desvantagens, pois são métodos não destrutivos, de baixo custo, de alta sensibilidade; podendo ser levados para o campo e por essa razão têm sido aplicados na determinação de flavonóides em suco, chá, medicamentos e fluídos biológicos utilizando eletrodos de mercúrio e carbono. Este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de metodologias analíticas com baixos limites de detecção, utilizando as técnicas voltamétricas, para aplicação no estudo de cultivares de soja da Embrapa quanto à identificação e quantificação de flavonóides, gerando importante informação para os melhoristas na escolha das cultivares para o melhoramento, tanto clássico como o transgênico.

Desenvolvimento de Metodologia Analítica para a Determinação de Genisteína Utilizando a Voltametria Adsorviva de Redissolução Anódica

Jonatas G. da Silva^{1,2*} (PG), Mariana R. L. e Silva^{1,2} (IC), Aline C. de Oliveira³ (PQ), Maria Carolina B. Moraes¹ (PQ), Luzia Helena C. Lima¹ (PQ), Jurandir R. de Souza² (PQ), Carlos M. P. Vaz³ (PQ) e Clarissa S. P. de Castro¹ (PQ) jonatasg@yahoo.com.br

¹Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, CP 2372, CEP 70.770-917, Brasília – DF

²Instituto de Química - LQAA, Universidade de Brasília, CP 4394, CEP 70.919-970, Brasília – DF

³Embrapa Instrumentação Agropecuária, CP 741, CEP 13.560-970, São Carlos – SP

Palavras Chave: Genisteína, Eletrodo de carbono vítreo, Voltametria

Introdução

Estudos vêm demonstrando que algumas variedades de soja apresentam uma eficiente defesa contra insetos herbívoros. Estas variedades mais resistentes a pragas apresentam alto teor de isoflavonóides, metabólitos secundários com importantes funções defensivas contra microorganismos e pestes.^{1,2} A identificação e quantificação destes metabólitos, em diferentes cultivares, geram importante informação para os melhoristas na escolha das cultivares para o melhoramento, tanto clássico como o transgênico. Portanto, o objetivo desse trabalho é o desenvolvimento de um método, baseado na oxidação do isoflavonóide genisteína (Fig. 1) no eletrodo de carbono vítreo (GC), empregando a voltametria adsorviva de redissolução anódica (AAdSV), para a determinação de genisteína.

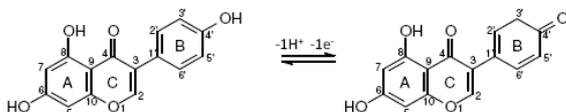


Fig. 1. Reação de oxidação da genisteína.

Experimental

Para a realização das medidas voltamétricas, utilizou-se o analisador voltamétrico 797 VA Computrace (Metrohm), uma célula eletroquímica composta pelos eletrodos GC ($\Phi = 2$ mm) (trabalho), Ag/AgCl (KCl 3 mol L⁻¹) (referência) e platina (auxiliar). A solução estoque de genisteína (LC Laboratories) 1x10⁻³ mol L⁻¹ foi preparada em uma mistura etanol-água 1:1 (v/v). Primeiramente foram otimizados os parâmetros voltamétricos e condições experimentais: pH e eletrólito suporte, potencial de acumulação (E_{ac}), tempo de acumulação (t_{ac}), amplitude de pulso e velocidade de varredura (v). Posteriormente, foi obtida a curva analítica, pelo método da adição de padrão, para a genisteína.

Resultados e Discussão

Após otimizar as condições experimentais e realizar o estudo da repetibilidade de resposta do eletrodo de GC para a quantificação de genisteína (RSD de 0,79% para n=10), empregando o eletrodo

33^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química

de GC e a AAdSV, foram obtidos os voltamogramas adsorvivos de pulso diferencial, para a genisteína em tampão fosfato pH 4 (Fig. 2). No intervalo de concentração de 5,0x10⁻⁸ a 3,5x10⁻⁷ mol L⁻¹, a curva analítica apresentou a equação $I_{pa}(\mu A) = -0,02 + 3,36 \times 10^6 [\text{Genisteína}]$, com coeficiente de correlação de 0,998 e limite de detecção de 3,90x10⁻⁹ mol L⁻¹ e limite de quantificação de 1,30x10⁻⁸ mol L⁻¹, calculados a partir de: LD = 3Sb/b; LQ = 10Sb/b, onde Sb é o desvio padrão das medidas do branco e b é a inclinação da curva analítica.

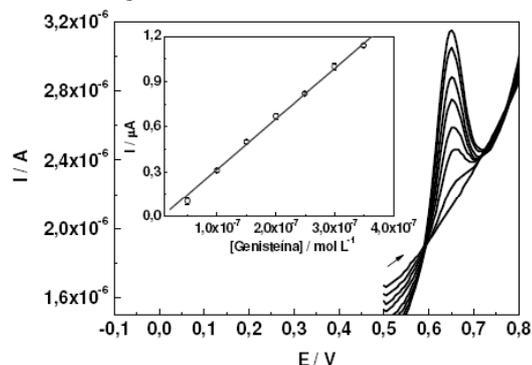


Fig.2. Voltamogramas adsorvivos de pulso diferencial em 10 mL de tampão fosfato pH 4 com adições sucessivas de 5 μ L de genisteína 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹. $E_{ac} = 0,40$ V, $t_{ac} = 180$ s, $E_i = 0,50$ V; $E_f = 0,80$ V, amplitude de pulso = 50 mV, $v = 50$ mV s⁻¹, Eletrodo de trabalho: HMDE, Eletrodo de referência; Ag/AgCl (3 mol L⁻¹).

Conclusões

A metodologia analítica desenvolvida para a determinação de genisteína utilizando o eletrodo de GC e a AAdSV, apresentou boa sensibilidade e baixos limites de detecção e quantificação, possibilitando a sua aplicação na determinação de genisteína em cultivares de soja da Embrapa.

Agradecimentos

CENARGEN, UnB, CNPDIA, UFSCar, CNPq e CAPES.

¹Moraes, M.C.B.; et al. *Entomologia Experimentalis Et Applicata.*, 2005, 33, 22723.

²Piubelli, G.C; et al. *J.Chem. Ecol.* 2003, 29, 1223.

Desenvolvimento de Método Voltamétrico para a Determinação de Daidzeína Utilizando Eletrodo de Mercúrio

Jonatas G. da Silva^{1,2*} (PG), Mariana R. L. e Silva^{1,2} (IC), Aline C. de Oliveira³ (PQ), Maria Carolina B. Moraes¹ (PQ), Luzia Helena C. Lima¹ (PQ), Jurandir R. de Souza² (PQ), Carlos M. P. Vaz³ (PQ) e Clarissa S. P. de Castro¹ (PQ) jonatasg@yahoo.com.br

¹Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, CP 2372, CEP 70.770-917, Brasília – DF

²Instituto de Química - LQAA, Universidade de Brasília, CP 4394, CEP 70.919-970, Brasília – DF

³Embrapa Instrumentação Agropecuária, CP 741, CEP 13.560-970, São Carlos – SP

Palavras Chave: Daidzeína, Eletrodo de Mercúrio, Voltametria

Introdução

A daidzeína (Fig.1), juntamente com outros isoflavonóides, é um dos principais compostos responsáveis pela resistência da soja a insetos, fungos e bactérias.^{1,2} Para que

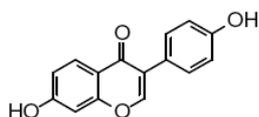


Fig. 1. Estrutura química da daidzeína.

este eficiente sistema químico de defesa possa ser manipulado e utilizado no monitoramento integrado de pragas, faz-se necessário o conhecimento de como esses compostos são usados no meio ambiente pelas plantas. Portanto, o desenvolvimento de métodos para a determinação de isoflavonóides, em diferentes tecidos das plantas de soja, poderá fornecer dados relevantes para os estudos dos efeitos desses compostos no comportamento dos insetos-praga. Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de um método, baseado na redução do isoflavonóide no eletrodo de mercúrio (HMDE), empregando a voltametria de pulso diferencial (DPV), para a detecção e quantificação de daidzeína.

Experimental

As medidas voltamétricas foram realizadas em triplicata, utilizando-se o analisador voltamétrico 797 VA Computrace (Metrohm) e uma célula eletroquímica composta pelo HMDE como eletrodo de trabalho, Ag/AgCl (KCl 3 mol L⁻¹) como eletrodo de referência e platina como eletrodo auxiliar. A solução estoque de Daidzeína (LC Laboratories) 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹ foi preparada em etanol (Sigma). Primeiramente foram otimizados os parâmetros voltamétricos e condições experimentais: pH e eletrólito suporte, amplitude de pulso e velocidade de varredura (v). Posteriormente, foi obtida a curva analítica, pelo método da adição de padrão, para a daidzeína.

Resultados e Discussão

O estudo da repetibilidade de resposta do HMDE para a quantificação de daidzeína apresentou RSD menor que 1,0% (n=10). Nos voltamogramas de pulso diferencial (Fig. 2) obtidos para a daidzeína, em tampão fosfato pH 3, observa-se um sinal em -1,09 V, correspondente a sua redução no

HMDE. Este sinal pode ser utilizado na detecção e quantificação de daidzeína em grãos e folhas de soja. A curva analítica, obtida pelo método de adição de padrão, apresentou a equação I_{pc} (nA) = $-1,95 + 7,6 \times 10^6$ [Daidzeína] ($r = 0,996$) e linearidade entre $1,0 \times 10^{-6}$ a $7,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ com limite de detecção $7,6 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ e limite de quantificação $2,5 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, calculados a partir de: LD = 3Sb/b; LQ = 10Sb/b, onde Sb é o desvio padrão das medidas do branco e b a inclinação da curva analítica.

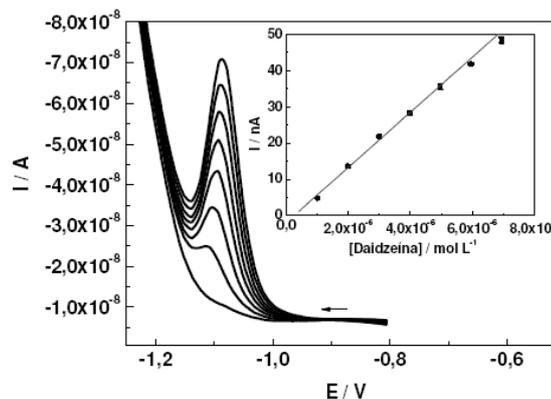


Fig.2. Voltamogramas de pulso diferencial em 10 mL de tampão fosfato pH 3 com adições sucessivas de 10 µL de daidzeína 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹. E_i = -0,70 V; E_f = -1,25 V, amplitude de pulso = 50 mV, v = 50 mV s⁻¹, Eletrodo de trabalho: HMDE, Eletrodo de referência: Ag/AgCl (3 mol L⁻¹).

Conclusões

O método voltamétrico desenvolvido para a determinação de daidzeína utilizando o HMDE e a DPV apresentou boa sensibilidade e repetibilidade e baixos limites de detecção e quantificação, possibilitando a sua aplicação no estudo de cultivares de soja da Embrapa quanto à detecção e quantificação de isoflavonóides.

Agradecimentos

CENARGEN, UnB, CNPDIA, UFSCar, CNPq e CAPES.

¹Piubeli, G.C.; Hoffmann-Campo, C.B.; Moscardi, F.; Miyakubo, S.H.; Oliveira, M.C.N.; *J.Chem. Ecol.* 2005, 31, 1509.

²Zhu, J.W.; Park, K.C.; *J.Chem. Ecol.* 2005, 31, 1733.

Desenvolvimento de Métodos Eletroanalíticos para a Determinação de Genisteína e Daidzeína Utilizando Eletrodo Compósito GPU

Aline Carlos de Oliveira¹ (PQ)*, Carlos Manoel Pedro Vaz¹(PQ), Jonatas Gomes da Silva (PG)^{2,3}, Mariana R. L. e Silva^{2,3} (IC), Clarissa Silva Pires de Castro (PQ)³, Lúcia Helena Mascaro⁴ (PQ) alineplis@yahoo.com.br

¹ Embrapa Instrumentação Agropecuária, CP 741, CEP 13.560-970, São Carlos – SP – Brasil

² Instituto de Química-LQAA, Universidade de Brasília, CP 4394, CEP 70.919-970, Brasília – DF – Brasil

³ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-LSA, CP 2372, CEP 70.770-917, Brasília – DF – Brasil

⁴ Departamento de Química – UFSCar-LIEC, CP 676, CEP 13565-905, São Carlos - SP – Brasil

Palavras Chave: Genisteína, Daidzeína, Eletrodo GPU, DPV

Introdução

Desde a sua introdução em 2002, o eletrodo compósito Grafite/Poliuretana (GPU)¹ vêm despertando grande interesse devido as suas potenciais aplicações, especialmente em determinações de compostos orgânicos. Entre esses compostos encontram-se a genisteína e a daidzeína que são isoflavonóides responsáveis pelas funções defensivas da soja contra microorganismos e pestes². Neste contexto, o objetivo deste trabalho é desenvolver métodos eletroanalíticos para a determinação de genisteína e daidzeína utilizando o eletrodo compósito GPU.

Resultados e Discussão

Para um possível aproveitamento analítico do eletrodo GPU 60% (m/m) na determinação de genisteína e daidzeína em voltametria de pulso diferencial, foram realizados estudos com relação à amplitude de pulso (A) e velocidade de varredura (v). Foram utilizadas soluções $5,00 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ genisteína e daidzeína em tampão BR pH 2,0, e os valores selecionados foram A de 100 mv e v de 10 mV s⁻¹.

Em seguida, o eletrodo GPU 60% (m/m) foi empregado na obtenção de curvas analíticas para genisteína e daidzeína (Figura 1), adicionando diferentes concentrações dos isoflavonóides da ordem de 10^{-6} mol L⁻¹ em tampão BR pH 2,0. A Tabela 1 apresenta as figuras de mérito região linear (RL) e limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) obtidas para a genisteína e daidzeína utilizando o eletrodo GPU.

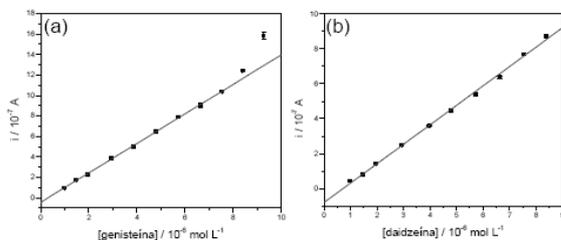


Figura 1. Curvas analíticas obtidas com o eletrodo GPU 60% (m/m) em tampão BR pH 2,0 para (a) genisteína e (b) daidzeína. $v=10$ mV s⁻¹ e $A=100$ mV. Eletrodo de referência: calomelano saturado.

Tabela 1. Figuras de mérito

Análito	RL/ mol L ⁻¹	n	LD/ mol L ⁻¹	LQ/ mol L ⁻¹
Genisteína	$9,92 \times 10^{-7}$ - $7,52 \times 10^{-6}$	9	$2,67 \times 10^{-7}$	$8,87 \times 10^{-7}$
Daidzeína	$9,92 \times 10^{-7}$ - $8,40 \times 10^{-6}$	10	$1,31 \times 10^{-7}$	$4,37 \times 10^{-7}$

Nota-se, por meio das figuras de mérito encontradas, que o eletrodo GPU 60% (m/m) apresenta potencialidades analíticas para a determinação de genisteína e daidzeína em amostras de soja. Contudo, os processos de oxidação dos flavonóides genisteína e daidzeína ocorrem em potenciais muito próximos (730 mV) e correspondem à oxidação do grupo 4'-hidróxi do anel B dos isoflavonóides (Figura 2). Essa observação limita o uso do eletrodo GPU 60% (m/m) para a determinação seletiva dos flavonóides genisteína e daidzeína. Porém, a metodologia desenvolvida poderá ser utilizada para a determinação de isoflavonóides total em soja.

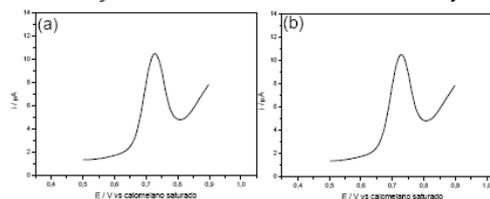


Figura 2. Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em tampão BR pH 2,0 com o eletrodo GPU 60% (m/m) para (a) genisteína (b) daidzeína. $C=5,00 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, $v=10$ mV s⁻¹ e $A=100$ mV.

Conclusões

Os métodos voltamétricos baseados no eletrodo GPU podem ser empregados para a determinação de genisteína e daidzeína, apresentando baixos limites de detecção. Adicionalmente, os métodos desenvolvidos poderão ser empregados para futura identificação de sojas resistentes a insetos, por meio da determinação de isoflavonóides total.

Agradecimentos

FAPESP, CNPq e CAPES.

¹Mendes, R. K.; et al. *Talanta*, 2002, 57, 909.

²Piubelli, G.C.; et al. *J.Chem. Ecol.* 2003, 29, 1223.

XV Encontro do Talento Estudantil/2010

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO ELETROQUÍMICO PARA A DETERMINAÇÃO DE DAIDZINA EM SOJA UTILIZANDO ELETRODO DE MERCÚRIO (Development and validation of an electrochemical method for determination of daidzin in soybean using a mercury electrode)

Freitas, T.V.,¹ Silva, J.G.,² Oliveira, A.C.,³ Moraes, M.C.B.,⁴ Lima, L.H.C.,⁵ Souza, J.R.,⁶ Vaz C.M.P.,⁷ Castro C.S.P.⁸

A daidzina, juntamente com outros isoflavonóides, é um dos principais compostos responsáveis pela resistência da soja a insetos, fungos e bactérias. Para que este eficiente sistema químico de defesa possa ser manipulado e utilizado no monitoramento integrado de pragas, faz-se necessário o conhecimento de como esses compostos são usados no meio ambiente pelas plantas. Portanto, o desenvolvimento de métodos para a determinação de isoflavonóides, em diferentes tecidos das plantas de soja, poderá fornecer dados relevantes para os estudos dos efeitos desses compostos no comportamento dos insetos-praga. Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de um método, baseado na redução do isoflavonóide no eletrodo de mercúrio (HMDE), empregando a voltametria de pulso diferencial (DPV), para a detecção e quantificação de daidzina. As medidas voltamétricas foram realizadas em triplicata, utilizando-se o analisador voltamétrico 797 VA Computrace (Metrohm) e uma célula eletroquímica composta pelo HMDE como eletrodo de trabalho, Ag/AgCl (KCl 3 mol L⁻¹) como eletrodo de referência e platina como eletrodo auxiliar. A solução estoque de Daidzina (LC Laboratories) 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹ foi preparada em etanol (Sigma). Inicialmente, foram otimizados os parâmetros voltamétricos e as condições experimentais para a detecção e quantificação de daidzina em soja: eletrólito suporte tampão fosfato pH 3,0, amplitude de pulso 50 mV e velocidade de varredura 50 mV s⁻¹. O estudo para repetibilidade de resposta do eletrodo de mercúrio para a quantificação de daidzina apresentou RSD menor que 2,0% (n=10). Em seguida, a curva analítica foi obtida pelo método de adição padrão, apresentando para a daidzina a equação $I_{pc} \text{ (nA)} = -3,335 + 1,1 \times 10^7 [\text{Daidzina}]$ (r = 0,998) e linearidade entre 1,0 x 10⁻⁶ a 3,5 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ com limite de detecção 5,7 x 10⁻⁸ mol L⁻¹ e limite de quantificação 1,9 x 10⁻⁷ mol L⁻¹, calculados a partir de: LD = 3Sb/b; LQ = 10Sb/b, onde Sb é o desvio padrão das medidas do branco e b é a inclinação da curva analítica. O método desenvolvido apresentou boa sensibilidade e baixo limite de detecção e quantificação, tornando-se uma excelente alternativa para a determinação de isoflavonóides em grãos e folhas de soja.

Apoio: CENARGEN, UnB, CNPDIA, UFSCar, CNPq e CAPES.

¹Químico, Graduando, Universidade de Brasília - UnB

²Químico, Doutorando, Universidade de Brasília - UnB

³Química, Ph.D., Universidade Federal de Uberlândia - UFU

⁴Química, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

⁵Bióloga, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

⁶Químico, Ph.D., Universidade de Brasília - UnB

⁷Físico, Ph.D., Embrapa Instrumentação Agropecuária

⁸Química, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

XV Encontro do Talento Estudantil/2010

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA A DETERMINAÇÃO DE RUTINA UTILIZANDO ELETRODO DE GRAFITE (Development of an analytical methodology for the determination of rutin using a graphite electrode)

Silva, J.G.,¹ Freitas, T.V.,² Oliveira, A.C.,³ Moraes, M.C.B.,⁴ Lima, L.H.C.,⁵ Souza, J.R.,⁶ Vaz, C.M.P.,⁷ Castro, C.S.P.⁸

A rutina é um flavonóide glicosilado, encontrado em algumas plantas, com propriedades antioxidantes e vasoprotetoras. A soja apresenta alto teor de flavonóides, que são metabólitos secundários com importantes funções defensivas contra microorganismos e pestes. O estudo das defesas constitutivas e induzidas apresenta grande interesse e potencial para sua utilização no manejo de pragas como no desenvolvimento de plantas melhoradas geneticamente. Os métodos voltamétricos têm sido aplicados na determinação de flavonóides (rutina, naringina, fisetina, galangina, morina, quercetina, ramelina, hesperidina, hesperitina) em suco, chá, medicamentos e fluídos biológicos (plasma, urina e sangue). O presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de uma metodologia analítica utilizando o eletrodo de grafite e a voltametria de pulso diferencial (DPV) para a determinação de rutina. Inicialmente, realizou-se um estudo para a seleção do eletrólito suporte e determinação dos parâmetros voltamétricos ótimos: tampão fosfato pH 4,00, amplitude de pulso 50 mV e velocidade de varredura 5 mVs⁻¹. Uma solução estoque de rutina 1x10⁻³ mol L⁻¹ foi preparada em uma mistura etanol-água 1:1 (v/v). Todas as medidas voltamétricas foram realizadas em triplicata, utilizando-se o analisador voltamétrico Metrohm 797 e uma célula eletroquímica composta pelos eletrodos grafite (trabalho), Ag/AgCl (KCl 3 mol L⁻¹) (referência) e platina (auxiliar). O estudo para repetibilidade de resposta do eletrodo de grafite para a quantificação de rutina apresentou RSD menor que 1,0% (n=10). A curva analítica, obtida pelo método de adição de padrão, apresentou a equação $I_{pa} (\mu A) = -0,783 + 9,4 \times 10^5 [Rutina]$ ($r = 0,999$) e linearidade entre 2,0 x 10⁻⁶ a 2,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹, com limite de detecção 1,5 x 10⁻⁷ mol L⁻¹ e limite de quantificação 5,1 x 10⁻⁷ mol L⁻¹, calculados a partir de: LD = 3Sb/b ; LQ = 10Sb/b, onde Sb é o desvio padrão das medidas do branco e b é a inclinação da curva analítica. A metodologia eletroanalítica desenvolvida, para a determinação de rutina, utilizando o eletrodo de grafite e a voltametria de pulso diferencial, apresentou baixos limites de detecção e quantificação, boa repetibilidade e sensibilidade, possibilitando a sua aplicação no estudo de cultivares de soja da Embrapa quanto à identificação e quantificação de flavonóides.

Apoio: CENARGEN, UnB, CNPDIA, UFSCar, CNPq e CAPES.

¹Químico, Doutorando, Universidade de Brasília - UnB

²Químico, Graduando, Universidade de Brasília - UnB

³Química, Ph.D., Universidade Federal de Uberlândia - UFU

⁴Química, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

⁵Bióloga, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

⁶Químico, Ph.D., Universidade de Brasília - UnB

⁷Físico, Ph.D., Embrapa Instrumentação Agropecuária

⁸Química, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

XVIII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ELETROANALÍTICO PARA A DETERMINAÇÃO DE GENISTEÍNA NA PRESENÇA DE RUTINA UTILIZANDO ELETRODO DE PASTA DE CNTs

Aline Carlos de Oliveira¹, Isadora Cristina Costa Mendes¹, Nahara Marie Lacerda¹, Lúcia Helena Mascaro², Carlos Manoel Pedro Vaz³, Jonas Gomes da Silva⁴, Clarissa Silva Pires de Castro⁴

¹ Instituto de Química - UFU, Uberlândia - MG - Brasil; ² Departamento de Química - UFSCar, São Carlos - SP - Brasil; ³ Embrapa Instrumentação Agropecuária, São Carlos - SP - Brasil; ⁴ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília - DF - Brasil.

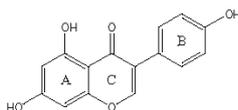
aline@iqfu.ufu.br

RESUMO: Um método eletroanalítico para a determinação de genisteína na presença de rutina foi desenvolvido utilizando eletrodo de pasta de nanotubos de carbono (CNTs) e voltametria de pulso diferencial. Inicialmente, os efeitos dos parâmetros experimentais eletrólito suporte, pH, amplitude de pulso e velocidade de varredura sobre a resposta voltamétrica do eletrodo de pasta de CNTs foram estudados, sendo selecionado para os demais experimentos tampão BR pH 2,0, amplitude de pulso de 100 mV e velocidade de varredura de 10 mV s⁻¹. Uma curva analítica foi obtida para genisteína nas melhores condições experimentais, com região linear entre 9,92×10⁻⁷ e 8,40×10⁻⁶ mol L⁻¹, com limite de detecção de 2,74×10⁻⁷ mol L⁻¹. Para avaliar uma possível interferência da rutina sobre a determinação de genisteína foi realizado estudo de adição e recuperação e o resultado apresentou coeficiente de recuperação de 93%, estando de acordo com os valores permitidos pela AOAC.

Palavras-Chaves: Genisteína, eletrodo de pasta de CNTs, voltametria de pulso diferencial.

INTRODUÇÃO

Desde a sua descoberta em 1991 [1], nanotubos de carbono (CNTs) vêm despertando grande interesse devido as suas propriedades e potenciais aplicações. Entre as diversas aplicações dos CNTs encontram-se muitas na área de eletroanalítica, sendo de interesse investigar o uso desses eletrodos em determinações de compostos orgânicos [2, 3]. Entre esses compostos encontra-se a genisteína (4,5,7-trihidroxi-isoflavona) que é um flavonóide da classe das isoflavonas, amplamente encontrado em frutas e vegetais como a soja. Esse flavonóide, juntamente com inúmeros metabólitos secundários, é responsável pelas funções defensivas de plantas contra microorganismos e pestes. Além disso, a genisteína possui potente efeito anti-estrogênio e inibe várias enzimas envolvidas em processos de carcinogênese [4].



A genisteína é frequentemente encontrada em plantas associada a inúmeros flavonóides, entre os quais encontra-se a rutina. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar a possível aplicação do eletrodo de pasta de CNTs na determinação de genisteína na presença de rutina.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

O eletrodo de pasta de CNTs foi preparado pela mistura de nanotubos de carbono (Schenzen Nanotech Port Co. Ltd. (Schenzen, China)) e nujol, na proporção de 60% (m/m) de CNTs. A mistura foi homogeneizada por pelo menos 10 minutos e inseridas em tubos de vidro com 1,2 mm de diâmetro interno e contato elétrico estabelecido introduzindo-se um fio de latão ao material curado.

As curvas de voltametria de pulso diferencial foram obtidas para a solução de genisteína 5,0×10⁻³ mol L⁻¹, utilizando o intervalo de potencial de 150 a 850 mV e o eletrodo de pasta de CNTs. Nestes experimentos, inicialmente, foi avaliada o efeito do pH sobre a resposta voltamétrica dos eletrodos utilizando tampão fosfato e tampão BR. Os parâmetros experimentais de velocidade de varredura e a amplitude de pulso também foram estudados. Os potenciais são relativos ao eletrodo de prata/ cloreto de prata.

Após a otimização dos parâmetros experimentais, uma curva analítica foi obtida para a genisteína no intervalo de concentração de 9,92×10⁻⁷ a 8,34×10⁻⁶ mol L⁻¹. Para avaliar uma possível interferência de rutina

sobre a determinação de genisteína foi realizada curva de adição e recuperação fixando a concentração de genisteína e rutina em $2,45 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para um possível aproveitamento analítico do eletrodo de pasta de CNTs na determinação de genisteína na presença de rutina em voltametria de pulso diferencial, foram realizados estudos com relação ao eletrólito suporte, pH, amplitude de pulso e a velocidade de varredura.

Inicialmente, foram avaliados como eletrólito suporte os tampões fosfato e BR em diferentes pHs. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 1. É possível observar que o tampão BR apresentou uma maior sensibilidade aliada a um perfil voltamétrico melhor definido. Assim, após este estudo foi selecionado o tampão BR pH 2,0 como eletrólito suporte.

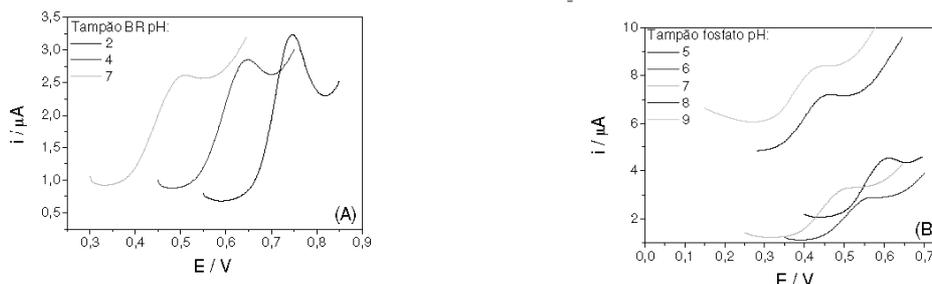
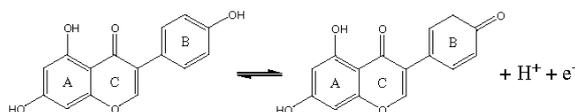


Figura 1: Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em (A): tampão BR e (B) tampão fosfato em diferentes pHs para o eletrodo composto GPU em solução de genisteína $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, A de 100 mV e v de 10 mVs^{-1} .

Na Figura 1 observa-se um pico oxidação correspondente a oxidação do grupo 4'-hidróxi do anel B da genisteína. O mecanismo de oxidação da genisteína é apresentado abaixo:



O efeito da amplitude de pulso sobre a resposta do eletrodo de pasta de CNTs também foi investigado variando-se a amplitude 10 e 100 mV, em solução de genisteína $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão BR pH 2,0. Em seguida foi avaliado o efeito da velocidade de varredura para solução de genisteína nas mesmas condições. A avaliação da velocidade de varredura foi efetuada entre 10 e 35 mV s^{-1} . Os parâmetros otimizados são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Parâmetros otimizados.

Parâmetro	Intervalo	Selecionado
Amplitude de pulso / mV	10 - 100	100
Velocidade de varredura / mV s^{-1}	5 - 10	10

Após a otimização dos parâmetros experimentais, alíquotas de genisteína da ordem de $10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ foram adicionadas à solução de tampão BR pH 2,0 e as intensidades de corrente de pico foram avaliadas após cada adição. A dependência linear da corrente de pico com a concentração de flavonóide em solução possibilitou a construção de curva analítica para a genisteína e o cálculo do limite de detecção. A Figura 2 mostra a curva resultante cuja equação obtida foi $I_{pa} (10^{-7} \text{ A}) = -0,077 (10^{-7} \text{ A mol L}^{-1}) + 0,040 [\text{genisteína}] (10^{-7} \text{ mol L}^{-1})$, com $r = 0,997$ ($n = 11$) no intervalo de concentração de genisteína de $9,92 \times 10^{-7}$ a $8,40 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, com limite de detecção de $2,74 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$.

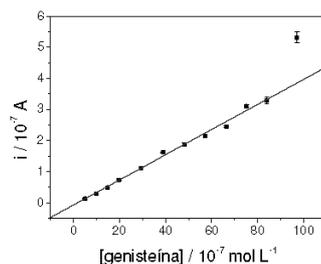


Figura 2: Curva analítica obtida para o eletrodo de pasta de CNTs em solução de tampão BR pH 2,0, contendo diferentes concentrações de genisteína. $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ e $A = 100 \text{ mV}$.

A genisteína é frequentemente encontrada em plantas associada a diversos flavonóides, entre os quais encontra-se a rutina, que apresenta processo de oxidação semelhante a genisteína. Assim, um estudo de interferência foi realizado para investigar o efeito da rutina sobre a resposta voltamétrica da genisteína. Na Figura 3 A é apresentado o voltamograma de pulso diferencial obtido para a genisteína na presença da rutina sob as mesmas condições. É possível observar uma separação nos picos de oxidação da rutina (pico 1) e da genisteína (pico 2) de 225 mV, o que possibilita a determinação de genisteína na presença de rutina.

Após esta etapa, foi realizada uma curva de recuperação utilizando as mesmas concentrações de genisteína e rutina. O resultado obtido neste estudo apresentou coeficiente de recuperação de 93%. A curva de recuperação é apresentado na Figura 3 B.

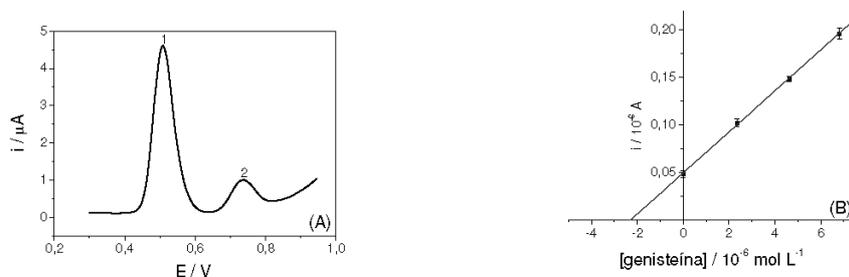


Figura 3: (A) Voltamograma de pulso diferencial obtido com utilizando solução de genisteína e rutina, (B) Curva de recuperação para solução de genisteína na presença de rutina. Condições: concentração de genisteína e rutina $2,45 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; tampão BR pH 2,0; eletrodo de pasta de CNTs; v de 10 mV s^{-1} e A de 100 mV .

Nota-se que o valor de recuperação encontrado está de acordo com os valores permitidos pela AOAC (entre 70 e 130%). Desta forma, é possível concluir que o eletrodo de pasta de CNTs pode ser utilizado na determinação de genisteína sem a necessidade de tratamento prévio para a eliminação de rutina.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que eletrodo de pasta de CNTs apresenta potencialidades analíticas na determinação de genisteína na presença de rutina.

AGRADECIMENTOS: FAPEMIG, CAPES e CNPq.

REFERÊNCIAS

- [1] IJIMA S., "Helical microtubules of graphitic carbon", *Nature* 354: 56-58, 1991.
- [2] HUANG W., HU W. and SONG J. "Adsorptive stripping voltammetric determination of 4-aminophenol at a single-wall carbon nanotubes film coated electrode", *Talanta*. 61(3): 411-416, 2003.
- [3] QU W., WU K. and HU S. "Voltammetric determination of pyridoxine (Vitamin B₆) by use of a chemically-modified glassy carbon electrode", *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36(3): 631-635, 2004.
- [4] RGNUTRI, Internet site address: <http://www.rgnutri.com.br/sqv/saude/cmi.php> acessado em 07/072010



DETERMINAÇÃO DE ISOFLAVONAS TOTAIS EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS EMPREGANDO A VOLTAMETRIA DE PULSO DIFERENCIAL E O ELETRODO DE CARBONO VÍTREO

Jonatas G. da Silva^{a,b,*} (PG), Thiago V. de Freitas^{a,b} (IC), Gabriella Magarelli^a (TC), Aline C. de Oliveira^{c,d} (PQ), Luzia H. C. Lima^a (PQ), Jurandir R. de Souza^b (PQ), Carlos M. P. Vaz (PQ)^c e Clarissa S. P. de Castro^a (PQ)

^aEmbrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brasil

^bInstituto de Química, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil

^cInstituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil

^dEmbrapa Instrumentação Agropecuária, São Carlos, SP, Brasil

*e-mail: jonatasg@yahoo.com.br

Estudos vêm demonstrando que algumas variedades de soja apresentam uma eficiente defesa contra insetos herbívoros. Estas variedades mais resistentes a pragas apresentam alto teor de isoflavonas, metabólitos secundários com importantes funções defensivas contra microorganismos e pestes^{1,2}. A identificação e quantificação destes metabólitos, em diferentes cultivares, geram importante informação para os melhoristas na escolha das cultivares para o melhoramento, tanto clássico como o transgênico. Portanto, o objetivo desse trabalho é o desenvolvimento de um método, baseado na oxidação das isoflavonas no eletrodo de carbono vítreo (GC), empregando a voltametria de pulso diferencial (DPV), para a determinação de isoflavonas totais. As medidas voltamétricas foram realizadas em triplicata, utilizando-se o analisador voltamétrico 797 VA Computrace (Metrohm) e uma célula eletroquímica composta pelo eletrodo de GC ($\phi = 2$ mm) como eletrodo de trabalho, Ag/AgCl (KCl 3 mol L⁻¹) como eletrodo de referência e platina como eletrodo auxiliar. A solução padrão de daidzeína (LC Laboratories) 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹, preparada em etanol (Sigma), foi utilizada na determinação de isoflavonas totais. Primeiramente foram otimizados os parâmetros voltamétricos e as condições experimentais: pH e eletrólito suporte (Tampão fosfato pH 6,0), amplitude de pulso (50 mV) e velocidade de varredura (v) (5 mV s⁻¹). O estudo para repetibilidade de resposta do eletrodo de GC para a daidzeína apresentou RSD menor que 1,0% (n=10). A curva analítica, obtida pelo método de adição de padrão, apresentou a equação $I_{pa}(nA) = -6,47 + 7,5 \times 10^7 [Daidzeína]$ ($r = 0,998$) e linearidade entre 1,0 x 10⁻⁶ a 1,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹, com limite de detecção 1,3 x 10⁻⁷ mol L⁻¹ mol L⁻¹ e limite de quantificação 4,3 x 10⁻⁷ mol L⁻¹, calculados a partir de: LD = 3Sb/b; LQ = 10Sb/b, onde Sb é o desvio padrão das medidas do branco e b é a inclinação da curva analítica. O método desenvolvido foi utilizado na determinação de isoflavonas totais em formulação farmacêutica a base de extrato de soja, que é utilizada na redução dos sintomas decorrentes do climatério. Dez comprimidos da formulação farmacêutica foram pesados e previamente pulverizados em graal. A extração das isoflavonas a partir do pó obtido dos comprimidos (0,10 g) foi realizada em triplicata, com 4 mL de etanol 70%, utilizando ultra-som por 20 minutos. Os extratos resultantes foram centrifugados e transferidos para balão volumétrico, onde o volume foi completado com etanol para 10 mL. A concentração média de isoflavonas totais de soja na formulação farmacêutica foi 27,27 ± 1,65 mg comprimido⁻¹, com erro relativo de 9,10% em relação ao indicado no rótulo (30 mg comprimido⁻¹). A recuperação de daidzeína adicionada variou de 93 a 115%, indicando ausência de efeito de matriz. Os resultados obtidos mostram a viabilidade de aplicação do método eletroanalítico desenvolvido na determinação de isoflavonas totais, utilizando o eletrodo de GC e a voltametria de pulso diferencial, pois apresentou baixos limites de detecção e quantificação, boa repetibilidade e sensibilidade, possibilitando também a sua aplicação no estudo de cultivares de soja da Embrapa quanto à identificação e quantificação de isoflavonas totais.

XVI Encontro do Talento Estudantil/2011

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA A DETERMINAÇÃO DE ISOFLAVONAS TOTAIS UTILIZANDO O ELETRODO DE CARBONO VÍTREO (Development of Analytical Methodologies for Determination of Total Isoflavones using a Glassy Carbon Electrode)

Silva, J.G.,¹ Oliveira, A.C.,² Moraes, M.C.B.,³ Lima, L.H.C.,⁴ Souza, J.R.,⁵ Vaz, C.M.P.,⁶ Castro, C.S.P.⁷

Estudos vêm demonstrando que algumas variedades de soja apresentam uma eficiente defesa contra insetos herbívoros. Estas variedades mais resistentes a pragas apresentam alto teor de isoflavonas, metabólitos secundários com importantes funções defensivas contra microrganismos e pestes. A identificação e quantificação destes metabólitos, em diferentes cultivares, geram importante informação para os melhoristas na escolha das cultivares para o melhoramento, tanto clássico como o transgênico. Portanto, o objetivo desse trabalho é o desenvolvimento de metodologias, baseadas na oxidação das isoflavonas no eletrodo de carbono vítreo (GC), empregando a voltametria de pulso diferencial (DPV), para a determinação de isoflavonas totais. As medidas voltamétricas foram realizadas em triplicata, utilizando-se o analisador voltamétrico 797 VA Computrace (Metrohm) e uma célula eletroquímica composta pelo eletrodo de GC ($\Phi = 2$ mm) como eletrodo de trabalho, Ag/AgCl (KCl 3 mol L⁻¹) como eletrodo de referência e platina como eletrodo auxiliar. As soluções padrão das isoflavonas (daidzeína, daidzina, genisteína, genistina, gliciteína e glicitina) (LC Laboratories) 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹, preparadas em etanol (Sigma), foram utilizadas no desenvolvimento das metodologias analíticas para determinação de isoflavonas totais. Primeiramente foram otimizados os parâmetros voltamétricos e as condições experimentais: pH e eletrólito suporte (Tampão fosfato pH 6,0), amplitude de pulso (50 mV) e velocidade de varredura (v) (5 mV s⁻¹). Nos voltamogramas de pulso diferencial obtidos para as isoflavonas observou-se sinais entre 0,500 e 0,600 V correspondentes a oxidação das isoflavonas no eletrodo de GC. Como os potenciais de oxidação das isoflavonas são próximos, não é possível fazer a determinação simultânea das isoflavonas estudadas. No entanto, estes sinais poderão ser utilizados na detecção e quantificação de isoflavonas totais em soja. Para o desenvolvimento das metodologias analíticas foram selecionadas as isoflavonas daidzeína e genisteína. Foram escolhidas as duas isoflavonas que apresentaram os melhores e maiores sinais de oxidação no eletrodo de GC, com o objetivo de verificar qual delas oferece os melhores valores de limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e recuperação quando os métodos desenvolvidos forem aplicados na análise de isoflavonas totais. As curvas analíticas, obtidas pelo método de adição de padrão, apresentaram as equações $I_{pa}(nA) = -6,47 + 7,5 \times 10^7 [Daidzeína]$ ($r = 0,998$) e $I_{pa}(nA) = -8,388 + 5,7 \times 10^7 [Genisteína]$ (0,998) e linearidade entre 1,0 x 10⁻⁶ a 1,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹, com LD e LQ da ordem de 10⁻⁷ mol L⁻¹, calculados a partir de: LD = 3Sb/b; LQ = 10Sb/b, onde Sb é o desvio padrão das medidas do branco e b é a inclinação da curva analítica. As metodologias analíticas desenvolvidas utilizando-se o eletrodo de GC e a DPV e as isoflavonas daidzeína e genisteína apresentaram boa sensibilidade e repetibilidade e baixos limites de detecção e quantificação, possibilitando a sua aplicação no estudo de cultivares de soja da Embrapa quanto à detecção e quantificação de isoflavonas totais.

Apoio: CENARGEN, UnB, CNPDIA, UFSCar, CNPq e CAPES.

¹Químico, Doutorando, Universidade de Brasília - UnB

³Química, Ph.D., Universidade Federal de Uberlândia - UFU

⁴Química, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

⁴Bióloga, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

⁵Químico, Ph.D., Universidade de Brasília - UnB

⁶Físico, Ph.D., Embrapa Instrumentação Agropecuária

⁷Química, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Food Composition and Analysis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jfca

Original Article

Cathodic adsorptive stripping voltammetric determination of rutin in soybean cultivars

Jonatas Gomes da Silva^{a,b}, Mariana Rodrigues Lopes e Silva^{a,b}, Aline Carlos de Oliveira^c, Jurandir Rodrigues Souza^b, Carlos Manoel Pedro Vaz^c, Clarissa Silva Pires de Castro^{a,*}^aLaboratório de Tecnologias para a Segurança Alimentar, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, P.O. Box 02372, 70.770-917 Brasília, DF, Brazil^bLaboratório de Química Analítica e Ambiental, Instituto de Química, Universidade de Brasília, P.O. Box 04394, 70.919-970 Brasília, DF, Brazil^cLaboratório de Sensores, Embrapa Instrumentação Agropecuária, P.O. Box 741, 13.560-970 São Carlos, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 November 2010

Received in revised form 11 April 2011

Accepted 18 April 2011

Available online 8 May 2011

Keywords:

Copper

Cathodic adsorptive stripping voltammetry

Cyclic voltammetry

Mercury electrode

Rutin

Soybean

Food analysis

Food composition

ABSTRACT

A highly sensitive and selective cathodic adsorptive stripping voltammetric method for determination of rutin is presented. The method relies on the accumulation of a Cu(II)–rutin complex at a hanging mercury drop electrode (HMDE), followed by its reduction during a differential pulse voltammetric scan. The electrochemical behavior of the Cu(II)–rutin complex at HMDE was investigated by cyclic voltammetry. Results show that the electrode process is adsorption-controlled and gradually becomes less reversible at high scan rates where peak separation grows. Under the optimized conditions (phosphate buffer pH 6, 1.000 V accumulation potential, 180 s accumulation time, 70 mV pulse amplitude, 50 mV s⁻¹ scan rate and 1.6 × 10⁻⁶ M Cu(II) concentration), the reduction peak current (*I*_{pc}) of the Cu(II)–rutin complex is linear (*I*_{pc} (nA) = 10.070 + 1.9 × 10⁸ [Rutina]) to rutin concentration in the range from 2.0 × 10⁻⁷ to 1.4 × 10⁻⁶ M, with a correlation coefficient of 0.999. The detection and quantification limits obtained were 7.0 × 10⁻⁹ M and 2.2 × 10⁻⁸ M, respectively. The method was successfully applied to the determination of rutin in soybean cultivars, with recoveries of 94–105%.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The use of soybeans as food has increased due to the importance of its nutritional properties and beneficial effects on human health (Ribeiro et al., 2007; Kumar et al., 2006). Among these effects, soybeans use can reduce the risk of the major killer diseases, such as breast cancer, cardiovascular disease, osteoporosis, diabetes, and has a role in alleviating menopausal symptoms (Kumar et al., 2006). Several authors have considered flavonoids to be responsible for the beneficial effects of soybeans (Ribeiro et al., 2007; Kumar et al., 2006; Hutabarat et al., 2001; Umphress et al., 2005). The flavonoid constituents of soybeans are responsible for major bioactivities, such as antiphlogistic, antioxidatic, antiallergic and diuretic properties.

Flavonoids are a large family of over 4000 ubiquitous secondary plant metabolites, comprising seven subclasses, anthocyanins (e.g. europinidin), flavones (e.g. apigenin), flavonols (e.g. quercetin), flavanonols (e.g. taxifolin), isoflavones (e.g.

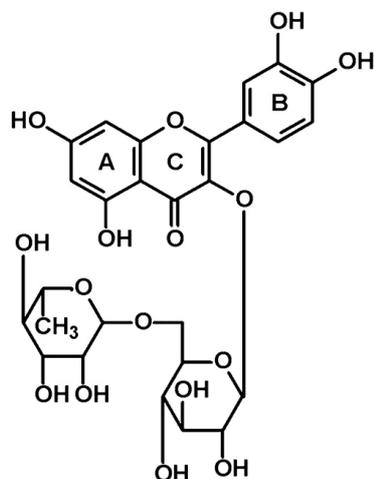
genistein), flavanones (e.g. naringenin) and flavonol glycosides (e.g. rutin). Flavonoids are known to possess strong antioxidant properties, which can be due to both their radical-scavenging effects and metal-chelating properties, of which the former may dominate. Owing to the antioxidant properties, they can prevent deoxyribonucleic acid (DNA) and cells from oxidative damage, and thus possess a wide range of pharmacological activities such as antitumor, anti-inflammatory and antiaging (Úndeđer et al., 2004).

Rutin (Scheme 1), one of the most abundant flavonoids in the human diet, also known as vitamin P, has been shown to act as a scavenger of various oxidizing species, i.e. hydroxyl and peroxy radicals. As a result of these biological effects, its pharmacological activities have been widely explored including antibacterial, anti-inflammatory, antitumor, antiallergic, antiviral and antiprotazoal properties (Hasumura et al., 2004; Blasco et al., 2004).

The determination of rutin in different matrices (herbs, pharmaceutical preparations, fruits and cereals) may be performed using various analytical methods, such as high performance liquid chromatography with various detectors (Danila et al., 2007; Kurzawa, 2010; Lu et al., 2006; Novak et al., 2008), spectrophotometric (Kreft et al., 2002; Kurzawa, 2010), capillary electrophoretic (Chen et al., 2001) and electrochemical (Zoulis and Efstahiu, 1996). The detection limits achieved by these methods ranged from 1.5 × 10⁻¹³ M to 1.9 × 10⁻⁶ M.

* Corresponding author. Tel.: +55 61 34484671; fax: +55 61 34484660.

E-mail addresses: jonatasg@yahoo.com.br (J.G. da Silva), marynana_lopes@yahoo.com.br (M.R.L. e Silva), alineplis@yahoo.com.br (A.C. de Oliveira), rodsouza@unb.br (J.R. SouzaDe), vaz@cnpdia.embrapa.br (C.M.P. Vaz), clarissapcastro@gmail.com, clarissa@cenargen.embrapa.br (C.S.P. de Castro).



Scheme 1. The chemical structure of rutin.

Since most flavonoids are electrochemically active at moderate oxidation potentials, electrochemical methods of analysis are preferable due to the advantages of high sensitivity, simplicity, good stability, inexpensive instrumentation and less interference from non-electroactive substances. Many publications concerning this topic can be found in the literature. A carbon composite electrode modified with Cu(II)–resin was used in the voltammetric determination of rutin in Brazilian pharmaceutical formulations (Freitas et al., 2009). Rutin has also been determined in pharmaceutical samples by electrochemical methods based on many modified glassy carbon electrodes. Chen et al. (2010) prepared a poly(*p*-aminobenzene sulfonic acid) glassy carbon modified electrode to determine rutin with no interference from the coexisting ascorbic acid. A gold nanoparticle/ethylenediamine/carbon nanotube modified glassy carbon electrode and anodic stripping voltammetry were successfully used in the determination of rutin in the presence of ascorbic acid (Yang et al., 2010). Santos et al. (2007) demonstrated that the determination of rutin by square wave voltammetry at a poly glutamic acid modified glassy carbon electrode could be done with good sensitivity. Acetylene black nanoparticles were used to modify the surface of a glassy carbon electrode and this electrochemical sensor was successfully employed for rapid determination of rutin (Song et al., 2010). Du et al. (2010) designed a graphene nanosheets modified glassy carbon electrode to determine rutin with satisfied recovery. A voltammetric procedure based on a lead film modified glassy carbon electrode was applied to rutin determination without any matrix effects (Tyszczyk, 2009). Ionic liquid modified electrodes have also been employed to investigate the electrochemical behavior of rutin (Liu et al., 2010) as well as in the determination of rutin in pharmaceutical and biological samples (Zhang and Zheng, 2008; Zhan et al., 2010; Sun et al., 2008; Wang et al., 2010). Wu et al. (2008) developed an electrochemical method based on adsorptive stripping analysis at single-sided heated graphite cylindrical electrodes with direct current heating to determine nanomolar concentrations of rutin. The detection limits achieved by these electrochemical methods ranged from 2.5×10^{-10} M to 3.6×10^{-7} M.

However, the modified electrodes in many cases are expensive, difficult and tedious to be prepared and have low stability. In

comparison to solid electrodes, mercury electrodes offer a clean electrode surface and more favorable electrode kinetics in many redox couples. Rutin is known to complex with various metal cations to form stable compounds, which have demonstrable anti-inflammatory and anti-cancer activities. In this context, some studies have shown the interaction between rutin and Cu(II) (Le Nest et al., 2004a,b). Esparza et al. (2005) reported a 1:1 stoichiometry ratio for the complex formed between copper and rutin.

In recent years, the Cu(II)–rutin complex has been used for rutin determination by cathodic adsorptive stripping voltammetry (CA_{AdSV}) with a hanging mercury drop electrode (HMDE) (Temerk et al., 2006; Ensafi and Hajian, 2006). This methodology, which involves the adsorption of the Cu(II)–rutin complex on a HMDE surface and its reduction, has been employed in the quantification of rutin in pharmaceutical formulations, human urine, blood serum and tea (Temerk et al., 2006; Ensafi and Hajian, 2006) with detection limits ranging from 0.5×10^{-9} M to 4.9×10^{-9} M. The CA_{AdSV} at HMDE has also been used in naringin and hesperidin determinations in fruit juices and pharmaceutical preparations (Reichart and Obendorf, 1998; Obendorf and Reichart, 1995).

However, to the best of our knowledge, this methodology has not yet been applied for rutin determination in soybean samples. This work describes a highly sensitive and selective CA_{AdSV} method for the determination of rutin in soybean cultivars. Controlled adsorptive accumulation of the rutin–Cu(II) complex on the HMDE provides the basis for the direct stripping measurement of rutin. Thus, different parameters were evaluated and optimized for its quantification. Compared to other analytical techniques, the proposed method represents good selectivity, high sensitivity, rapid responses, low-cost instrumentation and reduced sample size for the determination of rutin. Moreover, the study presents additional data on the interfering effect of other phenolic compounds to the measured analytical signal.

2. Materials and methods

2.1. Apparatus

CA_{AdSV} and cyclic voltammetric (CV) measurements were carried out on a 797 Voltammetric Analyzer (VA) Computrace (Metrohm, Switzerland) with an electrochemical cell composed of a HMDE as working electrode, Ag/AgCl (3 M KCl) electrode as reference and a platinum wire as auxiliary electrode. CA_{AdSV} measurements were performed in the potential range of 0.100 V (initial potential, E_i) to -1.100 V (final potential, E_f) at the following settings: $E_{acc} = -1.000$ V accumulation potential, $t_{acc} = 180$ s accumulation time, $t_e = 10$ s equilibration time, 0.3 mm^2 surface area of the mercury drop, 70 mV pulse amplitude and $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ scan rate. CV measurements were performed at the following settings: $E_i = 0.200$ V, $E_w = -1.500$ V switching potential, $\nu = 10\text{--}600 \text{ mV s}^{-1}$. The hydrogen-ion potential (pH) of the solutions was determined using a 3030 pH-meter (Jenway, United Kingdom) with a DME-CV1 combination pH electrode (Digimed, Brazil). Ultraviolet (UV) Spectrophotometric measurements at 352.5 nm were carried out on a UV mini-1240 spectrophotometer (Shimadzu, Japan) with 1 cm quartz cuvettes.

2.2. Chemicals and samples

Analytical-reagent grade chemicals and ultrapure water (Millipore, United States) were used to prepare all solutions. Rutin hydrate (95% purity) was purchased from Sigma–Aldrich (Brazil) and used without further purification. Cooper stock standard 1000 mg L^{-1} (>99.9% purity) solution was purchased from Fluka (Switzerland). Nitric acid and ethanol were purchased from

Quimex (Brazil) and Vetec Química Fina (Brazil), respectively. Rutin Standard Stock solution (1.0×10^{-3} M) was prepared by dissolving 6.1 mg of rutin hydrate in 5 mL of ethanol, aided by 5 min sonication, and then diluting with water to 10 mL. Britton–Robinson (BR) buffers in pH range of 3–12 were prepared using phosphoric, acetic and boric acids purchased from Sigma–Aldrich (Brazil). Acetic acid was also used to extract rutin from soybean seeds and leaves. Phosphate buffers in the pH range of 3–12 were prepared using dibasic sodium phosphate, monobasic potassium phosphate and phosphoric acid purchased from Sigma–Aldrich (United States, Brazil). Sodium hydroxide and hydrochloric acid (Sigma–Aldrich, Germany) were used for pH adjustment. Hexane (Sigma–Aldrich, Germany) was used to degrease the soybean flour. A pharmaceutical formulation (Zurita, Brazil) labeled to contain 20 mg mL^{-1} of rutin was purchased in a local drugstore of Brasília (Brazil) and was prepared for voltammetric analyses by diluting it ($10 \mu\text{L}$) in 10 mL of ultrapure water. Soybean leaves of the genotype IAC-100 and Dowling (Embrapa Cerrados, Brazil), produced under greenhouse conditions (temperature (T) = 27 ± 2 °C, relative humidity (RH) = 70%), were harvested at growth Vegetative 6 (V6) (Fehr and Caviness, 1977). Soybean seeds of the genotypes P98R6 (Pioneer Sementes, Brazil) and BRQ 96-3065 (Embrapa Cerrados, Brazil) were collected from a central-west Brazilian soybean production region ($15^{\circ}56'20.06''\text{S}$ latitude, $47^{\circ}34'54.14''\text{O}$ longitude). Rutin was extracted from 100 mg samples (three) of dried macerated soybean leaves or defatted soybean flour with 4.0 mL of 70% aqueous ethanol containing 0.1% acetic acid, at room temperature, for 1 h, with constant agitation, according to the optimized isoflavone (daidzein, genistein, glycitein, genistin, daidzina, glycitin, 6'-O-malonyldaidzin, 6'-malonyl-genistin, 6'-O-malonylglycitin, 6'-acetylaidzin, 6'-O-acetylgenistin and 6'-O-acetylglucitin) extraction procedure described by Carrão-Panizzi et al. (2002) and Park et al. (2001). The defatted soybean flour was obtained by drying and grinding 5 g of soybean seeds with subsequent degreasing of the resultant flour (2 g) with 200 mL of hexane for 6 h.

2.3. Procedure

The laboratory glassware was kept in a 20% (by volume) nitric acid solution overnight. Afterwards, it was kept in an ultra pure water bath overnight, rinsed thoroughly with ultra pure water and air-dried.

In order to avoid interferences due to rutin and copper adsorption on the working surfaces of the electrode system, electrodes were submitted to periodic cleaning with 20% HNO_3 (by volume) followed by a generous wash with ultra pure water. Experiments were performed at room temperature in three replicates and preceded by a gentle N_2 bubbling to prevent oxygen diffusion into the electrochemical cell (5 min for the supporting electrolyte and 1 min after copper and rutin addition).

The general information about the electroactivity and possible surface activity of Cu(II)–rutin complex were obtained by CV through additions of $100 \mu\text{L}$ of 1.0×10^{-3} M Cu(II) and $100 \mu\text{L}$ of 1.0×10^{-3} M rutin to the electrochemical cell containing 10 mL of phosphate buffer pH 6 with scan rate ranging from 10 to 600 mV s^{-1} .

In order to optimize the experimental conditions and gain the highest sensitivity for the CAdSV method, the influence of various operational parameters including composition of the supporting electrolyte, pH, accumulation potential, accumulation time, Cu(II) concentration, ν and pulse amplitude on the reduction peak current of Cu(II)–rutin ($I_{p,c}$) complex were studied.

The influence of the supporting electrolyte (phosphate, BR, borate and McIlvaine buffer solutions) and pH on the peak current of Cu(II)–rutin complex by using CAdSV was studied through additions of $100 \mu\text{L}$ of 1.0×10^{-4} M Cu(II) and $100 \mu\text{L}$ of 1.0×10^{-4} M rutin to the electrochemical cell containing 10 mL

of BR (4.0×10^{-2} M H_3PO_4 , 4.0×10^{-2} M CH_3COOH and 4.0×10^{-2} M H_3BO_3) or phosphate (2.0×10^{-2} M H_3PO_4 ; 1.2×10^{-3} to 5.7×10^{-2} M Na_2HPO_4 ; 1.2×10^{-1} to 4.5×10^{-3} M KH_2PO_4 ; 4.6×10^{-3} to 7.7×10^{-2} M Na_3PO_4) buffers in the pH range of 3–12.

The study of the influence of accumulation potential (range of -1.200 to -0.500 V), pulse amplitude (range of 10 – 100 mV), scan rate (range of 5 – 600 mV s^{-1}) and accumulation time (range of 30 – 300 s) on the peak current of Cu(II)–rutin complex by using CAdSV was accomplished through additions of $100 \mu\text{L}$ of 1.0×10^{-4} M Cu(II) and $100 \mu\text{L}$ of 1.0×10^{-4} M rutin to the electrochemical cell containing 10 mL of phosphate buffer pH 6.

The effect of the copper concentration on the peak current of Cu(II)–rutin complex by using CAdSV was evaluated through additions of $100 \mu\text{L}$ of 1.0×10^{-4} M rutin and successive additions of $20 \mu\text{L}$ of 1.0×10^{-4} M Cu(II) to the electrochemical cell containing 10 mL of phosphate buffer pH 6.

In order to evaluate the selectivity of the proposed method, the interfering effect of the main isoflavones (daidzein, daidzin, genistein, genistin, glycitein and glycitin) and phenolic acids (galic, *p*-hydroxybenzoic, vanilic, chlorogenic, caffeic and ferulic acids) found in soybeans on the determination of rutin by CAdSV was investigated. This interference study was accomplished through successive additions of $20 \mu\text{L}$ of 1.0×10^{-4} M rutin to the electrochemical cell containing 10 mL of phosphate buffer pH 6, $160 \mu\text{L}$ of 1.0×10^{-4} M Cu(II), $50 \mu\text{L}$ of 1.0×10^{-4} M rutin and 5 – $500 \mu\text{L}$ of 1.0×10^{-4} M isoflavone or phenolic acid. Tolerance limit was defined as the concentration which gives an error of $\leq 10\%$ in the determination of 4.9×10^{-7} M rutin.

The calibration curve was obtained by using CAdSV through successive additions of $20 \mu\text{L}$ of 1.0×10^{-4} M rutin to the electrochemical cell containing 10 mL of phosphate buffer pH 6 and $160 \mu\text{L}$ of 1.0×10^{-4} M Cu(II). The practical feasibility of the CAdSV method was tested by the analysis of a real sample (pharmaceutical formulation) in order to compare the results obtained by this new procedure with those acquired by a standard spectrophotometric method [AOAC (The Scientific Association Dedicated to Analytical Excellence) International, 1995]. The determination of rutin in the pharmaceutical formulation by the standard addition method was accomplished through successive additions of $20 \mu\text{L}$ of 1.0×10^{-4} M rutin to the electrochemical cell containing 10 mL of phosphate buffer pH 6, $160 \mu\text{L}$ of 1.0×10^{-4} M Cu(II) and $100 \mu\text{L}$ of the pharmaceutical formulation.

The proposed method was applied to the determination of rutin in four soybean cultivars. Rutin was determined in soybean samples using the standard addition method through successive additions of 20 or $50 \mu\text{L}$ of 1.0×10^{-4} M rutin to the electrochemical cell containing 10 mL of phosphate buffer pH 6, $160 \mu\text{L}$ of 1.0×10^{-4} M Cu(II) and 40 or $50 \mu\text{L}$ of soybean sample.

3. Results and discussion

3.1. Cyclic voltammetry

Fig. 1 shows the cyclic voltammograms obtained for 4.5×10^{-5} M Cu(II) in the absence and in the presence of 4.5×10^{-5} M rutin in 10 mL of phosphate buffer pH 6 at $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$. Curve A represents the oxidation–reduction process of the supporting electrolyte (phosphate buffer pH 6). Curve B shows the oxidation (peak 2) and reduction (peak 1) process of Cu(II) in the absence of rutin. The addition of rutin to a solution of Cu(II) results in two well defined peaks: one at -0.250 V (peak 3, Curve C) and the other at -0.180 V (peak 4, Curve C) that can be assigned to the reduction and oxidation of Cu(II)–rutin complex, respectively. In the range of 10 – 600 mV s^{-1} , the reduction peak current of Cu(II)–rutin complex is linear to the

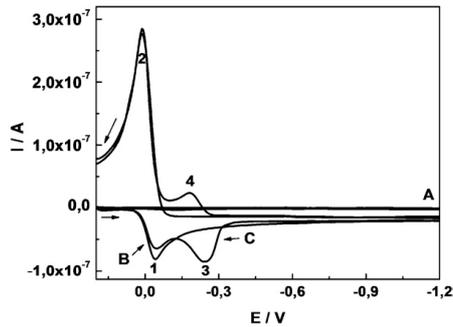


Fig. 1. Cyclic voltammograms obtained for 4.5×10^{-5} M Cu(II) in the absence (curve B) and in the presence of 4.5×10^{-5} M rutin (curve C) in 10 mL of phosphate buffer pH 6 (curve A). Initial potential (E_i) = 0.200 V, switching potential (E_w) = -1.200 V, scan rate (ν) = 100 mV s⁻¹, working electrode: hanging mercury drop electrode (HMDE), reference electrode: Ag/AgCl (KCl 3 M).

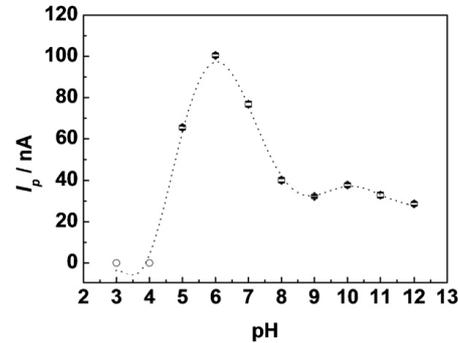


Fig. 2. Effect of the pH on the adsorptive cathodic stripping peak currents of 1.0×10^{-6} M of rutin in the presence of 1.0×10^{-6} M Cu(II). Accumulation potential (E_{acc}) = -1.100 V, accumulation time (t_{acc}) = 180 s, initial potential (E_i) = 0.100 V; final potential (E_f) = -1.100 V, pulse amplitude = 70 mV, scan rate = 50 mV s⁻¹, working electrode: hanging mercury drop electrode (HMDE), reference electrode: Ag/AgCl (KCl 3 M).

scan rate, and the regression equation is $I_{pc} = -1.491 + 0.529\nu$ (I_{pc} : nA, ν : mV s⁻¹, $r = 0.999$), indicating that the electrode process is adsorption-controlled. The reduction peak potential of Cu(II)-rutin complex (E_{pc}) shifts to negative potential with increasing scan rate and it is linear to the logarithm of the scan rate ($\log \nu$) for scan rates in the range from 50 to 600 mV, following the regression equation: $E_{pc} = -0.285 + 0.035 \log \nu$ (E_{pc} : V, ν : V s⁻¹, $r = 0.993$). Considering that two electrons are involved in the reduction process (Ensafi and Hajian, 2006), the electron-transfer coefficient ($\alpha = 0.420$) was calculated from the slope ($b/2$ where b is the Tafel slope ($-2.3RT/\alpha nF$)) of E_{pc} versus $\log \nu$ plot (Laviron, 1979). This value is in close agreement with that determined by Ensafi and Hajian (2006). The peak separation ($\Delta E_p = |E_{pc} - E_{pa}|$) is about 60 mV at $\nu = 100$ mV s⁻¹. At high scan rates, ΔE_p grows with increasing scan rates, indicating that the electron-transfer rate is not very fast and the electrochemical reaction gradually becomes less reversible.

The formation of this Cu(II)-rutin complex at the surface of HMDE provides the possibility of accumulation and indirect determination of rutin by CADSV.

3.2. Influence of operational parameters

3.2.1. Influence of composition of the supporting electrolyte and pH

The best results concerning signal enhancement and shape of Cu(II)-rutin complex reduction peak current were obtained in a

phosphate buffer at pH 7 and a rutin concentration of 1.0×10^{-6} M. Thus, for all further measurements, phosphate buffer was chosen as the supporting electrolyte. As expected, the reduction peak current of the Cu(II)-rutin complex is affected by the pH of the phosphate buffer solution (Fig. 2). With increasing pH of the solution, the Cu(II)-rutin complex reduction peak current increases and reaches a maximum at pH 6, then decreases. This phenomenon can be assigned to the reaction of hydroxide ions with copper ions that occurs at pH higher than 6, preventing the formation of the Cu(II)-rutin complex. This is in accordance with that reported in the literature (Ensafi and Hajian, 2006). Hence, the phosphate buffer pH 6 was chosen for further measurements.

3.2.2. Accumulation potential and time

Fig. 3a shows that the reduction peak current of the Cu(II)-rutin complex increases when the accumulation potential is changed from -1.200 to -0.900 V and decreases when the accumulation potential is changed from -0.900 to -0.500 V. This means that a more negative potential is favorable to the accumulation of the Cu(II)-rutin complex on the HMDE surface. These results are in agreement with Esparza et al. (2005), who found that a very negative accumulation potential (-1.200 V) is necessary to favor the reduction of rutin and the formation of Cu(II)-rutin complex on the electrode surface. Although the best results concerning signal

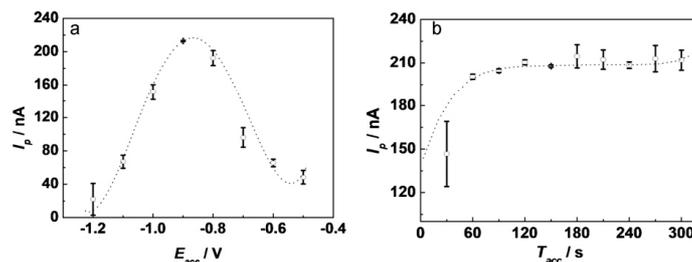


Fig. 3. (a) Effect of the accumulation potential (E_{acc}) on the adsorptive cathodic stripping peak currents of 1.0×10^{-6} M of rutin in the presence of 1.0×10^{-6} M Cu(II) in 10 mL of phosphate buffer pH 6. $E_{acc} = -1.200$ to -0.500 V, accumulation time (t_{acc}) = 180 s, initial potential (E_i) = 0.100 V, final potential (E_f) = -1.100 V, pulse amplitude = 70 mV, (ν) scan rate = 50 mV s⁻¹; (b) effect of the accumulation time (t_{acc}) on the adsorptive cathodic stripping peak currents of 1.0×10^{-6} M of rutin in the presence of 1.0×10^{-6} M Cu(II) in 10 mL of phosphate buffer pH 6. $E_{acc} = -1.000$ V, $t_{acc} = 30$ –300 s, initial potential (E_i) = 0.050 V, final potential (E_f) = -0.400 V, pulse amplitude = 70 mV, (ν) scan rate = 50 mV s⁻¹, working electrode: hanging mercury drop electrode (HMDE), reference electrode: Ag/AgCl (KCl 3 M).

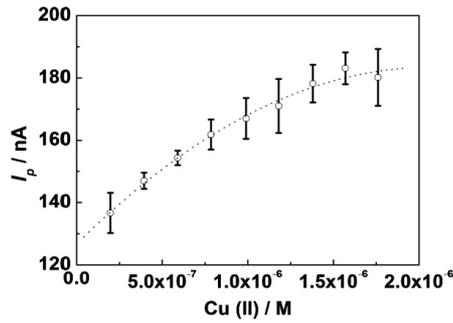


Fig. 4. Effect of the copper(II) concentration on the adsorptive cathodic stripping peak currents of 1.0×10^{-6} M of rutin in the presence of 2.0×10^{-7} to 1.8×10^{-6} M Cu(II) in 10 mL of phosphate buffer pH 6. Accumulation potential (E_{acc}) = -1.000 V, accumulation time (t_{acc}) = 180 s, initial potential (E_i) = 0.050 V, final potential (E_f) = -0.400 V, pulse amplitude = 70 mV, (ν) scan rate = 50 mV s $^{-1}$, working electrode: hanging mercury drop electrode (HMDE), reference electrode: Ag/AgCl (KCl 3 M).

enhancement of the reduction peak current of Cu(II)–rutin complex was obtained with an accumulation potential of -0.900 V, the best linear relationship between Cu(II)–rutin complex reduction peak current and concentration of rutin was observed with an accumulation potential of -1.000 V. Hence, in subsequent measurements, an accumulation potential of -1.000 V was used.

Fig. 3b shows that the reduction peak current of Cu(II)–rutin complex grows with increasing accumulation time and saturates after 120 s. A similar behavior was observed by Temerk et al. (2006) and Ensafi and Hajian (2006). The best results concerning signal enhancement and format of reduction peak current of Cu(II)–rutin complex was obtained with an accumulation time of 180 s. Thus, a 180 s accumulation time was chosen for further measurements.

3.2.3. Copper(II) concentration

Fig. 4 shows that in the presence of 1.0×10^{-6} M rutin, the reduction peak current of the Cu(II)–rutin complex increases by increasing the copper(II) concentration from 2.0×10^{-7} to 1.6×10^{-6} M until it becomes constant at a concentration that is close to the stoichiometric ration of 1 Cu(II) per 1 rutin. These results show strong coherence with CAdSV data obtained by Temerk et al. (2006). An optimum copper(II) concentration of 1.6×10^{-6} M was selected for further experiments.

3.2.4. Scan rate and pulse amplitude

Fig. 5 shows that the reduction peak current of the Cu(II)–rutin complex increases with increasing scan rate and pulse amplitude, respectively. It was observed that these two parameters do not affect the Cu(II)–rutin complex reduction peak current for scan rate values below 100 mV s $^{-1}$ and for pulse amplitude values above 70 mV, which is agreement with the literature data (Laviron, 1979). For further experiments, a 50 mV s $^{-1}$ scan rate and 70 mV pulse amplitude were applied.

3.3. Interferences

The proposed method is selective for rutin determination in the presence of each of the tested isoflavones (daidzein, daidzin, genistein, genistin, glycitein and glycitin) or phenolic acids (galic, *p*-hydroxybenzoic, vanilic, chlorogenic, caffeic and ferulic acids) in the concentration range from 4.9×10^{-8} to 4.9×10^{-7} M. At a 1:1 concentration ratio, none of these phenolic compounds caused any interference and the reduction peak of the Cu(II)–rutin Complex at -0.152 V remained unchanged. This behavior can be ascribed to the differences of peak potential values and formation constants of the Cu(II)–rutin, Cu(II)–isoflavones and Cu(II)–phenolic acids complexes, as has already been proposed by Ensafi and Hajian (2006). Thus, the selectivity of the proposed method can be compared to those observed by other analytical methods in which rutin was determined in the presence of interferences usually found in pharmaceutical formulations, tea, blood serum and urine.

3.4. Calibration curve and figures of merit

Fig. 6 shows the cathodic adsorptive stripping voltammograms obtained for 1.6×10^{-6} M Cu(II) in 10 mL of phosphate buffer pH 6.0 with different rutin concentrations. Under the optimized conditions, a linear response of Cu(II)–rutin reduction peak current as a function of rutin concentration (I_{pc} (nA) = $10.070 + 1.9 \times 10^8$ [Rutina]) was obtained in the range of 2.0×10^{-7} to 1.4×10^{-6} M, with a correlation coefficient (*R*) of 0.999 (insert Fig. 6). A detection limit (DL) of 7.0×10^{-9} M and a quantification limit (QL) of 2.2×10^{-8} M were obtained by using the relations $3S_b/b$ and $10S_b/b$, respectively, where S_b is the blank standard deviation and *b* the slope of the calibration curve (Miller and Miller, 1993). DL is in the same order of magnitude of those obtained by Ensafi and Hajian (2006) and Temerk et al. (2006) in which rutin was determined in tea, pharmaceuticals, human urine and blood serum by CAdSV. Moreover, DL is 1000 times lower than those obtained by spectrophotometric (Kurzawa, 2010), capillary electrophoretic (Chen et al., 2001) and high performance liquid chromatographic with UV detection (Kurzawa, 2010) methods and 100 to 10 times

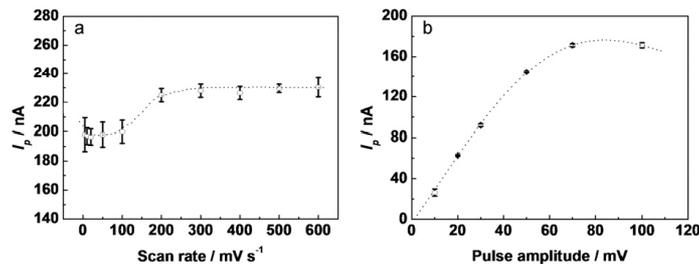


Fig. 5. (a) Effect of the scan rate (ν) on the adsorptive cathodic stripping peak currents of 1.0×10^{-6} M of rutin in the presence of 1.0×10^{-6} M Cu(II) in 10 mL of phosphate buffer pH 6; (b) effect of the pulse amplitude on the adsorptive cathodic stripping peak currents of 1.0×10^{-6} M of rutin in the presence of 2.0×10^{-7} to 1.8×10^{-6} M Cu(II) in 10 mL of phosphate buffer pH 6. Accumulation potential (E_{acc}) = -1.000 V, accumulation time (t_{acc}) = 180 s, initial potential (E_i) = 0.050 V, final potential (E_f) = -0.400 V, pulse amplitude = 10 – 100 mV, ν = 5 – 600 mV s $^{-1}$, working electrode: hanging mercury drop electrode (HMDE), reference electrode: Ag/AgCl (KCl 3 M).

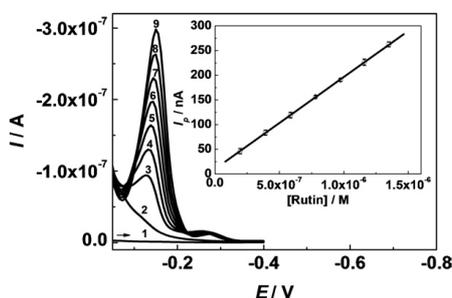


Fig. 6. Cathodic adsorptive stripping voltammograms obtained for 1.6×10^{-6} M Cu(II) (2) in 10 mL of phosphate buffer pH 6 (1) in different rutin concentrations: (3) 2.0×10^{-7} , (4) 3.9×10^{-7} , (5) 5.9×10^{-7} , (6) 7.8×10^{-7} , (7) 9.7×10^{-7} , (8) 1.2×10^{-6} , and (9) 1.4×10^{-6} M. Insert: The calibration curve (correlation coefficient (R) = 0.999; probability (P) $< 1.0 \times 10^{-4}$). Accumulation potential (E_{acc}) = -1.000 V, accumulation time (t_{acc}) = 180 s, initial potential (E_i) = 0.050 V, final potential (E_f) = -0.400 V, pulse amplitude = 70 mV, scan rate = 50 mV s $^{-1}$, working electrode: hanging mercury drop electrode (HMDE), reference electrode: Ag/AgCl (KCl 3 M).

lower than those obtained by other electrochemical methods (Chen et al., 2010; Du et al., 2010; Freitas et al., 2009; Liu et al., 2010; Santos et al., 2007; Song et al., 2010; Sun et al., 2008; Yang et al., 2010; Zeng et al., 2006; Zhan et al., 2010; Zhang and Zheng, 2008). The sensitivity of the proposed method can also be compared to those observed by high performance liquid chromatographic with electrochemical (Danila et al., 2007) and photodiode array (Lu et al., 2006) detections and by other electrochemical (Malagutti et al., 2006; Wang et al., 2010; Wu et al., 2008) methods in which DL values were found to be in the order of 10^{-9} M. Only in two cases is the DL determined in this work higher than those obtained by other methods (Novak et al., 2008; Tyszczyk, 2009). However, these methods, and the ones in which the sensitivities are similar, present some disadvantages, such as high cost, complicated operations, multi-solvent extractions, time-consuming procedures, more specialized technicians and low stability of modified electrodes.

3.5. Analytical applications

3.5.1. Determination of rutin in pharmaceutical formulations

Table 1 presents the results obtained in the determination of rutin in a pharmaceutical sample by using the CAdSV method and Method 952.28 Rutin in Drugs (AOAC International, 1995). According to the t -test ($t_{exp} \leq t_{label}$ ($t_{exp} = 1.223$ and $t_{label} = 2.920$), there are no significant differences between the results obtained by both methods within 95% of confidence level, indicating the practical feasibility of the proposed method. The absence of the matrix effect on this determination was attested by single point standard addition-recovery values that varied from 94 to 103%.

Table 1
Rutin determination in the pharmaceutical formulation.

Rutin ^a (mg mL $^{-1}$)				
Label value	CAdSV	AOAC method	Relative error (%) ^b	Relative error (%) ^c
20	26.370 ± 1.190	25.530 ± 0.060	32	3

Detection limit (DL) = 4.27 ng mL $^{-1}$.

^a Mean values from three independent determinations.

^b CAdSV (cathodic adsorptive stripping voltammetric) versus label value.

^c CAdSV versus AOAC method (The Scientific Association Dedicated to Analytical Excellence) method (AOAC International, 1995).

Table 2
Rutin determination in soybean samples.

Soybean samples	Rutin found ^a (mg g $^{-1}$)	Rutin reported value (mg g $^{-1}$)
P98R62 (seeds)	n.d. ^b	n.r. ^c
BRQ 96-3065 (seeds)	n.d.	n.r.
Dowling (seeds)	n.d.	n.r.
Dowling (leaves)	n.d.	n.r.
IAC 100 (leaves)	0.197 ± 0.038	0.972 ± 0.082 ^d

Detection limit (DL) = 4.27 ng mL $^{-1}$.

^a Mean values from three independent determinations.

^b Not detected.

^c Not reported.

^d Piubelli et al.

3.5.2. Determination of rutin in soybean samples

Table 2 presents the results obtained in the determination of rutin in four soybean cultivars by the CAdSV method. Rutin was not detected in P98R62, BRQ 96-3065 and Dowling soybean seeds. These results were expected and are supported by published data where genistin, daidzin and their aglycones were identified as the main isoflavone compounds in Brazilian soybean seeds (Carrão-Panizzi et al., 2002). Rutin was not detected in the leaves of Dowling soybean sample either. This result was expected and is supported by published data where changes in chemical composition of midgut of *Anticarsia gemmatallis* were observed after the ingestion of Dowling, a soybean genotype resistant to insects which contains 0.0429 mg g $^{-1}$ of genistin (Levy et al., 2010). However, for the IAC 100 soybean cultivar, the result of the analysis was positive for this flavonoid. The mean concentration of rutin in IAC 100 was much lower than the value reported by Piubelli et al. (2005), using HPLC to determine rutin in soybean leaves of the same genotype (IAC-100), produced under greenhouse conditions ($T = 23 \pm 2$ °C, $RH = 78\%$) in the southern region of Brazil (23 °C average local temperature). However, this difference can be due to the higher temperatures of the central-west region of Brazil (27 °C average local temperature, which was reproduced in the greenhouse) during seed development, which was reported by Tsukamoto et al. (1995) as being the major factor in the determining the levels of flavonoids in seeds. This variability on flavonoid concentration was also observed among Brazilian soybean cultivars grown in different locations by Carrão-Panizzi and Kitamura (1995) and Carrão-Panizzi et al. (1999). The absence of the matrix effect on this determination was attested by single point standard addition-recovery values that varied from 94 to 105%.

4. Conclusions

A cathodic adsorptive stripping voltammetric method based on the accumulation of a Cu(II)-rutin complex on the HMDE was successfully applied to the determination of rutin in a pharmaceutical formulation and in soybean leaves and seeds. The analytical results obtained by CAdSV method in the determination of rutin in the pharmaceutical formulation sample are in close agreement with those obtained by AOAC procedure within 95% of confidence level, demonstrating its practical feasibility. The difference between rutin concentration value determined in the IAC-100 soybean sample grown in the central-west of Brazil using the proposed method and the value reported in the literature for the same cultivar, but grown in southern Brazil, suggests that the temperature during seed development is one of the major factors that influence the flavonoid content in soybean samples. The data obtained for soybean cultivars in the present work are important elements for future studies on soybean nutritional properties and their beneficial effects on

human health. The knowledge that IAC-100 cultivar possesses rutin in its leaves has many applications in Integrated Pest Management and breeding programs, contributing to the sustainability of soybean-based agricultural systems. The CAdSV method represents an alternative tool for rutin determination considering that it has the advantages of high speed and sensitivity (lower detection limits), low cost, easy operation and good selectivity when compared to other analytical methods. The main advantage of the proposed method over the existing CAdSV methodologies for determination of rutin is its novel application in the agricultural and nutritional areas, providing data about rutin concentration in soybean cultivars, which are important information for future investigations on using soybean as a source of flavonoids in the human diet. The only disadvantage of the CAdSV method is the impossibility of determining other phenolic compounds found in soybeans, such as the isoflavones. This limitation can be assigned to the inability of glycitin and daidzin to complex with Cu(II) or the formation of different species among glycitein, genistein, genistin and daidzein and Cu(II).

Acknowledgements

The authors wish to express their gratitude to Maria Carolina Blassioli Moraes and Luzia Helena Corrêa Lima for their help in the preparation of soybean samples, to Professor Peter Bakusis for manuscript language revision and to CNPq, CAPES, FAPESP and EMBRAPA for student grants and financial support.

References

- AOAC International, 1995. Official Methods of Analysis. Method 952. 28 Rutin in Drugs. AOAC, Arlington, VA, p. 29.
- Blasco, A.J., Gonzalez, M.C., Escarpa, A., 2004. Electrochemical approach for discriminating and measuring predominant flavonoids and phenolic acids using differential pulse voltammetry: towards an electrochemical index of natural antioxidants. *Analytica Chimica Acta* 511, 71–81.
- Carrão-Panizzi, M.C., Belêia, A.D.P., Kitamura, K., Oliveira, M.C.N., 1999. Effects of genetics and environment on isoflavone content of soybean from different regions of Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 34, 1787–1795.
- Carrão-Panizzi, M.C., Favoni, S.P.G., Kikuchi, A., 2002. Extraction time for soybean isoflavone determination. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 45, 515–518.
- Carrão-Panizzi, M.C., Kitamura, K., 1995. Isoflavone content in Brazilian soybean cultivars. *Breeding Science* 45, 295–300.
- Chen, G., Zhang, J., Ye, J., 2001. Determination of puerarin, daidzein and rutin in *Pueraria lobata* (Wild.) Ohwi by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Journal of Chromatography A* 923, 255–262.
- Chen, X., Wang, Z., Zhang, F., Zhu, L., Li, Y., Xia, Y., 2010. Determination of rutin on the poly(*p*-aminobenzene sulfonic acid) modified glassy carbon electrode. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 58, 475–478.
- Danila, A.M., Kotani, A., Hakamata, H., Kusu, F., 2007. Determination of rutin, catechin, epicatechin, and epicatechin gallate in buckwheat *Fagopyrum esculentum* moench by micro-high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 1139–1143.
- Du, H., Ye, J., Zhang, J., Huang, X., Yu, C., 2010. Graphene nanosheets modified glassy carbon electrode as a highly sensitive and selective voltammetric sensor for rutin. *Electroanalysis* 20, 2399–2406.
- Ensaifi, A.A., Ilajian, R., 2006. Determination of rutin in pharmaceutical compounds and tea using cathodic adsorptive stripping voltammetry. *Electroanalysis* 18, 579–585.
- Esparza, I., Salinas, I., Santamaría, C., García-Min, J.M., Fernández, J.M., 2005. Electrochemical and theoretical complexation studies for Zn and Cu with individual polyphenols. *Analytica Chimica Acta* 543, 267–274.
- Fehr, W.R., Caviness, C.E., 1977. Stages of Soybean Development. Special Report 80. Iowa State University of Science and Technology, Ames.
- Freitas, K.H., Medeiros, R.A., Fatibello-Filho, O., 2009. Voltammetric determination of rutin using a carbon composite electrode modified with copper(II)-resin. *Analytical Letters* 42, 881–897.
- Hasumura, M., Yasuhara, K., Tamura, T., Imai, T., Mitsumori, K., Hirose, M., 2004. Evaluation of the toxicity of enzymatically decomposed rutin with 13-weeks dietary administration to Wistar rats. *Food and Chemical Toxicology* 42, 439–444.
- Hutabarat, L.S., Greenfield, H., Mulholland, M., 2001. Isoflavones and coumestrol in soybeans and soybean products from Australia and Indonesia. *Journal of Food Composition and Analysis* 14, 43–58.
- Kreft, S., Strukelj, B., Gaberscik, A., Kreft, I., 2002. Rutin in buckwheat herbs grow at different UV-B radiation levels: comparison of two UV spectrophotometric and an HPLC method. *The Journal of Experimental Botany* 53, 1801–1802.
- Kumar, V., Rani, A., Solanki, S., Hussain, S.M., 2006. Influence of growing environment on the biochemical composition and physical characteristics of soybean seed. *Journal of Food Composition and Analysis* 19, 188–195.
- Kurzawa, M., 2010. Determination of quercetin and rutin in selected herbs and pharmaceutical preparations. *Analytical Letters* 43, 993–1002.
- Laviron, E., 1979. General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 101, 19–28.
- Le Nest, G., Caille, O., Woudstra, M., Roche, S., Burlat, B., Guerlesquin, F., Lexa, D., 2004. Zn-polyphenol chelation: complexes with quercetin, (+)-catechin, and derivatives. I. Optical and NMR studies. *Inorganica Chimica Acta* 357, 775–784.
- Le Nest, G., Caille, O., Woudstra, M., Roche, S., Burlat, B., Belle, V., Guigliarelli, B., Lexa, D., 2004. Zn-polyphenol chelation: complexes with quercetin, (+)-catechin, and derivatives. II. Electrochemical and EPR studies. *Inorganica Chimica Acta* 357, 2027–2037.
- Levy, S.M., Cruz, N.A., Forghieri, L.R., Silva, M.R., Gallo, A.R.L., Silva, L.X., Hoffmann-Campo, C.B., Moscardi, F., Falleiros, A.M.F., 2010. Effects of the flavonoids rutin and genistin in the midgut of *Anticarsia gemmatilis* (Hübner 1818) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae: histochemical study. In: 1st Latin American Meeting of Chemical Ecology. Latin American Association of Chemical Ecology, Colonia del Sacramento, Uruguay.
- Liu, X., Li, L., Zhao, X., Lu, X., 2010. Electrochemical behavior of rutin on a multi-walled carbon nanotube and ionic liquid composite film modified electrode. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 81, 344–349.
- Lu, Y., Liu, Z., Wang, Z., Wei, D.J., 2006. Quality evaluation of *Platycladus orientalis* (L.) franco through simultaneous determination of four bioactive flavonoids by high-performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41, 1186–1190.
- Malagutti, A.R., Zuin, V.G., Cavalheiro, E.T.G., Mazo, L.H., 2006. Determination of rutin in green tea infusions using square-wave voltammetry with a rigid carbon-polyurethane composite electrode. *Electroanalysis* 18, 1028–1034.
- Miller, J.C., Miller, J.N., 1993. *Statistic for Analytical Chemistry*. Ellis Horwood PTR, Prentice Hall, New York.
- Novak, I., Janeiro, P., Seruga, M., Oliveira-Brett, A.M., 2008. Ultrasound extracted flavonoids from four varieties of Portuguese red grape skins determined by reverse-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Analytica Chimica Acta* 630, 107–115.
- Obendorf, D., Reichart, E., 1995. Determination of hesperidin by cathodic stripping voltammetry in orange juice and helopyrin, a phytopharmaceutical preparation. *Electroanalysis* 11, 1075–1081.
- Park, Y.K., Aguiar, C.L., Alencar, S.M., Mascarenhas, H.A.A., Scamparini, A.R.P., 2001. Avaliação do teor de isoflavonas em soja brasileira. *Ciencia y Tecnología Alimentaria* 3, 156–160.
- Piubelli, G.C., Hoffman-Campo, C.B., Moscardi, F., Miyakubo, S.H., Oliveira, M.C.N., 2005. Are chemical compounds important for soybean resistance to *Anticarsia gemmatilis*. *Journal of Chemical Ecology* 31, 1509–1525.
- Reichart, E., Obendorf, D., 1998. Determination of naringin in grapefruit juice by cathodic stripping differential pulse voltammetry at the hanging mercury drop electrode. *Analytica Chimica Acta* 360, 179–187.
- Ribeiro, M.L.L., Mandarino, J.M.G., Carrão-Panizzi, M.C., de Oliveira, M.C.N., Campo, C.B.H., Nepomuceno, A.L., Ida, E.L., 2007. Isoflavone content and β -glucosidase activity in soybean cultivars of different maturity groups. *Journal of Food Composition and Analysis* 20, 19–24.
- Santos, D.P., Bergamini, M.F., Santos, V.A.F.F.M., Furlan, M., Zanon, M.V.B., 2007. Preconcentration of rutin at a poly glutamic acid modified electrode and its determination by square wave voltammetry. *Analytical Letters* 40, 3430–3442.
- Song, J., Yang, J., Zeng, J., Tan, J., 2010. Acetylene black nanoparticle-modified electrode as an electrochemical sensor for rapid determination of rutin. *Microchimica Acta* 171, 283–287.
- Sun, W., Yang, M., Li, Y., Jiang, Q., Liu, S., Jiao, K., 2008. Electrochemical behavior and determination of rutin on a pyridinium-based ionic liquid modified carbon paste electrode. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 48, 1326–1331.
- Temerk, Y.M., Ibrahim, I.S.M., Schuhmann, W., 2006. Cathodic adsorptive stripping voltammetric determination of the antitumor drug rutin in pharmaceuticals, human urine, and blood serum. *Microchimica Acta* 153, 7–13.
- Tsukamoto, C., Shimada, S., Igita, K., Kudou, S., Kokubun, M., Okubo, K., Kitamura, K., 1995. Factors affecting isoflavone content in soybean seeds: changes in isoflavones, saponins, and composition of fatty acids at different temperatures during seed development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43, 1184–1192.
- Tyszczyk, K., 2009. Sensitive voltammetric determination of rutin at an in situ plated lead film electrode. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 49, 558–561.
- Umphress, S.T., Murphy, S.P., Franke, A.A., Custer, L.J., Blitz, C.L., 2005. Isoflavone content of foods with soy additives. *Journal of Food Composition and Analysis* 18, 533–550.
- Ündeğer, Ü., Aydın, S., Başaran, A.A., Başaran, N., 2004. The modulating effects of quercetin and rutin on the mitomycin C induced DNA damage. *Toxicology Letters* 151, 143–149.

- Wang, Y., Xiong, H., Zhang, X., Wang, S., 2010. Detection of rutin at DNA modified carbon paste electrode based on a mixture of ionic liquid and paraffin oil as a binder. *Microchimica Acta* 170, 27–32.
- Wu, S.H., Sun, J.J., Zhang, D.F., Lin, Z.B., Nie, F.H., Qiu, H.Y., Chen, G.N., 2008. Nanomolar detection of rutin based on adsorptive stripping analysis at single-sided heated graphite cylindrical electrodes with direct current heating. *Electrochimica Acta* 53, 6596–6601.
- Yang, S., Qu, L., Li, G., Yang, R., Liu, C., 2010. Gold nanoparticles/ethylenediamine/carbon nanotube modified glassy carbon electrode as the voltammetric sensor for selective determination of rutin in the presence of ascorbic acid. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 645, 115–122.
- Zeng, B., Wei, S., Xiao, F., Zhao, F., 2006. Voltammetric behavior and determination of rutin at a single-walled carbon nanotubes modified gold electrode. *Sensors and Actuators B* 115, 240–246.
- Zhan, T., Sun, X., Wang, X., Sun, W., Hou, W., 2010. Application of ionic liquid modified carbon ceramic electrode for the sensitive voltammetric detection of rutin. *Talanta* 82, 1853–1857.
- Zhang, Y., Zheng, J., 2008. Sensitive voltammetric determination of rutin at an ionic liquid modified carbon paste electrode. *Talanta* 77, 325–330.
- Zoullis, E.N., Elstahiuo, C.E., 1996. Preconcentration at a carbon-paste electrode and determination by adsorptive-stripping voltammetry of rutin and other flavonoids. *Analytica Chimica Acta* 320, 255–261.

INTRODUÇÃO

A soja é a oleaginosa mais produzida e consumida no mundo. Uma das conseqüências das grandes áreas cultivadas com soja está relacionada ao aumento de pragas. Nos últimos anos, o desenvolvimento de cultivares de soja resistentes tem sido uma ferramenta alternativa para o controle de pragas em substituição aos inseticidas químicos. Um dos principais responsáveis pela resistência da soja a insetos-praga são os metabólitos secundários, principalmente as isoflavonas [1, 2]. Atualmente os métodos de cromatografia líquida e de espectrometria de massas têm sido utilizados na determinação de isoflavonas, porém, esses métodos são de alto custo, exigem processos laboriosos de preparação de amostra e muitas vezes não preservam a forma química de como esses compostos são encontrados na planta. Os métodos eletroquímicos superam essas desvantagens, pois são métodos não destrutivos, de baixo custo, de alta sensibilidade; podendo ser levados para o campo. A identificação e quantificação destes metabólitos, na soja, geram importante informação para os melhoristas na escolha das cultivares para o melhoramento, tanto clássico como o transgênico. Portanto, o objetivo desse trabalho foi desenvolver um método para a determinação de isoflavonas totais, baseado na oxidação de uma das isoflavonas mais abundantes da soja (Genisteína), empregando a voltametria de pulso diferencial (DPV). Antes do desenvolvimento do método, o estudo do processo de oxidação/redução da genisteína no eletrodo de carbono vítreo (GC) foi realizado utilizando a voltametria cíclica (CV). O método desenvolvido foi aplicado na determinação de isoflavonas totais em formulação farmacêutica a base de extrato de soja. Esta formulação é utilizada na redução dos sintomas decorrentes do climatério e servirá de modelo para estudos posteriores de grãos e folhas de soja quanto à concentração de isoflavonas totais.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

As medidas de CV e DPV foram realizadas em triplicata, utilizando-se o analisador voltamétrico 797 VA Computrace (Metrohm) e uma célula eletroquímica composta pelos eletrodos: GC ($\Phi = 2$ mm) como eletrodo de trabalho, Ag/AgCl (KCl 3 mol L⁻¹) como eletrodo de referência e platina como eletrodo auxiliar. A solução padrão de genisteína (LC Laboratories) 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹, preparada em etanol (Sigma), foi utilizada na determinação de isoflavonas totais. Dez comprimidos da formulação farmacêutica foram pesados e previamente pulverizados em graal. A extração das isoflavonas a partir do pó obtido dos comprimidos (0,10 g) foi realizada em triplicata, com 4 mL de etanol 70%, utilizando ultrassom por 20 minutos. Os extratos resultantes foram centrifugados e transferidos para balão volumétrico, onde o volume foi completado com etanol para 10 mL. A determinação de isoflavonas totais, em formulação farmacêutica a base de extrato de soja, foi realizada por meio do método da adição padrão sob condições e parâmetros experimentais otimizados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No voltamograma cíclico, obtido para a genisteína 5,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ em tampão fosfato pH 6,0, observou-se um pico irreversível em 0,589 V, correspondente a oxidação do grupo 4'-hidróxi do anel B. O mesmo sinal foi o observado para a genisteína por Wu e colaboradores [3]. No estudo do processo de oxidação da genisteína obteve-se uma relação linear entre a corrente de pico e a velocidade de varredura (v) no intervalo 10-200 mV s⁻¹, ($I_{pa} = -4,011 + 0,428v$, $r = 0,995$), indicando um processo controlado por adsorção.

O estudo para repetibilidade de resposta do eletrodo de GC para a genisteína apresentou RSD menor que 1,0% (n=10). A curva analítica (Figura 1), obtida pelo método de adição de padrão sob condições e parâmetros otimizados (Tampão fosfato pH 6,0; amplitude de pulso = 50 mV e $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$), apresentou a equação $I_{pa}(\text{nA}) = -8,388 + 5,7 \times 10^7 [\text{Genisteína}]$ ($r = 0,998$) e linearidade entre $1,0 \times 10^{-6}$ a $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, com limite de detecção $1,2 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ e limite de quantificação $3,9 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, calculados a partir de: $LD = 3Sb/b$; $LQ = 10Sb/b$, onde Sb é o desvio padrão das medidas do branco e b é a inclinação da curva analítica.

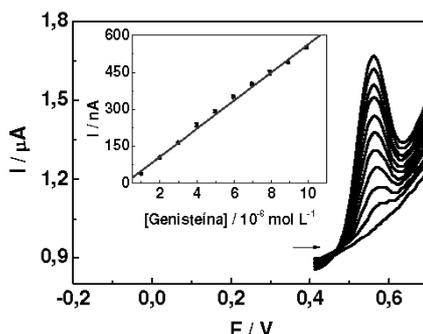


Figura 1: Voltamogramas de pulso diferencial em 10 mL de tampão fosfato pH 6,0 com adições sucessivas de 10 μL de genisteína $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. $E_i = 0,200 \text{ V}$; $E_f = 1,000 \text{ V}$, amplitude de pulso = 50 mV, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, Eletrodo de trabalho: GC, Eletrodo de referência: Ag/AgCl (3 mol L^{-1}).

O método desenvolvido foi utilizado na determinação de isoflavonas totais em formulação farmacêutica a base de extrato de soja, e a concentração média foi $32,20 \pm 0,77 \text{ mg comprimido}^{-1}$, com erro relativo de 7,33% em relação ao indicado no rótulo ($30 \text{ mg comprimido}^{-1}$). A recuperação de genisteína adicionada variou de 94 a 108%, indicando ausência de efeito de matriz.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos mostram a viabilidade de aplicação do método eletroanalítico desenvolvido na determinação de isoflavonas totais, utilizando o eletrodo de GC e a voltametria de pulso diferencial, pois apresentou baixos limites de detecção e quantificação, boa repetibilidade e sensibilidade, possibilitando também a sua aplicação no estudo de cultivares de soja da Embrapa quanto à identificação e quantificação de isoflavonas totais.

AGRADECIMENTOS

CENARGEN, UnB, CNPDIA, UFU, CNPq e CAPES.

REFERÊNCIAS

- [1] PIUBELI G. C., HOFFMANN-CAMPO C.B., MOSCARDI F., MIYAKUBO S.H. and OLIVEIRA M.C.N., "Are Chemical Compounds Important for Soybean Resistance to *Anticarsia gemmatalis*?", *J. Chem. Ecol.* 31 (7):1509-1525, 2005.
- [2] ZHU J.W. and PARK K.C., "Methyl Salicylate, a Soybean Aphid-Induced Plant Volatile Attractive to the Predator *Coccinella septempunctata*", *J. Chem. Ecol.* 31 (8): 1733-1746, 2005.
- [5] WU L., LAUGHLIN JR J. B., and DEWALD H. D., "Voltammetry and LCEC of Isoflavones" *Electroanalysis* 9 (10): 796-799, 1997.