



**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**



DANIELA KÁRIN FOGLIATTO

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA
DETERMINAÇÃO DE DAIDZEÍNA E GENISTEÍNA EM
PRODUTOS DE SOJA POR VOLTAMETRIA DE ONDA
QUADRADA**

**CAMPO GRANDE - MS
2010**

DANIELA KÁRIN FOGLIATTO

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA
DETERMINAÇÃO DE DAIDZEÍNA E GENISTEÍNA EM
PRODUTOS DE SOJA POR VOLTAMETRIA DE ONDA
QUADRADA**

Projeto realizado no Departamento de Química da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química (área Físico-Química).

Orientador: Profº. Dr. Valdir Souza Ferreira

**CAMPO GRANDE - MS
2010**

*Dedico especialmente este trabalho aos meus alicerces:
À Deus, pela sua infinita misericórdia e inúmeras bênçãos
em minha vida;
Ao meu pai, Anacleto (in memoriam),
que ainda vive em mim e me fortalece com sua presença;
E a minha mãe, Dirce,
que sempre sonhou e se dedicou à minha formação...
pelo exemplo de mulher, mãe e profissional, minha eterna
gratidão!*

Agradecimentos

- Ao Professor Doutor Valdir Souza Ferreira, pela sábia orientação. Como ele sempre me diz: “Eu confio em você...”. Talvez professor você não saiba que por sua confiança eu ultrapassei limites, principalmente nesta etapa final do mestrado. Obrigada pela liberdade de buscar meu crescimento, por despertar minha autoconfiança e me tornar capaz.
 - À Dr^a Giovanna, do departamento de bioquímica, que se dispôs tão atenciosamente a contribuir com minha pesquisa, obrigada!
 - Aos professores Giuseppe e Janete, por serem exemplos de profissionais e se sensibilizarem com os que o procuram, dando sempre o auxílio. Sou muito grata pelos conselhos e todo apoio quando tanto necessitei.
 - Aos professores Gilberto e Neli, que foram muito solícitos comigo.
 - A todos os professores que permanecem com carinho em minhas lembranças, todos responsáveis por meu aprimoramento profissional e crescimento pessoal.
 - À Tatianne, por ser extremamente prestativa e digna de minha admiração, pelas incontáveis vezes que me ouviu e me ensinou, pelos materiais que disponibilizou, pela amizade. Ah se não fosse a Tati...
 - Ao Antonio Marcos, pela enorme paciência, por nunca ter me dito não mesmo ocupado, pela contribuição neste trabalho, pelo respeito, amizade e convivência, obrigada!
 - À Adriana, Michele, Giselly, Simone, Crislayne e Jacqueline, pelos momentos de descontração, conversas, conselhos e companhia no laboratório.
 - Ao Fabinho, por partilhar das mesmas experiências e me ajudar muitas vezes com seu aprendizado, pelos artigos e materiais cedidos.
 - Ao Hebert, que tantas vezes me ensinou com paciência a mexer em equipamentos, aliás, sempre está ajudando, solucionando problemas no laboratório que nem caberiam a ele, com certeza todos são muito gratos a você.
 - Ao Magno, pela ajuda e disponibilidade durante a preparação do artigo.
 - Aos meus colegas de mestrado e do laboratório, Bruno, Fábio, Robson, Ricardo, Edgard, Andréia, Franklin, Joseane, Márcio, Dante, Gemima, pelo apoio, convivência, exemplo...
-

-
- Aos meus eternos amigos de graduação que compartilharam tantos momentos de minha vida, serão guardados com muito carinho e nunca esquecidos.
 - Ao Cláudio Rodrigo, que mesmo estando distante ainda me presenteia com sua amizade e conselhos, por ser meu exemplo de perseverança.
 - A minha madrinha, Enedina, uma mulher mais que admirável em sua simplicidade e sabedoria. Você me faz enxergar que títulos não são nada perto da verdadeira felicidade que se esconde na humildade, no desprendimento, no amor ao próximo, enfim nos pequenos e valiosos detalhes da vida.
 - A Nilma, pelo carinho, amizade, por chorar comigo quando pensei não conseguir mais, por orar por mim!
 - À minha mãe, que a vida toda me ensinou as coisas verdadeiras. Seus ensinamentos se deram por seu exemplo diário de amor divino para com nós, seus filhos. Inspiração de força, de perseverança, de fé, de amor, queira eu me tornar um dia como minha mãe. Agradecimentos me faltam neste momento!
 - Aos meus irmãos, Katia e Marcos, pelo carinho e preocupação, pelas discussões que se frutificaram em crescimento, pela força e eterna amizade.
 - Ao Raphael, pelo enorme carinho dedicado, pelas doces palavras de confiança, incentivo e fé, pelo amor e felicidade que me faz sentir a cada dia.
 - Ao CNPq e Fundect, pela bolsa de estudo e auxílios financeiros concedidos.
 - A todos que contribuíram para realização desse trabalho, **MUITO OBRIGADA!**
-

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	<i>vii</i>
LISTA DE TABELAS.....	<i>xvii</i>
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	<i>xix</i>
RESUMO.....	<i>xxi</i>
ABSTRACT.....	<i>xxii</i>
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Soja.....	03
1.2. Isoflavonas.....	04
1.2.1. Absorção e metabolismo.....	07
1.2.2. Mecanismo de ação.....	08
1.2.3. Efeitos adversos.....	09
1.3. Métodos de extração.....	10
1.3.1. Extração simples.....	11
1.3.2. Extração em fase sólida (EFS).....	13
1.3.3. Hidrólise.....	14
1.4. Análise de isoflavonas.....	16
1.4.1. Métodos cromatográficos.....	17
1.4.2. Métodos eletroquímicos.....	18
1.5. Surfactantes.....	19
1.5.1. Classificação dos surfactantes.....	20
1.5.2. Uso de surfactantes em estudos eletroquímicos.....	21
1.6. OBJETIVOS.....	22
1.6.1. Geral.....	22
1.6.2. Específicos.....	22
2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	23
2.1. Especificações gerais dos reagentes e soluções.....	23
2.2. Especificações gerais dos equipamentos.....	24
2.3. Amostras de produtos de soja.....	25
2.3.1. Extração simples.....	26
2.3.2. Extração em fase sólida.....	26

2.4. Medidas eletroquímicas.....	27
2.5. Análise por CLAE.....	27
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
3.1. Estudo do comportamento voltamétrico da genisteína e da daidzeína por VOQ.....	29
3.1.1. Influência do pH do eletrólito suporte	29
3.1.1.1. Efeito do pH na redução da genisteína em presença de diferentes tipos de eletrólitos suporte	29
3.1.1.2. Influência de diferentes tipos de surfactantes na redução da genisteína	38
3.1.1.3. Efeito do pH na redução da daidzeína em presença de diferentes tipos de eletrólitos suporte.....	42
3.1.1.4. Influência de diferentes tipos de surfactantes na redução da daidzeína.....	49
3.2. Metodologia para determinação simultânea de daidzeína e genisteína por VOQ.....	53
3.2.1. Otimização do tipo de eletrólito suporte e surfactante.....	53
3.2.2. Influência dos parâmetros instrumentais.....	58
3.2.2.1. Estudo do tempo de deposição (t_{ac})	58
3.2.2.2. Estudo do potencial de deposição (E_{ac}).....	59
3.2.2.3. Estudo da amplitude dos pulsos (E_{sw})	60
3.2.2.4. Estudo da frequência de aplicação dos pulsos (f).....	62
3.2.2.5. Influência do incremento de varredura (ΔE_s).....	64
3.2.3. Parâmetros instrumentais otimizados.....	66
3.2.4. Validação da metodologia por VOQ.....	67
3.2.4.1. Curvas analíticas para daidzeína e genisteína em tampão fosfato:etanol (8:2, v/v).....	68
3.2.4.2. Curvas analíticas para daidzeína e genisteína em tampão fosfato:metanol (8:2, v/v).....	70
3.3. Perfil voltamétrico das isoflavonas glicosiladas, daidzina e genistina.....	73
3.4. Aplicação da metodologia eletroanalítica na determinação das isoflavonas agliconas em farinha de soja.....	76
3.4.1. Determinação e recuperação de genisteína em farinha de soja por	

extração simples.....	76
3.4.2. Determinação e recuperação de genisteína em farinha de soja por extração em fase sólida (EFS).....	80
3.5. Aplicação da metodologia eletroanalítica na determinação das isoflavonas agliconas em medicamentos fitoterápicos.....	84
3.5.1. Determinação e recuperação de genisteína no medicamento fitoterápico A por extração simples e por extração em fase sólida.....	84
3.5.2. Determinação e recuperação de daidzeína no medicamento fitoterápico B por extração simples e por extração em fase sólida.....	89
3.6. CLAE como metodologia comparativa.....	93
3.6.1. Curvas analíticas para daidzeína e genisteína.....	94
3.6.2. Análise de daidzeína e genisteína em produtos de soja por CLAE.....	95
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	100
5. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	102
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103
7. APÊNDICE.....	112
7.1. Cromatogramas dos produtos de soja analisados.....	112

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Biossíntese dos flavonóides (DI CARLO <i>et al.</i> , 1999).....	05
Figura 2: Estrutura planar básica dos flavonóides (núcleo flavano).....	05
Figura 3: Isoflavonas na forma aglicona.....	06
Figura 4: Isoflavonas nas formas glicosiladas.....	07
Figura 5: Transformações metabólicas ocorridas com isoflavonas em humanos e animais domésticos (SETCHELL & CASSIDY, 1999).....	08
Figura 6: Esquema de hidrólises: básica, ácida e enzimática em derivados de isoflavonas (DELMONTE <i>et al.</i> , 2006).....	11
Figura 7: Estrutura da 4',7-dimetoxi-3'-isoflavona sulfônica de sódio (DISS).....	19
Figura 8: Estruturas de surfactantes: (a) monômeros, (b) micela esférica, (c) micela cilíndrica, (d) micela esférica reversa, (e) micela cilíndrica reversa.....	20
Figura 9: Sistema <i>manifold</i> acoplado com bomba à vácuo.....	24
Figura 10: Potenciostato/galvanostato μ Autolab TYPE II (ECO CHEMIE BV) acoplado a um sistema de multi eletrodos Metrohm 663 VA Stand.....	25
Figura 11: Voltamogramas de redução da daidzeína (Pico I) e genisteína (Pico II), em tampão fosfato:metanol (8:2, v/v), $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ – pH 7,5, na presença de $1,66.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de surfactante BrCTA, por diferentes técnicas voltamétricas. PPD: solução de daidzeína e genisteína na concentração de $1,0.10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$. Parâmetros: $t_g = 0,5 \text{ s}$; tempo de modulação = $0,05 \text{ s}$; $v = 5 \text{ mV.s}^{-1}$; $a = 30 \text{ mV}$. VPD: solução de daidzeína e genisteína na concentração de $1,0.10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$. Parâmetros: intervalo de tempo = $0,4 \text{ s}$; tempo de modulação = $0,05 \text{ s}$, $v = 5 \text{ mV.s}^{-1}$; $E_{sw} = 30 \text{ mV}$. VOQ: solução de daidzeína e genisteína na concentração de $1,0.10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$. Parâmetros: $t_{ac} = 50 \text{ s}$; $E_{ac} = 0 \text{ V}$; $\Delta E_s = 6 \text{ mV}$; $E_{sw} = 30 \text{ mV}$; $f = 100 \text{ Hz}$	28

- Figura 12:** Voltamogramas de onda quadrada de redução da genisteína no intervalo de pH de 2,5 a 11,0, onde: (a) Branco – tampão BR:etanol (8:2, v/v), 0,04 mol.L⁻¹; (b) solução de genisteína, 1,9.10⁻⁵ mol.L⁻¹; (c) adição de 1,9.10⁻⁴ mol.L⁻¹ de surfactante catiônico BrCTA..... 32
- Figura 13:** (A) Variação do E_p de redução de genisteína em função do pH do meio. (B) Variação da I_p de redução de genisteína em função do pH do meio. Eletrólito suporte: tampão BR:etanol (8:2, v/v) - 0,04 mol.L⁻¹, na presença de 1,9.10⁻⁴ mol.L⁻¹ de surfactante catiônico BrCTA..... 33
- Figura 14:** Esquema de desprotonação da genisteína (ZIELONKA *et al.*, 2003)..... 34
- Figura 15:** Mecanismo de redução da genisteína sobre a superfície eletródica (Adaptado de ZHANG *et al.*, 2001)..... 36
- Figura 16:** Variação de I_p para a redução de uma solução de genisteína (1,9.10⁻⁵ mol.L⁻¹) em função do pH do meio, na presença de 1,9.10⁻⁴ mol.L⁻¹ de surfactante catiônico BrCTA. (—■—) Tampão BR:etanol (8:2, v/v), pH de 2,5 a 11,0. (—○—) Tampão acetato:etanol (8:2, v/v) – pH 3,5 a 5,0; tampão fosfato:etanol (8:2, v/v) – pH 5,5 a 8,0; tampão borato:etanol (8:2, v/v) – pH 8,5 a 10,0. (—▲—) Tampão fosfato:metanol (8:2, v/v) – pH 6,0 a 8,0. Todos os eletrólitos suporte na concentração de 0,04 mol.L⁻¹..... 37
- Figura 17:** Voltamogramas de onda quadrada de redução da genisteína (1,9.10⁻⁵ mol.L⁻¹), na presença de 1,9.10⁻⁴ mol.L⁻¹ de surfactante BrCTA, para diferentes eletrólitos suporte em pH 7,5, onde: (a) Tampão BR:etanol (8:2, v/v), 0,04 mol.L⁻¹; (b) Tampão fosfato:etanol (8:2, v/v), 0,04 mol.L⁻¹; (c) Tampão fosfato:metanol (8:2, v/v), 0,04 mol.L⁻¹..... 37
- Figura 18:** Voltamogramas de onda quadrada de redução da genisteína no intervalo de pH de 3,0 a 10,0, onde: (a) Branco – tampão BR:etanol (8:2, v/v), 0,04 mol.L⁻¹; (b) solução de genisteína 1,9.10⁻⁵ mol.L⁻¹; (c) adição de 4,1.10⁻⁴ mol.L⁻¹ de surfactante aniônico DSS..... 39
- Figura 19:** Voltamogramas de onda quadrada de redução da genisteína no intervalo de pH de 3,0 a 10,0, onde: (a) Branco – tampão BR:etanol 0,04 mol.L⁻¹ (8:2, v/v); (b) solução de genisteína 1,9.10⁻⁵ mol.L⁻¹; (c) adição de 2,3.10⁻³ mol.L⁻¹

de surfactante neutro Triton X-100..... 40

Figura 20: Variação de corrente de pico de redução de uma solução de genisteína ($1,9 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) em função do pH do meio. (—■—) Na presença de $1,9 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de surfactante catiônico BrCTA. (—○—) Na presença de $4,1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de surfactante aniônico DSS. Eletrólito suporte: tampão BR:etanol (8:2, v/v), $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ 41

Figura 21: Voltamogramas de onda quadrada de redução da daidzeína no intervalo de pH de 2,5 a 11,0, onde: (a) Branco – tampão BR:etanol (8:2, v/v), $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$; (b) solução de daidzeína, $1,8 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$; (c) adição de $1,9 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de surfactante catiônico BrCTA..... 44

Figura 22: (A) Variação da E_p de redução de daidzeína ($1,8 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) em função do pH do meio. (B) Variação do I_p de redução de daidzeína ($1,8 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) em função do pH do meio. Eletrólito suporte: tampão BR:etanol (8:2, v/v) – $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$, com ou sem a adição de $1,9 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de surfactante BrCTA..... 45

Figura 23: Esquema de desprotonação da daidzeína (LIANG *et al.*, 2008; GAO *et al.*, 2001)..... 46

Figura 24: Mecanismo de redução da daidzeína sobre a superfície eletródica (Adaptado de DONG *et al.*, 2001; HU & LI, 1995)..... 47

Figura 25: Variação de I_p para a redução de uma solução de daidzeína ($1,8 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) em função do pH do meio, na presença de $1,9 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de surfactante catiônico BrCTA. (—■—) Tampão BR:etanol (8:2, v/v), pH de 2,5 a 11,0. (—○—) Tampão acetato:etanol (8:2, v/v) – pH 3,5 a 5,0; tampão fosfato:etanol (8:2, v/v) – pH 5,5 a 8,0; tampão borato:etanol (8:2, v/v) – pH 8,5 a 10,0. (—▲—) Tampão fosfato:metanol (8:2, v/v) – pH 6,0 a 8,0. Todos os eletrólitos suporte na concentração de $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ 48

Figura 26: Voltamogramas de onda quadrada de redução da daidzeína ($1,8 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$), na presença de $1,9 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de surfactante BrCTA, para diferentes eletrólitos suporte em pH 7,5, onde: (a) Tampão BR:etanol (8:2, v/v), $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$; (b) Tampão fosfato:etanol (8:2, v/v), $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$; (c) Tampão fosfato:metanol

(8:2, v/v), 0,04 mol.L⁻¹ 49

Figura 27: Voltamogramas de onda quadrada de redução da daidzeína no intervalo de pH de 3,0 a 10,0, onde: (a) Branco – tampão BR:etanol (8:2, v/v), 0,04 mol.L⁻¹; (b) solução de daidzeína, 2,0.10⁻⁵ mol.L⁻¹; (c) adição de 4,1.10⁻⁴ mol.L⁻¹ de surfactante aniônico DSS..... 50

Figura 28: Voltamogramas de onda quadrada de redução da daidzeína no intervalo de pH de 3,0 a 10,0, onde: (a) Branco – tampão BR:etanol 0,04 mol.L⁻¹ (8:2, v/v); (b) solução de daidzeína, 2,0.10⁻⁵ mol.L⁻¹; (c) adição de 2,3.10⁻³ mol.L⁻¹ de surfactante neutro Triton X-100..... 52

Figura 29: Variação de corrente de pico de redução de uma solução de daidzeína (2,0.10⁻⁵ mol.L⁻¹) em função do pH do meio. (—■—) Na presença de 1,9.10⁻⁴ mol.L⁻¹ de surfactante catiônico BrCTA. (—○—) Na presença de 4,1.10⁻⁴ mol.L⁻¹ de surfactante aniônico DSS. Eletrólito suporte: tampão BR:etanol (8:2, v/v), 0,04 mol.L⁻¹ 53

Figura 30: Variação de E_p de redução de uma solução de daidzeína e genisteína (≈ 9,7.10⁻⁶ mol.L⁻¹) em função do pH do meio. (A) Na presença de 1,9.10⁻⁴ mol.L⁻¹ de surfactante catiônico BrCTA. (B) Na presença de 4,1.10⁻⁴ mol.L⁻¹ de surfactante aniônico DSS. Eletrólito suporte: tampão BR:etanol (8:2, v/v), 0,04 mol.L⁻¹..... 54

Figura 31: (A) Variação de E_p em função da concentração do surfactante BrCTA (5,59.10⁻⁵ a 3,75.10⁻⁴ mol.L⁻¹) para uma solução de daidzeína e genisteína (≈ 2,6.10⁻⁶ mol.L⁻¹). (B) Variação de I_p em função da concentração do surfactante BrCTA (5,59.10⁻⁵ a 3,75.10⁻⁴ mol.L⁻¹) para uma solução de daidzeína e genisteína (≈ 2,6.10⁻⁶ mol.L⁻¹). Eletrólito suporte: tampão fosfato:etanol (8:2, v/v), pH 7,5 - 0,04 mol.L⁻¹ 55

Figura 32: (A) Variação de E_p em função da concentração do surfactante BrCTA (5,56.10⁻⁵ a 4,39.10⁻⁴ mol.L⁻¹) para uma solução de daidzeína e genisteína (≈ 5,2.10⁻⁷ mol.L⁻¹). (B) Variação de I_p em função da concentração do surfactante BrCTA (5,56.10⁻⁵ a 4,39.10⁻⁴ mol.L⁻¹) para uma solução de daidzeína e genisteína (≈ 5,2.10⁻⁷ mol.L⁻¹). Eletrólito suporte: tampão fosfato:metanol (8:2, v/v), pH 7,5 - 0,04 mol.L⁻¹ 56

Figura 33: Voltamogramas de onda quadrada de redução da daidzeína e genisteína em diferentes concentrações de BrCTA. **(A)** (a) Tampão fosfato:etanol (8:2, v/v), pH 7,5 - $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ + solução de daidzeína e genisteína a $2,6 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$. **(b-f)** Adições do surfactante BrCTA: **(b)** $5,59 \cdot 10^{-5}$; **(c)** $1,12 \cdot 10^{-4}$; **(d)** $1,53 \cdot 10^{-4}$; **(e)** $2,04 \cdot 10^{-4}$; **(f)** $3,05 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$. **(B)** (a) Tampão fosfato:metanol (8:2, v/v), pH 7,5 - $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ + solução de daidzeína e genisteína a $5,2 \cdot 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$. **(b-f)** Adições do surfactante BrCTA: **(b)** $5,56 \cdot 10^{-5}$; **(c)** $1,11 \cdot 10^{-4}$; **(d)** $1,66 \cdot 10^{-4}$; **(e)** $2,21 \cdot 10^{-4}$; **(f)** $2,76 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ 56

Figura 34: Voltamogramas de onda quadrada de redução da daidzeína e genisteína ($\approx 9,7 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$), na presença de $2,21 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de surfactante BrCTA, para diferentes eletrólitos suporte em pH 7,5, onde: **(a)** Tampão BR:etanol (8:2, v/v), $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$; **(b)** Tampão fosfato:etanol (8:2, v/v), $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$; **(c)** Tampão fosfato:metanol (8:2, v/v), $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ 57

Figura 35: Efeito do tempo de deposição sobre I_p de redução da genisteína e daidzeína ($\approx 2,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$). **(A)** Tampão fosfato:etanol (8:2, v/v), pH 7,5 - $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$, na presença de $2,04 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de surfactante BrCTA. **(B)** Tampão fosfato:metanol (8:2, v/v), pH 7,5 - $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$, na presença de $2,21 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de surfactante BrCTA. Parâmetros: E_{sw} : 20 mV; f : 120 Hz; E_{ac} : 0 V; ΔE_s : 6 mV..... 58

Figura 36: Efeito do potencial de deposição sobre I_p de redução da genisteína e daidzeína ($\approx 2,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$). **(A)** Tampão fosfato:etanol (8:2, v/v), pH 7,5 - $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$, na presença de $2,04 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de surfactante BrCTA. Parâmetros: E_{sw} : 20 mV; f : 120 Hz; t_{ac} : 30 s; ΔE_s : 6 mV. **(B)** Tampão fosfato:metanol (8:2, v/v), pH 7,5 - $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$, na presença de $2,21 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de surfactante BrCTA. Parâmetros: E_{sw} : 20 mV; f : 120 Hz; t_{ac} : 50 s; ΔE_s : 6 mV..... 59

Figura 37: Efeito da amplitude dos pulsos sobre I_p de redução da genisteína e daidzeína ($\approx 2,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$). **(A)** Tampão fosfato:etanol (8:2, v/v), pH 7,5 - $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$, na presença de $2,04 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de surfactante BrCTA. Parâmetros: t_{ac} : 30 s; E_{ac} : -0,2V; f : 120 Hz; ΔE_s : 6 mV. **(B)** Tampão fosfato:metanol (8:2, v/v), pH 7,5 - $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$, na presença de $2,21 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de surfactante BrCTA. Parâmetros: t_{ac} : 50 s; E_{ac} : 0 V; f : 120 Hz; ΔE_s : 6 mV..... 60

Figura 38: Efeito da amplitude dos pulsos (E_{sw}) sobre E_p de redução da genisteína

e daidzeína ($\approx 2,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$). **(A)** Tampão fosfato:etanol (8:2, v/v), pH 7,5 - 0,04 mol.L⁻¹, na presença de $2,04 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de surfactante BrCTA. Parâmetros: t_{ac} : 30 s; E_{ac} : -0,2 V; f : 120 Hz; ΔE_s : 6 mV. **(B)** Tampão fosfato:metanol (8:2, v/v), pH 7,5 - 0,04 mol.L⁻¹, na presença de $2,21 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de surfactante BrCTA. Parâmetros: t_{ac} : 50 s; E_{ac} : 0 V; f : 120 Hz; ΔE_s : 6 mV..... 61

Figura 39: Voltamogramas de onda quadrada de redução da genisteína e daidzeína ($\approx 2,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$) em diferentes valores de amplitude de pulso. **(A)** Tampão fosfato:etanol (8:2, v/v), pH 7,5 - 0,04 mol.L⁻¹, na presença de $2,04 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de surfactante BrCTA. Parâmetros: t_{ac} : 30 s; E_{ac} : -0,2 V; f : 120 Hz; ΔE_s : 6 mV. **(B)** Tampão fosfato:metanol (8:2, v/v), pH 7,5 - 0,04 mol.L⁻¹, na presença de $2,21 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de surfactante BrCTA. Parâmetros: t_{ac} : 50 s; E_{ac} : 0 V; f : 120 Hz; ΔE_s : 6 mV..... 62

Figura 40: Efeito da frequência de aplicação dos pulsos sobre I_p de redução da genisteína e daidzeína ($\approx 2,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$). **(A)** Tampão fosfato:etanol (8:2, v/v), pH 7,5 - 0,04 mol.L⁻¹, na presença de $2,04 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de surfactante BrCTA. Parâmetros: t_{ac} : 30 s; E_{ac} : -0,2 V; E_{sw} : 30 mV; ΔE_s : 6 mV. **(B)** Tampão fosfato:metanol (8:2, v/v), pH 7,5 - 0,04 mol.L⁻¹, na presença de $2,21 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de surfactante BrCTA. Parâmetros: t_{ac} : 50 s; E_{ac} : 0V; E_{sw} : 30 mV; ΔE_s : 6 mV..... 63

Figura 41: Voltamogramas de onda quadrada de redução da genisteína e daidzeína ($\approx 2,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$) em diferentes valores de frequência de aplicação dos pulsos. **(A)** Tampão fosfato:etanol (8:2, v/v), pH 7,5 - 0,04 mol.L⁻¹, na presença de $2,04 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de surfactante BrCTA. Parâmetros: t_{ac} : 30 s; E_{ac} : -0,2 V; E_{sw} : 30 mV; ΔE_s : 6 mV. **(B)** Tampão fosfato:metanol (8:2, v/v), pH 7,5 - 0,04 mol.L⁻¹, na presença de $2,21 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de surfactante BrCTA. Parâmetros: t_{ac} : 50 s; E_{ac} : 0 V; E_{sw} : 30 mV; ΔE_s : 6 mV..... 64

Figura 42: Efeito do incremento de varredura sobre I_p de redução da genisteína e daidzeína ($\approx 2,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$). **(A)** Tampão fosfato:etanol (8:2, v/v), pH 7,5 - 0,04 mol.L⁻¹, na presença de $2,04 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de surfactante BrCTA. Parâmetros: t_{ac} : 30 s; E_{ac} : -0,2 V; E_{sw} : 30 mV; f : 150 Hz. **(B)** Tampão fosfato:metanol (8:2, v/v), pH 7,5 - 0,04 mol.L⁻¹, na presença de $2,21 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de surfactante BrCTA. Parâmetros: t_{ac} : 50 s; E_{ac} : 0 V; E_{sw} : 30 mV; f : 100 Hz..... 65

Figura 43: Voltamogramas de onda quadrada de redução da genisteína e daidzeína ($\approx 2,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$) em diferentes valores de incremento de varredura. (A) Tampão fosfato:etanol (8:2, v/v), pH 7,5 - $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$, na presença de $2,04 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de surfactante BrCTA. Parâmetros: t_{ac} : 30 s; E_{ac} : -0,2 V; E_{sw} : 30 mV; f : 150 Hz. (B) Tampão fosfato:metanol (8:2, v/v), pH 7,5 - $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$, na presença de $2,21 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de surfactante BrCTA. Parâmetros: t_{ac} : 50 s; E_{ac} : 0 V; E_{sw} : 30 mV; f : 100 Hz..... 65

Figura 44: Voltamogramas de redução da daidzeína (Pico I) e genisteína (Pico II) em tampão fosfato:etanol (8:2, v/v) - pH7,5 ($0,04 \text{ mol.L}^{-1}$), na presença de BrCTA ($2,04 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$); onde: (a) $5,0 \cdot 10^{-7}$, (b) $7,5 \cdot 10^{-7}$, (c) $9,9 \cdot 10^{-7}$, (d) $1,2 \cdot 10^{-6}$, (e) $1,5 \cdot 10^{-6}$, (f) $1,7 \cdot 10^{-6}$, (g) $1,9 \cdot 10^{-6}$, (h) $2,2 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$. Parâmetros: t_{ac} : 30s, E_{ac} : -0,2 V; f : 150 Hz, E_{sw} : 30mV, ΔE_s : 5 mV..... 68

Figura 45: Curvas de calibração mostrando a dependência de I_p em função da concentração de daidzeína (A) e de genisteína (B), no intervalo de $5,0 \cdot 10^{-7}$ a $2,2 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ 69

Figura 46: Voltamogramas de redução da daidzeína (Pico I) e genisteína (Pico II) em tampão fosfato:metanol (8:2, v/v) – pH 7,5 ($0,04 \text{ mol.L}^{-1}$), na presença de BrCTA ($2,21 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$); onde: (a) $1,5 \cdot 10^{-7}$, (b) $2,5 \cdot 10^{-7}$, (c) $4,0 \cdot 10^{-7}$, (d) $5,5 \cdot 10^{-7}$, (e) $7,0 \cdot 10^{-7}$, (f) $8,4 \cdot 10^{-7}$, (g) $9,9 \cdot 10^{-7}$, (h) $1,1 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$. Parâmetros: t_{ac} : 50 s, E_{ac} : 0 V; f : 100 Hz, E_{sw} : 30 mV, ΔE_s : 6 mV..... 71

Figura 47: Curvas de calibração mostrando a dependência de I_p em função da concentração de daidzeína (A) e de genisteína (B), no intervalo de $1,5 \cdot 10^{-7}$ a $1,1 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ 71

Figura 48: Perfil voltamétrico das isoflavonas glicosiladas (A) Solução contendo $1,2 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ de daidzina (B) Solução contendo $3,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ de genistina. Branco: tampão fosfato:metanol (8:2, v/v) - pH7,5 ($0,04 \text{ mol.L}^{-1}$), na presença de BrCTA ($2,21 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$). Parâmetros: t_{ac} : 50 s, E_{ac} : 0 V; f : 100 Hz, E_{sw} : 30 mV, ΔE_s : 6 mV..... 73

Figura 49: Influência da redução das isoflavonas glicosiladas em relação à redução da genisteína (A) Solução contendo $6,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ de daidzina e $4,5 \cdot 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$

de genisteína (**B**) Solução contendo $3,0 \cdot 10^{-6}$ mol.L⁻¹ de genistina e $4,5 \cdot 10^{-7}$ mol.L⁻¹ de genisteína. Branco: tampão fosfato:metanol (8:2, v/v) - pH7,5 ($0,04$ mol.L⁻¹), na presença de BrCTA ($2,21 \cdot 10^{-4}$ mol.L⁻¹). Parâmetros: t_{ac} : 50 s, E_{ac} : 0 V; f : 100 Hz, E_{sw} : 30 mV, ΔE_s : 6 mV..... 74

Figura 50: Influência da redução das isoflavonas glicosiladas em relação à redução da daidzeína (**A**) Solução contendo $6,6 \cdot 10^{-6}$ mol.L⁻¹ de daidzina e $2,2 \cdot 10^{-7}$ mol.L⁻¹ de daidzeína (**B**) Solução contendo $3,0 \cdot 10^{-6}$ mol.L⁻¹ de genistina e $2,2 \cdot 10^{-7}$ mol.L⁻¹ de daidzeína. Branco: tampão fosfato:metanol (8:2, v/v) - pH7,5 ($0,04$ mol.L⁻¹), na presença de BrCTA ($2,21 \cdot 10^{-4}$ mol.L⁻¹). Parâmetros: t_{ac} : 50 s, E_{ac} : 0 V; f : 100 Hz, E_{sw} : 30 mV, ΔE_s : 6 mV..... 75

Figura 51: Voltamogramas de onda quadrada referente a análise de determinação de genisteína em amostras de farinha de soja – (**A**) Após extração com metanol aquoso a 80%; (**B**) Após extração com CH₃CN:H₂O:HCl ($0,1$ mol.L⁻¹), na proporção 10:7:2 (v/v); onde: (**a**) Branco: tampão fosfato:metanol (8:2, v/v) – pH 7,5 ($0,04$ mol.L⁻¹), na presença de BrCTA ($2,21 \cdot 10^{-4}$ mol.L⁻¹); (**b**) 100 µL do extrato de farinha de soja; (**P₁ – P₄**) adições do padrão de genisteína. Parâmetros: t_{ac} : 50 s, E_{ac} : 0 V; f : 100 Hz, E_{sw} : 30 mV, ΔE_s : 6 mV..... 77

Figura 52: Curvas de recuperação de genisteína em farinha de soja – (**A**) Após extração com metanol aquoso a 80%; (**B**) Após extração com CH₃CN:H₂O:HCl ($0,1$ mol.L⁻¹), na proporção 10:7:2 (v/v)..... 78

Figura 53: Dependência de I_p com a concentração de genisteína para sua quantificação em farinha de soja – (**A**) Após extração com metanol aquoso a 80%; (**B**) Após extração com CH₃CN:H₂O:HCl ($0,1$ mol.L⁻¹), na proporção 10:7:2 (v/v). 79

Figura 54: Voltamogramas de onda quadrada referente a análise de determinação de genisteína em farinha de soja utilizando extração em fase sólida (EFS); onde: (**a**) Branco: tampão fosfato:metanol (8:2, v/v) – pH 7,5 ($0,04$ mol.L⁻¹), na presença de BrCTA ($2,21 \cdot 10^{-4}$ mol.L⁻¹); (**b**) 50 µL do eluato com isoflavonas; (**P₁ – P₄**) adições de padrão de genisteína. Parâmetros: t_{ac} : 50 s, E_{ac} : 0 V; f : 100 Hz, E_{sw} : 30 mV, ΔE_s : 6 mV..... 81

Figura 55: Dependência de I_p com a concentração de genisteína. (**A**) Curva de

recuperação de uma das análises de genisteína em farinha de soja após EFS; (B) Curva de quantificação de uma das análises de genisteína em farinha de soja após EFS..... 82

Figura 56: Voltamogramas de onda quadrada referente a análise de determinação de genisteína no medicamento fitoterápico A – (A) Após extração simples (conforme item 2.3.1.); (B) Após extração em fase sólida (conforme item 2.3.2.); onde: (a) Branco: tampão fosfato:metanol (8:2, v/v) – pH 7,5 ($0,04 \text{ mol.L}^{-1}$), na presença de BrCTA ($2,21 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$); (b) 50 μL do extrato de medicamento fitoterápico A; ($P_1 - P_4$) adições do padrão de genisteína. Parâmetros: t_{ac} : 50 s, E_{ac} : 0 V; f : 100 Hz, E_{sw} : 30 mV, ΔE_s : 6 mV..... 85

Figura 57: Curvas de recuperação de genisteína no medicamento fitoterápico A – (A) Após extração simples; (B) Após extração em fase sólida..... 86

Figura 58: Dependência de I_p com a concentração de genisteína para sua quantificação no medicamento fitoterápico A – (A) Após extração simples; (B) Após extração em fase sólida..... 87

Figura 59: Voltamogramas de onda quadrada referente a uma análise de determinação de daidzeína no medicamento fitoterápico B – (A) Após extração simples (conforme item 2.3.1.); (B) Após extração em fase sólida (conforme item 2.3.2.); onde: (a) Branco: tampão fosfato:metanol (8:2, v/v) – pH 7,5 ($0,04 \text{ mol.L}^{-1}$), na presença de BrCTA ($2,21 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$); (b) 30 μL do extrato de medicamento fitoterápico B; ($P_1 - P_4$) adições do padrão de daidzeína. Parâmetros: t_{ac} : 50 s, E_{ac} : 0 V; f : 100 Hz, E_{sw} : 30 mV, ΔE_s : 6 mV..... 90

Figura 60: Curvas de recuperação de daidzeína no medicamento fitoterápico B – (A) Após extração simples; (B) Após extração em fase sólida..... 90

Figura 61: Dependência de I_p com a concentração de daidzeína para sua quantificação no medicamento fitoterápico B – (A) Após extração simples; (B) Após extração em fase sólida..... 92

Figura 62: Perfil cromatográfico do padrão daidzeína nas concentrações injetadas entre 13 e $120 \mu\text{g.mL}^{-1}$ com t_R de 28,181 min. Inserção: Curva analítica obtida para daidzeína. Fase Móvel: gradiente de solvente A: 0,1% de ácido acético glacial em

água e solvente B: 0,1% de ácido acético glacial em acetonitrila, coluna C18 OmniSpher, fluxo variado em 1,0 e 1,5 mL.min ⁻¹ , detecção em 260 nm.....	94
Figura 63: Perfil cromatográfico do padrão genisteína nas concentrações injetadas entre 14 e 125 µg.mL ⁻¹ com t _R de 39,021 min. Inserção: Curva analítica obtida para genisteína. Fase Móvel: gradiente de solvente A: 0,1% de ácido acético glacial em água e solvente B: 0,1% de ácido acético glacial em acetonitrila, coluna C18 OmniSpher, fluxo variado em 1,0 e 1,5 mL.min ⁻¹ , detecção em 260 nm.....	95
Figura 64: Cromatograma do extrato de farinha de soja obtido por extração simples.....	112
Figura 65: Cromatograma do extrato de farinha de soja obtido após EFS.....	112
Figura 66: Cromatograma do extrato do medicamento fitoterápico A após extração simples.....	113
Figura 67: Cromatograma do extrato do medicamento fitoterápico A após EFS.....	113
Figura 68: Cromatograma do extrato do medicamento fitoterápico B após extração simples.....	114
Figura 69: Cromatograma do extrato do medicamento fitoterápico B após EFS.....	114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Variações regionais da quantidade de isoflavona por 100 g de Soja.....	04
Tabela 2: Técnicas analíticas mais comuns para análise de fitoestrogênios da classe das isoflavonas em alimentos e em fluídos biológicos humanos.....	16
Tabela 3: Classificação dos surfactantes de acordo com a dissociação em água.....	21
Tabela 4: Dados obtidos para regressão linear dos três segmentos apresentados no estudo da influência do pH sobre o E_p de redução da genisteína através da VOQ.....	33
Tabela 5: Valores de pK_a e energia de desprotonação para a genisteína abordados na literatura em comparação com valores de pK_a obtidos por VOQ.....	34
Tabela 6: Dados obtidos para regressão linear dos três segmentos apresentados no estudo da influência do pH no E_p de redução da daidzeína através da VOQ.....	45
Tabela 7: Valores de pK_a da daidzeína abordados na literatura em comparação com os obtidos por VOQ.....	46
Tabela 8: Parâmetros instrumentais para análise de daidzeína e genisteína através da técnica de VOQ em tampão fosfato:etanol (8:2, v/v) e em tampão fosfato:metanol (8:2, v/v).....	66
Tabela 9: Parâmetros estudados para a validação do método eletroanalítico na análise de daidzeína e genisteína em tampão fosfato:etanol (8:2, v/v), através da técnica de VOQ.....	70
Tabela 10: Parâmetros estudados para a validação do método eletroanalítico na análise de daidzeína e genisteína em tampão fosfato:metanol (8:2, v/v), através da técnica de VOQ.....	72
Tabela 11: Resultados do estudo de recuperação de genisteína em amostras de farinha de soja por extração simples, através da técnica de VOQ.....	78
Tabela 12: Determinação de genisteína em amostras de farinha de soja por	

extração simples, através da técnica de VOQ.....	80
Tabela 13: Resultados do estudo de recuperação de genisteína em amostras de farinha de soja por EFS, através da técnica de VOQ.....	82
Tabela 14: Determinação de genisteína em amostras de farinha de soja por EFS, através da técnica de VOQ.....	83
Tabela 15: Resultados do estudo de recuperação de genisteína no medicamento fitoterápico A por extração simples e por EFS, através da técnica de VOQ.....	86
Tabela 16: Determinação de genisteína no medicamento fitoterápico A por extração simples e por EFS, através da técnica de VOQ.....	88
Tabela 17: Resultados do estudo de recuperação de daidzeína no medicamento fitoterápico B por extração simples e por EFS, através da técnica de VOQ.....	91
Tabela 18: Determinação de daidzeína no medicamento fitoterápico B por extração simples e por EFS, através da técnica de VOQ.....	93
Tabela 19: Conteúdo de genisteína e daidzeína encontrados nos produtos de soja por CLAE.....	96
Tabela 20: Comparação entre os resultados obtidos para quantificação de genisteína em farinha de soja e no medicamento fitoterápico A através das metodologias de VOQ e CLAE.....	98
Tabela 21: Comparação entre os resultados obtidos para quantificação de daidzeína no medicamento fitoterápico B através das metodologias de VOQ e CLAE.....	99

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

α = coeficiente de transferência eletrônica

v = velocidade de varredura

μA = microámpere

μL = microlitro

μg = micrograma

$\Delta E_{p/2}$ = largura da meia altura em voltametria de onda quadrada

ΔE_s = incremento de varredura de potencial

[] = concentração

a = amplitude de pulso para polarografia de pulso diferencial

a = coeficiente linear

Ag = prata

AgCl = cloreto de prata

b = coeficiente angular

BR = Britton-Robinson

BrCTA = brometo de cetiltrimetilamônio

CG = cromatografia gasosa

CLAE = cromatografia líquida de alta eficiência

Daid. = daidzeína

DP_a = desvio padrão da média aritmética da corrente do branco

DSS = lauril-dodecil sulfato de sódio

e^- = elétron

E_{ac} = potencial de deposição ou potencial de acúmulo

EFS = extração em fase sólida

EM = espectrometria de massa

E_p = potencial de pico

E_r = erro relativo

E_{sw} = amplitude de pulso para voltametria de onda quadrada e de pulso diferencial

f = frequência de aplicação de pulsos

g = grama

Gen. = genisteína

Hg = mercúrio

HMDE = eletrodo de gota pendente de mercúrio

Hz = hertz

I_p = corrente de pico

LD = limite de detecção

LQ = limite de quantificação

mol.L^{-1} = concentração molar

mV = milivolt

m/v = massa/volume

n = número de elétrons

nA = nanoampere

nm = nanômetro

PPD = polarografia de pulso diferencial

r = coeficiente de correlação

R = recuperação

R_M = recuperação média

rpm = rotação por minuto

RSD = desvio padrão relativo

S = desvio padrão

t_{ac} = tempo de deposição ou tempo de acúmulo

t_R = tempo de retenção

t_{RM} = tempo de retenção médio

UV-Vis = ultravioleta-visível

V = volt

v/v = volume/volume

VOQ = voltametria de onda quadrada

VPD = voltametria de pulso diferencial

vs = *versus*

Z = número de prótons

RESUMO

As isoflavonas são componentes bioativos encontrados em quantidades significativas em grãos de soja. Estes compostos pertencem à família dos fitoestrogênios, isto é, possuem uma semelhança com o hormônio 17- β -estradiol, o que lhes confere um importante papel na prevenção de alguns tipos de câncer, alívio dos sintomas da menopausa, redução do risco de doenças cardiovasculares e osteoporose. Assim, neste trabalho, propõe-se o uso do eletrodo de gota de mercúrio (HMDE) para a determinação das principais isoflavonas bioativas, daidzeína e genisteína, em produtos de soja utilizando a voltametria de onda quadrada (VOQ). Para o desenvolvimento da metodologia foi de suma importância o uso do surfactante catiônico brometo de cetiltrimetil amônio (BrCTA), pois foi o único a proporcionar uma separação adequada entre os picos de redução da daidzeína ($E_p = -1,45$ V vs Ag/AgCl) e genisteína ($E_p = -1,56$ V vs Ag/AgCl), além de promover aumentos na definição e corrente dos picos. Com os parâmetros otimizados, uma excelente resposta voltamétrica foi obtida em tampão fosfato:metanol (8:2, v/v) - $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 7,5 e na presença de $2,21 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de BrCTA. Sob estas condições, valores de LQ de $1,87 \cdot 10^{-7}$ e $1,14 \cdot 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ foram obtidos para a daidzeína e genisteína, respectivamente. O método permitiu a quantificação de genisteína em farinha de soja ($\approx 0,132 \text{ mg.g}^{-1}$) e no medicamento fitoterápico de marca A ($\approx 1,842 \text{ mg.g}^{-1}$). A análise de daidzeína nestas amostras não foi possível pela interferência das isoflavonas glicosiladas, mas a grande variabilidade das matrizes de produtos de soja permitiu que esta isoflavona fosse quantificada em outro medicamento fitoterápico de marca B, no qual apresentou um alto teor de daidzeína ($\approx 54,421 \text{ mg.g}^{-1}$). Os níveis de recuperação encontrados variaram entre 96,08 e 104,31% indicando a viabilidade da metodologia proposta. Ainda, a eficiência do método foi demonstrada por comparação com os resultados obtidos pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Palavras-Chave: daidzeína, genisteína, BrCTA, soja, determinação eletroanalítica.

ABSTRACT

Isoflavones are bioactive compounds found in significant quantities in soybeans. These compounds belong to the phytoestrogens family, i.e., have a similarity to the hormone 17- β -estradiol, which gives them an important role in preventing some types of cancer, relief of menopausal symptoms, reduction the risk of cardiovascular disease and osteoporosis. Thus, in this work, it is proposed the use of hanging mercury drop electrode (HMDE) for the determination of major bioactive isoflavones, daidzein and genistein, in soy products by square wave voltammetry (SWV). For the development of the methodology was very important the use of cationic surfactant cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), because was the only one to provide adequate separation between the reduction peaks of daidzein ($E_p = -1.45$ V vs. Ag/AgCl) and genistein ($E_p = -1.56$ V vs. Ag/AgCl), and promote the increases of definition and current of peaks. With the optimized parameters, an excellent voltammetric response was obtained in phosphate buffer:methanol (8:2, v/v) - 0.04 mol L^{-1} , pH 7.5 and in the presence of $2.21 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ CTAB. Under these conditions, values of LQ of 1.87×10^{-7} and $1.14 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ were obtained for daidzein and genistein, respectively. The method allowed the quantification of genistein in soy flour ($\approx 0.132 \text{ mg g}^{-1}$) and herbal medicine of brand A ($\approx 1.842 \text{ mg g}^{-1}$). The analysis of daidzein in these samples was not possible due the interference of isoflavone glycosides, but the great variability of soy products matrices allowed this isoflavone to be quantified in another herbal medicine of brand B, in which showed a high content of daidzein ($\approx 54.421 \text{ mg g}^{-1}$). Recovery levels found varied between 96.08 and 104.31% indicating the viability of the proposed methodology. Still, the efficiency of the method was demonstrated by comparing with the results obtained by the high-performance liquid chromatography technique (HPLC).

Keywords: daidzein; genistein; CTAB; soybean; electroanalytical determination.

1. INTRODUÇÃO

Diversos alimentos são utilizados há milhares de anos pela cultura popular na redução do risco de doenças. Hipócrates, há cerca de 2500 anos atrás, já pregava em uma de suas célebres frases que dizia: "faça do alimento o seu medicamento". Porém, apenas no século XX os alimentos vêm sendo estudados de maneira minuciosa quanto às suas propriedades medicinais e fisiológicas (FERRARI & KUSANO, 2005).

Hoje, os alimentos que contêm substâncias capazes de atuar no metabolismo ou na fisiologia do ser humano resultando em uma maior proteção e benefício à saúde, recebem a denominação de alimentos funcionais ou nutracêuticos. (PACHECO & SGARBIERI, 2001).

Um importante exemplo de substâncias tidas como bioativas, dando aos alimentos a propriedade funcional, são os fitoestrogênios. A família dos fitoestrogênios engloba algumas classes de substâncias: os flavonóides, como as isoflavonas e cumestanos, os linhanos e os derivados do resorcinol. Na classe das isoflavonas bioativas encontram-se a genisteína, daidzeína e gliciteína. Na classe do linhanos destacam-se os compostos enterodiol e enterolactona; e o principal derivado do resorcinol é o resveratrol (DE MATOS *et al.*, 2005; TSUNODA *et al.*, 2002).

Na planta, estes compostos fitoestrógenos são originados pelo metabolismo secundário e possuem algumas funções como: nutrição para atração de simbioses, defesa contra herbívoros e microorganismos, proteção contra os raios UV e atração de polinizadores (BRANN *et al.*, 1995).

O primeiro grande passo na pesquisa de fitoestrogênios deu-se em 1946, quando descobriu-se que o equol (principal metabólito da daidzeína) era o responsável pelo grande número de ovelhas inférteis na Austrália, devido à ingestão da planta *Trifolium subterraneum* (Trevo Vermelho, rico em isoflavonas) presente nas pastagens (KNIGHT & EDEN, 1995; DE MATOS *et al.*, 2005). Este fato foi desvendado ao se descobrir que os fitoestrogênios poderiam induzir respostas, tais como infertilidade, atribuído a semelhança com o hormônio 17- β -estradiol, possuindo a capacidade de vincular-se ao receptor de estrogênio (KUHNLE *et al.*, 2007).

No entanto, os fitoestrogênios ganharam uma atenção considerável nos últimos anos, tanto de profissionais da saúde quanto de pesquisadores, pois foram relacionadas à prevenção de doenças. Dados epidemiológicos indicaram que as pessoas de culturas

asiáticas têm índices mais baixos de determinados cânceres, e um fator contribuinte é a soja diariamente encontrada na dieta desta população. Além disso, inúmeros estudos *in vitro* demonstraram que as isoflavonas da soja são eficazes agentes quimioprotetivos para certos tipos de câncer e, como resultado, a soja tornou-se um promissor alimento nutracêutico com significativos benefícios a saúde (NAGASAWA, 1980).

Assim como a soja, outros alimentos incluídos diariamente na dieta são fontes de compostos bioativos, fazendo com que a indústria de alimentos funcionais evolua a um ritmo rápido para responder o interesse do consumidor em uma alimentação saudável.

No Brasil, dos R\$ 88,2 bilhões que as fábricas do setor alimentício faturaram no ano de 2006, R\$ 700 milhões (0,8%) foram provenientes das vendas de alimentos funcionais. Pelas pesquisas realizadas, enquanto o ramo de alimentos deve crescer entre 4,5% e 5% ao ano, os funcionais devem ter expansão de 12% a 14% (KRONES NEWS, 2008). Apesar de o mercado brasileiro estar em expansão, o faturamento dos funcionais ainda se concentra na Europa, Japão e Estados Unidos, onde as vendas crescem mais de 40% ao ano (SBAF, 2007).

No entanto, a crescente evolução deste mercado em âmbito mundial, não garante que as pesquisas com alimentos funcionais irão trazer avanços para a saúde sem que os benefícios dos alimentos sejam efetivamente comprovados e passem a ser de domínio público (SALGADO & ALMEIDA, 2008).

Para isto, existem os órgãos regulamentadores específicos nos países, no caso do Brasil, a indústria deve seguir a legislação do Ministério da Saúde, juntamente com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que estabelece normas para rotulagem de produtos com alegação de propriedades funcionais ou de saúde (SBAF, 2007).

Este tipo de informação em relação aos alimentos tem recebido uma maior atenção pelo fato dos consumidores estarem cada vez mais conscientes da ligação entre saúde e nutrição (CARDOSO & OLIVEIRA, 2008). A preferência à prevenção e não à cura de doenças está associada a uma dieta equilibrada, hábitos de vida saudáveis e alimentos funcionais. Portanto, é de extrema importância o processo de regulamentação dos produtos e o estabelecimento de bases tecnológicas e científicas que desenvolvam metodologias de análise para um controle seguro dessas substâncias bioativas presentes nos alimentos funcionais.

1.1. Soja

A soja (*Glycine max* L.) hoje cultivada é muito diferente dos seus ancestrais, que eram plantas rasteiras que se desenvolviam na costa leste da Ásia, principalmente ao longo do Rio Yangtse, na China. Sua importância na dieta alimentar da antiga civilização chinesa era tal, que a soja, juntamente com o trigo, arroz, centeio e milho, era considerada um grão sagrado, com direito a cerimônias ritualísticas na época do plantio e da colheita (SOUZA *et al.*, 2000).

Apesar de conhecida e explorada no Oriente há mais de cinco mil anos, somente na segunda década do século vinte o Estados Unidos (EUA) iniciou a exploração comercial de soja, primeiro como forrageira e, posteriormente, como grãos. Em meados dos anos 60, a área cultivada para a produção de grãos crescia de forma exponencial, não apenas nos EUA, como também no resto do mundo. O EUA tornou-se o maior produtor de soja, seguido pelo Brasil, Argentina e China, responsáveis por aproximadamente 90% da produção mundial (SOUZA *et al.*, 2000).

Atualmente, a soja adquiriu tal importância que é alvo de inúmeros estudos, sendo considerado um dos principais alimentos funcionais. Dentre os seus componentes bioativos estão: as saponinas, os fitatos, os inibidores de protease, os ácidos fenólicos, os açúcares complexos, os ácidos graxos ômega-3, a lecitina, os fitoesteróis, o boro, a vitamina E (tocoferol), o ácido fólico, as proteínas e as isoflavonas (PAXTON, 1998).

O extrato de soja possui um alto teor de proteína (cerca de 40 %), o que leva a um grande interesse para a alimentação como substituta da carne. Em 1999, o órgão de controle de alimentos do EUA (FDA) admitiu a informação para fins de rotulagem nutricional que “dietas com baixo conteúdo de gorduras saturadas e colesterol e que incluam o consumo diário de 25 gramas de proteína de soja podem reduzir os riscos de doenças do coração” (MESSINA, 1999).

Quanto ao consumo de isoflavonas, vários autores chegaram à conclusão de que a ingestão de aproximadamente 50 mg por dia são necessários para que ocorram os efeitos benéficos à saúde (TSUKAMOTO *et al.*, 2001; ALVES & SILVA, 2002). Vale lembrar que o teor de isoflavona varia muito nos diferentes cultivares de soja, como exemplo, essas variações são apresentadas na **Tabela 1** de acordo com alguns países produtores de soja.

Tabela 1: Variações regionais da quantidade de isoflavona por 100 g de soja.

País	Isoflavona (mg.100g ⁻¹)
Brasil	140
USA	200
China	250
Norte do Japão	450
Canadá	550

Fonte: TSUKAMOTO *et al.*, 2001.

Embora o conteúdo de isoflavona da soja brasileira comum seja relativamente baixo, ele varia muito. Foram desenvolvidas no Brasil, variedades que contêm quase 300 mg de isoflavonas por 100 g de semente (TSUKAMOTO *et al.*, 2001).

1.2. Isoflavonas

As isoflavonas pertencem à classe dos flavonóides amplamente encontrados em tecidos vasculares de plantas, incluindo frutas, pólen, raízes e caules (PIETTA, 2000; DI CARLO *et al.*, 1999). Os flavonóides são biossintetizados a partir do metabolismo dos aminoácidos, fenilalanina e tirosina, que agem como precursores na síntese do *trans*-4-coumarato (derivado do ácido cinâmico). Este, por sua vez, dá origem a um intermediário ao qual são adicionados três resíduos de malonato, com posterior ciclização desta estrutura (DI CARLO *et al.*, 1999) (**Figura 1**).

A estrutura básica dos flavonóides consiste de um núcleo flavano (**Figura 2**), constituído de quinze átomos de carbono arranjados em três anéis (C₆-C₃-C₆), sendo dois anéis fenólicos substituídos (A e B) e um anel pirano (de cadeia heterocíclica, anel C). Os anéis A e B podem apresentar grupos substituintes hidroxílicos ou metoxílicos. As isoflavonas se caracterizam por possuir o anel B ligado ao anel C na posição do carbono 3. (HERRMANN *et al.*, 2001; DI CARLO *et al.*, 1999).

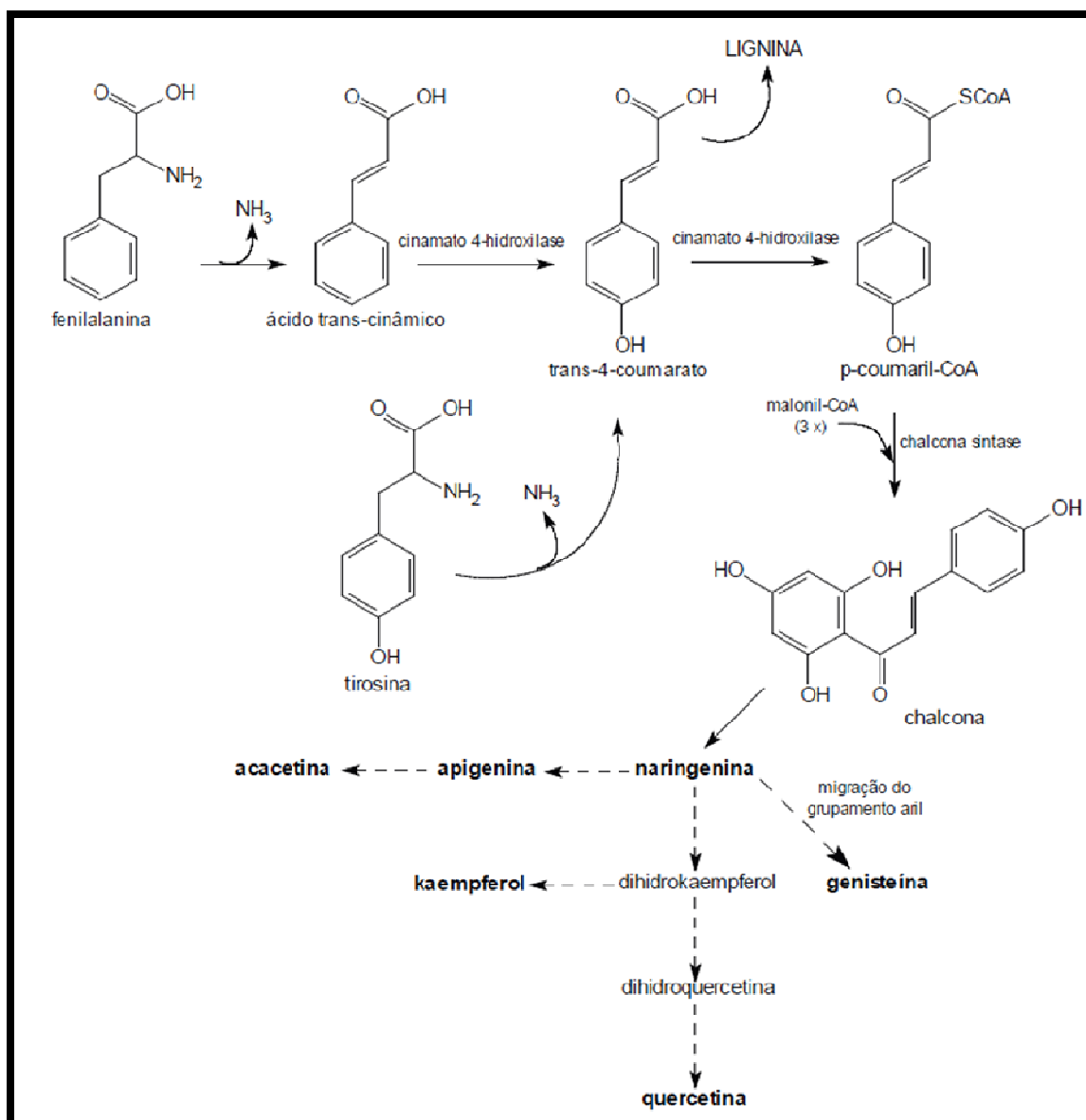


Figura 1: Biossíntese dos flavonóides (DI CARLO *et al.*, 1999).

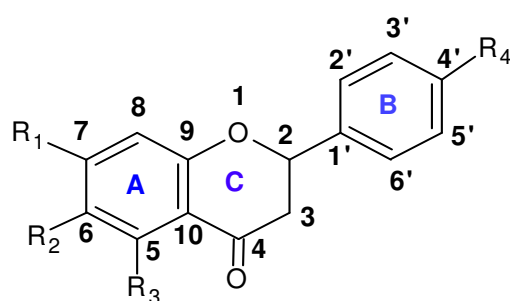


Figura 2: Estrutura planar básica dos flavonóides (núcleo flavano).

As isoflavonas são ricamente encontradas na soja (fonte principal desses compostos). Neste grão, as isoflavonas se apresentam em quatro formas químicas: agliconas (**Figura 3**), glucosídeos, acetil-glucosídeos e malonil-glucosídeos (**Figura 4**). Cada uma dessas formas químicas são constituídas por três compostos análogos, portanto encontram-se 12 compostos da classe das isoflavonas na soja (SETCHELL, 1998; XU *et al.*, 2002).

A forma isoflavônica bioativa é a aglicona constituída pela genisteína, daidzeína e gliciteína. As demais formas glucosiladas podem ser metabolizadas pelo organismo, originando as formas agliconas (SETCHELL, 1998). Na *Trifolium subterraneum* ou na *Trifolium pratense* L. (trevo vermelho) encontram-se ainda dois tipos diferentes de isoflavonas agliconas: biochanina A e formononetina (**Figura 3**), estas também são precursoras da daidzeína e genisteína, respectivamente (DE MATOS *et al.*, 2005).

Os níveis de isoflavonas na soja variam em função do clima, do local do plantio, da disponibilidade de água e variabilidade da espécie. A forma de obtenção e processamento industrial do produto também influenciam nos teores finais de isoflavonas. Estes fatores podem dificultar a padronização da concentração de isoflavonas, caso não ocorra um controle rígido durante a produção da matéria-prima (ANVISA, 2002).

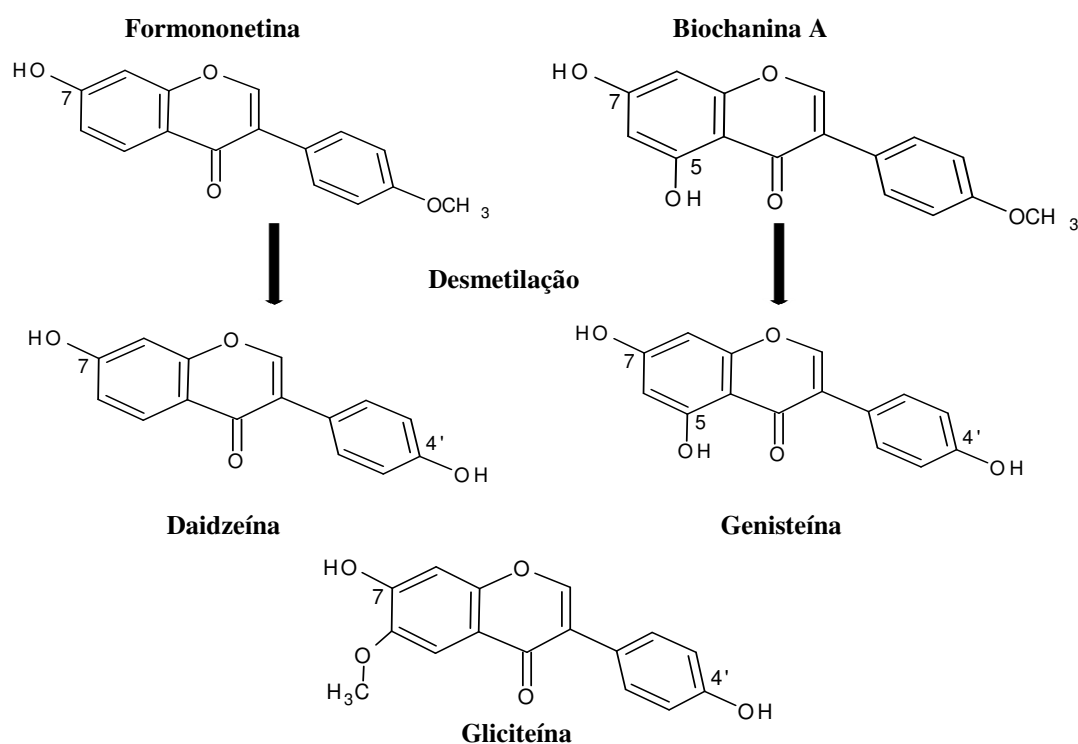
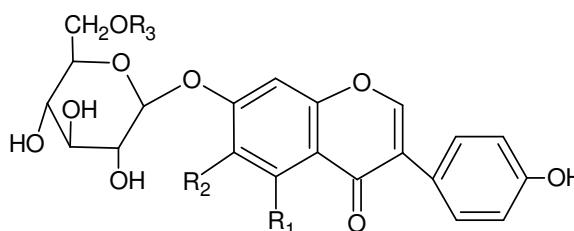


Figura 3: Isoflavonas na forma aglicona.



Forma Química	Composto	R ₁	R ₂	R ₃
Glucosídeos (7-O-β-glucosídeos)	Daidzina	H	H	H
	Glicitina	H	OCH ₃	H
	Genistina	O	H	H
Acetil-glucosídeos [7-O-β-(6''-O-acetil)-glucosídeos]	6''-O-acetil daidzina	H	H	COCH ₃
	6''-O-acetil glicitina	H	OCH ₃	COCH ₃
	6''-O-acetil genistina	O	H	COCH ₃
Malonil-glucosídeos [7-O-β-(6''-O-malonil)-glucosídeos]	6''-O-malonil daidzina	H	H	COCH ₂ COOH
	6''-O-malonil glicitina	H	OCH ₃	COCH ₂ COOH
	6''-O-malonil genistina	O	H	COCH ₂ COOH

Figura 4: Isoflavonas nas formas glicosiladas.

1.2.1. Absorção e metabolismo

As isoflavonas encontram-se geralmente em suas formas glucosiladas, após a ingestão, ocorre um complexo mecanismo enzimático de conversão no trato gastrointestinal, resultando na formação das agliconas: genisteína, daidzeína e gliciteína, que são estruturalmente similares ao 17β-estradiol (MESSINA, 1999). Estes compostos podem ser absorvidos diretamente pelo intestino ou biotransformado em equol (produto de degradação da daidzeína) ou *p*-etilfenol (produto de degradação da genisteína) por ação de bactérias glucosidases (KNIGHT & EDEN, 1995; TAPIERO *et al.*, 2002).

O uso de técnicas rápidas atualmente permite analisar alguns produtos de degradação das isoflavonas, evidenciando a ocorrência de clivagem e reações de metilação, hidroxilação, sulfatação ou glucuronidação, as quais ocorrem no fígado e no intestino (PISKULA & TERAQ, 1998; MANACH *et al.*, 1998). No entanto, o efeito da ingestão deste fitohormônio no organismo dependerá principalmente de dois fatores: a quantidade de compostos ingeridos e a flora bacteriana de cada indivíduo (SETCHELL & CASSIDY, 1999). A **Figura 5** mostra esquematicamente as possíveis transformações ocorridas durante o metabolismo de isoflavonas em humanos e animais.

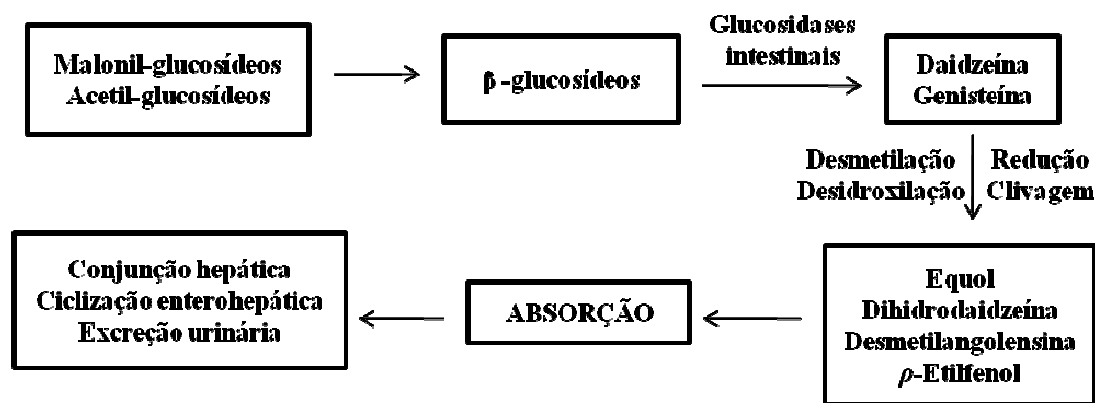


Figura 5: Transformações metabólicas ocorridas com isoflavonas em humanos e animais domésticos (SETCHELL & CASSIDY, 1999).

1.2.2. Mecanismo de ação

As isoflavonas bioativas, genisteína e daidzeína, são conhecidas por serem compostos seletivos de receptores estrogênicos do tipo β (ER- β) (DE ANGELIS *et al.*, 2005). Estes compostos se ligam e ativam os ER- β cerca de 100 vezes mais fortemente do que a ligação e ativação feita com os receptores de estrógeno do tipo α (ER- α) (HARRIS *et al.*, 2005). Nos tecidos, a distribuição e as afinidades de ligação dos ligantes com os ER- α e ER- β diferem, e isto pode ajudar a explicar a ação seletiva dos estrógenos em diferentes tecidos. Os ER- β , por exemplo, são expressamente encontrados no ovário, próstata, pulmão e hipotálamo (KUIPER *et al.*, 1997).

Em relação ao potencial hormonal das isoflavonas, essas apresentam uma atividade muito mais fraca do que o estradiol (razão de 1/1.000 a 1/100.000 inferior), o que permitiu a estes compostos apresentarem duas formas de ação no organismo: estrogênica e anti-estrogênica (QUEIROZ *et al.*, 2006).

Na presença do estradiol, as isoflavonas apresentam uma atividade anti-estrogênica, já que compete com este pelos sítios de ligação dos receptores de estrógenos presentes nas células. Esta ação leva a uma diminuição dos riscos e efeitos colaterais, como por exemplo, a de câncer de mama nas mulheres. Na ausência do estrogênio (durante a menopausa), estes compostos apresentam ação estrogênica, substituindo a falta de hormônio produzido pelo organismo, o que leva o alívio dos sintomas da menopausa, reduz o risco de doenças cardiovasculares e da osteoporose conseqüentes da falta de hormônio (QUEIROZ *et al.*, 2006; CASSIDY *et al.*, 1994; SETCHELL, 1998).

As isoflavonas possuem ainda alguns mecanismos de ação independentes dos receptores de estrogênio, dentre eles estão: o efeito inibitório de enzimas ligadas à formação do câncer como a tiroxina proteína-quinase; também a inibição das enzimas ribossomo S6 quinase e topoisomerase I e II do DNA (devido à formação do complexo estável DNA-topoisomerase), que são responsáveis pelo crescimento e regulação celular. Ainda possuem propriedades antioxidantes, pois pertencem a classe dos polifenóis (KNIGHT & EDEN, 1995; DE MATOS *et al.*, 2005).

A genisteína tem sido muito estudada não somente por seu potencial efeito anti-estrogênico, mas porque inibe várias enzimas envolvidas em processos de carcinogênese. Além disso, inibiria a produção de radicais livres, modularia o ciclo celular e, eventualmente, poderia precipitar a apoptose. Ela ainda constitui um fator importante na prevenção de doenças inflamatórias e auto-imunes. A sua concentração na maioria dos produtos de soja varia de 1 a 2 mg.g⁻¹ (BARNES, 1995; WEI *et al.*, 1995).

Muitos estudos realizados com a daidzeína relatam que esta só exerce algum efeito hormonal quando combinada com a genisteína. No entanto, algumas pesquisas citam que a daidzeína é mais eficiente que a genisteína na prevenção de perda óssea ou osteoporose (TOVAR & ACOSTA, 2004; PICHERIT *et al.*, 2000).

A gliciteína possui uma estrutura química similar à genisteína e daidzeína, portanto espera-se que esta também apresente atividades fisiológicas. No entanto, o mecanismo de ação da gliciteína ainda é estudado devido à grande instabilidade térmica deste composto, que dificulta até a expansão de sua comercialização como padrão de referência em procedimentos analíticos. Por esta instabilidade, os teores de gliciteína são geralmente bem inferiores aos das outras isoflavonas na soja (SONG *et al.*, 1999; DE AGUIAR, 2004).

A biochanina A e a formononetina mostram pouca afinidade pelo receptor de estrogênio devido à presença dos grupos metoxilados no anel B, porém estes são rapidamente desmetilados no organismo resultando em daidzeína e genisteína (**Figura 3**), respectivamente (TAPIERO *et al.*, 2002).

1.2.3. Efeitos adversos

Há um número crescente de relatos recentes que sugerem que os fitoestrogênios têm alguns efeitos negativos em relação à carcinogênese, função reprodutiva, imunidade e ao equilíbrio hormonal. Outros especialistas acreditam que ainda é muito cedo para

recomendar isoflavonas de soja no tratamento de sintomas da menopausa ou para terapia de reposição de estrogênio. Eles afirmam que existe uma falta de informações específicas sobre a dosagem efetiva, prazo de administração, e os efeitos a longo prazo. Para determinar se o seu uso, nestas situações, é prejudicial ou benéfico, muitos estudos são realizados (ALBULESCO & POPOVICI, 2007).

Setchell e Cassidy (1999) afirmam que a concentração relativamente alta de isoflavonas nos formulados infantis pode levar a possíveis efeitos adversos nos períodos de desenvolvimento das crianças, devido a potencial ação hormonal destes fitoestrogênios. De Matos e colaboradores (2005) complementam dizendo que a genisteína e a daidzeína inibem a tireóide peroxidase, enzima responsável pela produção de hormônios tireoidianos, podendo causar o aumento da glândula tireóide (bócio) e hipotireoidismo.

Outro fator preocupante é que as atividades, estrogênica e antiproliferativa, da genisteína apresentam um aparente paradoxo, podendo também afetar o organismo negativamente gerando um efeito de aumento da tumorigênese em locais específicos (WANG *et al.*, 1996).

Alguns estudos de dose resposta de genisteína em células MCF-7 (células de câncer de mama) chegaram à conclusão que a genisteína pode agir como um estrógeno agonista pelo fato de estimular o crescimento da cultura de células MCF-7 a baixas concentrações (HSIEH *et al.*, 1998; WANG & KURZER, 1997; SANTELL *et al.*, 1998). Ainda, estudos sugerem que como a atividade estrogênica destas moléculas tem sido comparada ao fármaco tamoxifeno, deverá ter-se em mente que o seu uso também pode aumentar o risco de se desenvolver câncer do endométrio (DIEL *et al.*, 2004). Todas estas preocupações ressaltam a importância da quantificação destes compostos em alimentos, suplementos, medicamentos, etc.

1.3. Métodos de extração

Dados referentes quanto ao melhor solvente de extração de isoflavonas são bastante conflitantes. As isoflavonas glicosiladas são geralmente solúveis em água e em álcool, mas insolúveis em solventes orgânicos. Já as isoflavonas agliconas são parcialmente solúveis em água e solúveis em éter, metanol, acetonitrila (ALVES & SILVA, 2002).

A separação de diferentes compostos (como as isoflavonas agliconas e seus glucoconjugados) é um problema comum em ambos os estudos clínicos e fitoquímicos,

esta rotina algumas vezes é resolvida pelo uso de HPLC de fase reversa em colunas com gradientes de eluição (GRYNKIEWICZ *et al.*, 2005), mas muitos pesquisadores contornam este problema pela realização de três tipos de hidrólise: básica, ácida ou enzimática, obtendo assim compostos mais facilmente quantificáveis (DELMONTE *et al.*, 2006). Na **Figura 6** é apresentado o efeito do tipo de hidrólise na obtenção dos derivados de isoflavonas.

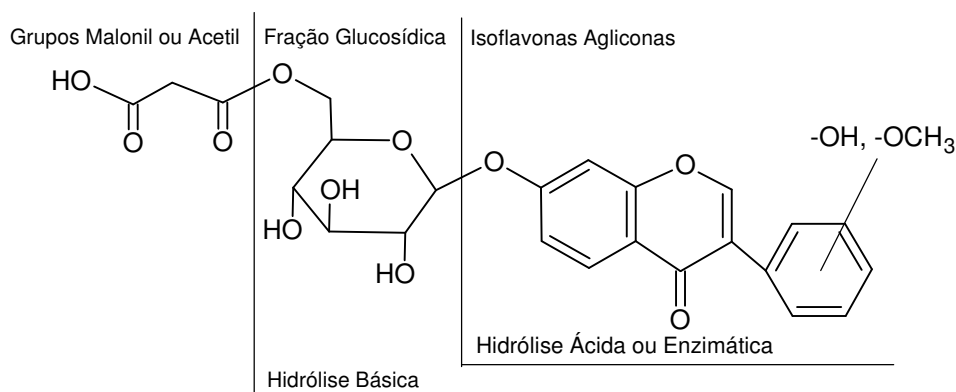


Figura 6: Esquema de hidrólises: básica, ácida e enzimática em derivados de isoflavonas (DELMONTE *et al.*, 2006).

A hidrólise básica quebra a ligação éster e remove os grupos ácidos (malonil ou acetil) ligados a isoflavona glucosídica, obtendo os respectivos β -glucosídeos. Já as hidrólises ácidas e enzimáticas quebram a ligação entre a isoflavona e a fração glucosídica, transformando todos os derivados de isoflavona em suas formas agliconas (DELMONTE *et al.*, 2006).

1.3.1. Extração simples

A extração de isoflavonas em grãos de soja e em seus derivados (tofu, carne, germen, farinha, bebidas, proteína texturizada, suplementos, etc), assim como em plantas (trevo vermelho) requerem o uso de solventes ou a mistura deles, diversos estudos encontrados utilizam-se de: acetronitrila-água, acetona-água, metanol-água e etanol-água, com estas soluções acidificadas ou não.

Para determinação da distribuição de isoflavonas em suas formas agliconas e glicosiladas em cereais à base de soja, Farmakalidis e Murphy (1985) utilizaram-se da extração com acetona:ácido clorídrico (0,1 mol.L⁻¹).

Peng e Ye (2006) analisaram o extrato em pó de trevo vermelho (2 g) e utilizaram 10 mL de etanol a 70% para extração durante 2 h em banho ultrassônico. Já Goes-Favoni e colaboradores (2004) acrescentaram 0,1% de ácido acético em etanol (70%) para extração de isoflavonas em vários produtos comerciais à base de soja. Heimler *et al.* (2004), também extraíram as isoflavonas de grãos de soja (100 mg) com 30 mL de etanol 70% durante uma noite, porém ajustaram o pH da solução para 2,0 com ácido fórmico.

Wang e Murphy (1994) realizaram a extração de isoflavonas em isolado protéico de soja com acetonitrila:ácido clorídrico - 0,1 mol.L⁻¹ (5:1), durante 2 horas à temperatura ambiente. Partindo desta mesma metodologia de extração, Kim *et al.* (2006) analisaram as isoflavonas totais em grãos de soja moídos. Já Song *et al.* (1998) relataram que a adição de água a esse sistema, na proporção 10:2:7 acetonitrila:ácido clorídrico (0,1 mol.L⁻¹):água, resultava em melhores recuperações.

Acouri e colaboradores (2005) testaram três diferentes solventes: acetonitrila aquosa (80%) com ácido clorídrico (0,1 mol.L⁻¹), metanol aquoso (80%) e etanol aquoso (80%). Amostras de carne de soja e proteína isolada da soja (2 g) foram dissolvidas em cada solvente e agitadas vigorosamente por 2 h a temperatura ambiente. De acordo com os resultados a extração com acetonitrila aquosa acidificada forneceu uma melhor seleção das isoflavonas, diminuindo os interferentes do extrato.

Outros autores afirmam que a extração de isoflavonas com metanol 80% é o melhor método a ser empregado. Como exemplo tem-se Irvine e colaboradores (1998) que extraíram isoflavonas de formulados infantis e cereais com metanol:água (8:2) durante 4 h sob agitação. De maneira similar, amostras de biscoitos e cereais de soja foram extraídas por Liggins *et al.* (2002) com 10 mL de metanol aquoso (4:1, v/v) em banho ultrassônico durante 15 min para quebra de material celular, mantendo em seguida as amostras sob repouso por uma noite no solvente. Ainda, Zhu e colaboradores (2005) analisaram 0,5 g de amostras de grãos de soja triturados, extraindo com 5 mL de metanol aquoso a 80%, sob agitação por duas horas à temperatura ambiente e centrifugaram por 10 min para obtenção do extrato contendo as isoflavonas.

Um estudo mais completo, comparando vários solventes para extração, foi realizado por Genovese e Lajolo (2001) que analisaram isoflavonas em amostras de farinhas desengorduradas de soja, isolados protéicos de soja e proteína texturizada de soja. Eles compararam a eficiência de extração, por 2 h com agitador mecânico e barra magnética de 1g de amostra em: a) acetonitrila:ácido clorídrico - 0,1 mol.L⁻¹ (5:1, v/v); b) acetonitrila:ácido clorídrico (0,1 mol.L⁻¹):água (10:2:7 v/v); c) acetona:ácido clorídrico -

0,1 mol.L⁻¹ (5:1, v/v); d) metanol aquoso a 70 e 80%; e) acetronitrila aquosa a 60 e 80%. Após os vários estudos conclui-se que o melhor solvente para extração seria o metanol a 80%, em termos de eficiência e praticidade. Quanto à eficiência das extrações realizadas com barra magnética ou com agitador mecânico não houve diferenças significativas.

1.3.2. Extração em fase sólida (EFS)

Alguns autores recorrem ao uso da extração em fase sólida (EFS) para uma pré-concentração do analito de interesse ou purificação dos extratos obtidos de matrizes complexas, ou ainda, como uma metodologia comparativa da eficiência entre as extrações.

Um dos primeiros estudos empregando a EFS com o uso de cartuchos C-18 (500 mg/6 mL – ICT, Vienna, Áustria) para análise de fitoestrogênios em grãos de soja é apresentado por Müllner e Sontag (1999). Inicialmente, o cartucho foi condicionado com 5 mL de metanol e 5 mL de água e, em seguida, foi carregado com 1 mL do extrato etanólico de isoflavonas previamente obtido. O cartucho foi então lavado com 2 mL de metanol a 20% para posterior eluição das isoflavonas com 5 mL de metanol 80%.

Com o intuito de obter uma melhor eficiência na extração e a concentração dos compostos isoflavônicos em produtos industrializados de soja, Genovese e Lajolo (2001) utilizaram cartuchos C18 (1g/6 mL – Tech Elut SPE, HPLC Technology Co. Ltd.). Partiram do pré-condicionamento deste cartucho com 20 mL de água e 60 mL de metanol, em seguida, foi feita a passagem do extrato aquoso isoflavônico obtido previamente. A eliminação de interferentes foi feita pela passagem de 20 mL de água, e após, a eluição foi realizada com 50 mL de metanol para análise de agliconas, ou com 50 mL de metanol:amônia (99,5:0,5), no caso de glicosil-derivados.

Grace e colaboradores (2003) realizaram a EFS para uma pré-concentração das isoflavonas agliconas contidas em amostras de urina após a hidrólise enzimática destas. Cartuchos C-18 (Phenomenex, Macclesfield, UK) foram condicionados com 1 mL de metanol seguido por 1 mL de metanol aquoso (5%), antes da aplicação da amostra (200 µL). O cartucho foi então lavado com 800 µL de metanol aquoso (5%) e as isoflavonas agliconas foram eluídas em 400 µL de acetato de etila:acetronitrila (1:1).

Kuo e Ding (2004) utilizaram-se de um sistema *manifold* acoplado com bomba a vácuo (VacMaster, IT Sorbent Technology, Cambridge, UK) para realização da EFS visando a análise de fitoestrogêneos em formulados infantis. O condicionamento do

cartucho C-18 foi feito com 3 mL de metanol e 3 mL de água deionizada. O extrato foi retido com um fluxo controlado entre 2-3 mL.min⁻¹ e após a extração completa o cartucho foi seco sob vácuo por 2 min. Os analitos foram então eluídos com 3 mL de metanol e o extrato seco com MgSO₄ antes da evaporação do solvente sob atmosfera de nitrogênio. Alguns estudos posteriores a estes são encontrados na literatura utilizando a EFS, mas com base nas condições descritas nestes já apresentados.

1.3.3. Hidrólise

Todas as extrações apresentadas até o momento permitem a determinação de isoflavonas na forma dos glicosil-derivados e agliconas originalmente presentes nas amostras. Porém, muitos autores apresentam em seus trabalhos o uso da hidrólise ácida ou enzimática, geralmente a hidrólise básica é descartada, pois o objetivo principal destes é a obtenção de isoflavonas em sua forma mais facilmente quantificável (forma aglicona).

Com este intuito, Franke e Custer (1996) extraíram isoflavonas de 1 g de soja tostada e homogeneizada utilizando 40 mL de etanol (96%) e 10 mL de ácido clorídrico (concentrado) com refluxo por 1 h. Irvine et al. (1998) testaram o método de hidrólise ácida desta mesma maneira, no entanto os alimentos de soja (2,5 g para amostras sólidas e 5 mL para amostra líquidas) foram refluxados por 2 h em 50 mL etanol:ácido clorídrico (4:1, v/v). Ainda partindo do método de Franke e Custer, amostras de alimentos (1 g) foram extraídas e hidrolisadas por Hutabarata *et al.* (2000) com etanol (96%) : ácido clorídrico (2 mol.L⁻¹) na proporção 4:1 (v/v) por 4 h sob refluxo a 100 °C.

O método de extração foi realizado de maneira diferente por Wang *et al.* (1990) e por Song *et al.* (1998) que preferiram hidrolisar as amostras de grãos de soja em ácido clorídrico (0,1 mol.L⁻¹) por 2 h sob refluxo (98 °C), para posteriormente extrair as isoflavonas agliconas com acetonitrila.

Genovese e Lajolo (2001) afirmaram que os melhores resultados seriam obtidos ao realizar a hidrólise das isoflavonas com ácido clorídrico (2 mol.L⁻¹) após sua extração em metanol ou etanol 80%. Ao analisarem seus resultados eles observaram que a hidrólise por 1 h havia sido insuficiente, devido à presença de genistina. Com o aumento do tempo de hidrólise para 2 h eles resolveram este problema, porém obtiveram um teor total de agliconas ainda menor. O fato ocorrido permitiu chegar à conclusão que as isoflavonas sofreram degradação térmica durante o processo de hidrólise.

Resultados similares foram relatados por Kudou *et al.* (1991) e Coward *et al.* (1998), concluindo que o aumento da temperatura altera a composição dos glucosil-derivados, com diminuição principalmente dos malonilglucosídeos e aumento concomitante dos β -glucosídeos.

Dessa forma, Genovese e Lajolo (2001) compararam o teor de agliconas totais obtido através da hidrólise do extrato e sem a hidrólise do extrato (convertendo os resultados das isoflavonas obtidas na forma dos glucosil-derivados em agliconas). Como resultado, o teor de isoflavonas agliconas totais foi menor com a realização da hidrólise, ainda observaram que a proporção entre daidzeína e genisteína após a hidrólise foi de 1:1,56, enquanto que na amostra não hidrolisada foi de 1:2,32, o que indica que o composto que se degrada com maior facilidade é a genisteína.

Wilkinson e colaboradores (2002) sugerem como alternativa à hidrólise enzimática com β -glucoronidase/aril sulfatase de *Helix pomatia*, ou com β -glicosidase de amêndoas, ou ainda, com um extrato bruto da celulose de *Aspergillus niger*. A utilização desta preparação com celulose tem sido sugerida como o método mais adequado e mais reprodutível quando comparados a hidrólise ácida.

Nurmi e colaboradores (2002) analisaram isoflavonas em comprimidos a base de soja e otimizaram sua extração dissolvendo 5-100 mg da amostra em 0,5 mL de água durante uma noite, após esse período a amostra foi submetida a hidrólise enzimática com 0,5 mL do reagente contendo 2500 unidades.mL⁻¹ de β -glucoronidase (*Helix pomatia*) em tampão acetato (0,3 mol.L⁻¹) pH 4,1 a uma temperatura de 60 °C por 2,5 h. De forma similar, Richelle *et al.* (2002) realizou a hidrólise enzimática do extrato de soja pela incubação deste com β -glucoronidase/sulfatase (*Helix pomatia*) por 2 h a 60 °C.

Amostras de plasma e urina foram hidrolisadas enzimaticamente *in vitro* por Moon e colaboradores (2006) para determinação de biochanina A e genisteína. As amostras foram precipitadas em metanol:acetonitrila (1:1) e centrifugadas. O sobrenadante foi evaporado (40 °C) sob nitrogênio e o produto seco foi redissolvido em tampão fosfato (0,05 M) pH 5,0 com 1000 unidades/mL de β -glucoronidase/sulfatase (*Helix pomatia*) por 90 min a 37 °C.

Park *et al.* (2001) utilizaram a hidrólise enzimática para determinação de isoflavonas agliconas em farinha de soja. Primeiramente a amostra foi dissolvida em água (1:1, m/v) e em seguida foi submetida à ação de enzimas fúngicas, como a β -glicosidase de *Aspergillus oryzae*, para fermentação durante um período de 48 h a 30 °C. Após a conversão foi feita a extração com metanol aquoso (80%). Além destes, muitos outros

trabalhos são encontrados utilizando-se da hidrólise enzimática de amostras de soja para análise das isoflavonas agliconas (LIGGINS *et al.*, 1998; XIE *et al.*, 2003; YANG *et al.*, 2009).

1.4. Análise de isoflavonas

Considerando os últimos vinte anos, os principais métodos utilizados para análise de flavonóides foram a cromatografia gasosa (CG), cromatografia em camada delgada (CCD) e também trabalhos envolvendo imunoensaios, mas nos anos recentes a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) retomou quase que completamente as análises e diversos trabalhos vêm sendo publicados até então (GRYNKIEWICZ *et al.*, 2005). A **Tabela 2** apresenta, de maneira resumida, uma diversidade de técnicas analíticas que hoje são comumente empregadas na análise de fitoestrogênios da classe das isoflavonas.

Tabela 2: Técnicas analíticas mais comuns para análise de fitoestrogênios da classe das isoflavonas em alimentos e em fluídos biológicos humanos.

TÉCNICAS	TIPOS
Cromatografia Gasosa/ Espectrometria de Massa	Monitoração Íon Seletiva/Diluição de Isótopo (ID-CG-MS-SIM) Monitoração Íon Seletiva (CG-MS-SIM)
Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	Detector Ultravioleta (HPLC-UV) Detector de Arranjos diodo (HPLC-DAD) Detector Eletroquímico (HPLC-ED) Detector Coulométrico Múltiplo (HPLC-coularray)
Cromatografia Líquida de Alta Eficiência/Espectrometria de Massa	Ionização por Eletronebulização (ESI) Ionização Química a Pressão Atmosférica (APCI)
Imunoensaios	Radioimunoensaio (RIA) Imunofluorimetria a Tempo Resolvido (TR-FIA) Método ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Fonte: WILKINSON *et al.*, 2002

1.4.1. Métodos cromatográficos

A cromatografia em camada delgada é recomendada pela Farmacopéia Brasileira para identificação de flavonóides em drogas vegetais e plantas medicinais, seguida da determinação de flavonóides totais por análise espectrofotométrica do complexo alumínio-flavonóide após a extração com metanol (MALESEV & KUNTIC, 2007).

A cromatografia gasosa, na determinação de fitoestrógenos em matrizes alimentares e biológicas, geralmente utiliza procedimentos que são precedidos pela hidrólise enzimática das amostras, seguida pela purificação em cartuchos C18, Sephadex LH20. As frações obtidas são então derivatizadas formando trimetilsilil derivados e estes são então separados por cromatografia a gás acoplado com espectrometria de massa. (KEY *et al.*, 2005; MORTON *et al.*, 1999; GRACE *et al.*, 2003).

A CLAE é mais usualmente empregada por apresentar como vantagem sobre os métodos de CG a determinação de todas as isoflavonas agliconas e glucoconjugadas e seus metabólitos, pois podem ser separados e analisados sem a necessidade de derivatização. Muitos trabalhos são encontrados utilizando a CLAE, dessa forma serão apresentados somente alguns destes estudos com o intuito de demonstrar as várias técnicas que têm sido utilizadas.

Key e colaboradores (2005) apresentaram métodos adequados para determinação de daidzeína e genisteína em alimentos, urina e plasma. Na análise em alimentos empregaram uma etapa de extração, seguido pelo CLAE com fase reversa acoplado com UV. Para a análise em matrizes biológicas eles utilizaram a hidrólise enzimática, seguido pela extração por fase sólida ou com solventes e separação por CLAE ou por CG com detector de espectrometria de massa (EM). Da mesma maneira, Franke e Custer (1996) determinaram os conteúdos de genisteína e daidzeína em leite humano após o consumo de soja pelo método de hidrólise enzimática com extração por acetato de etila, seguido de separação por CLAE usando detecção eletroquímica.

Careri e colaboradores (2007) apresentaram uma melhora no método de extração de isoflavonas agliconas em soja pela utilização de microondas, seguido da separação por CLAE-EM com ionização por “*electrospray*”. Além destes, muitos outros trabalhos têm utilizado CLAE para separação, identificação e quantificação de isoflavonas, como: Klejdus e colaboradores (2005) que utilizaram CLAE acoplada com UV-visível e DAD

“diode array detector” para determinação de isoflavonas em grãos de soja. Heimler e colaboradores (2004) realizaram análise quantitativa de isoflavonas em cinco cultivos diferentes de soja por CLAE-DAD e CLAE-EM, entre outros.

1.4.2. Métodos eletroquímicos

Poucos trabalhos foram encontrados utilizando técnicas eletroquímicas na análise de isoflavonas da soja. Deste modo, estes estudos são apresentados a seguir:

Escarpa e colaboradores (2007) determinaram o índice total de isoflavonóides realizando uma monitoração amperométrica à +1,0 V, com uma proposta de conceito de índice eletroquímico, com a desvantagem da não determinação individual desses isoflavonóides. Wu e colaboradores (2005) utilizaram-se da voltametria cíclica para análise do comportamento das isoflavonas, observando os diagramas de variações de pH dependente das oxidações irreversíveis, além da utilização da CLAE para determinação destes.

Os únicos trabalhos utilizando a redução eletroquímica das isoflavonas, daidzeína e genisteína, foram os apresentados por: Zhang *et al.* (2001) e Dong *et al.* (2003).

Zhang e colaboradores (2001) estudaram o comportamento polarográfico da genisteína e observaram que, em meio ácido, ocorre um processo de redução irreversível envolvendo 2 elétrons e 1 próton. Ainda, desenvolveram uma metodologia por polarografia derivativa de primeira ordem em eletrólito suporte de H_2SO_4 - $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ com solução de KCl de $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, em pH 1,0. Um intervalo linear de concentração foi obtido entre $2 \cdot 10^{-7}$ - $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, com limite de detecção de $8 \cdot 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$. Porém, a aplicação da metodologia só foi possível após isolar a genisteína de grãos de soja, isto é, os extratos obtidos das amostras tiveram que passar por uma coluna cromatográfica de amida polimérica de 80 mesh (80 x 3 cm) usando um gradiente com: água, 30% etanol e 50% etanol. Após a separação da isoflavona de interesse (genisteína) foi possível quantificá-la, portanto a metodologia não foi seletiva na presença das outras isoflavonas da soja. Este método desenvolvido foi validado por comparação com espectrofotometria ultravioleta.

Dong e colaboradores (2003) estudaram o comportamento voltamétrico da 4',7-dimetoxi-3'-isoflavona sulfônica de sódio (DISS; **Figura 7**) que é um composto sintetizado a partir da daidzeína com o intuito de aumentar a solubilidade desta em água e, consequentemente, a absorção pelo organismo. Para o estudo comportamental e

determinação foram utilizadas as técnicas de voltametria cíclica e voltametria de varredura linear, em solução tampão Britton-Robinson (pH 11,7), contendo $9,4 \cdot 10^{-6}$ mol.L⁻¹ de surfactante brometo de cetiltrimetilamônio (BrCTA). A corrente de pico derivativa de primeira ordem foi proporcional a concentração de DISS na escala de $5,0 \cdot 10^{-8}$ - $6,0 \cdot 10^{-7}$ mol.L⁻¹ ($r = 0,998$) e o limite de detecção foi de $1 \cdot 10^{-8}$ mol.L⁻¹. O método foi aplicado na determinação de DISS em amostras sintéticas.

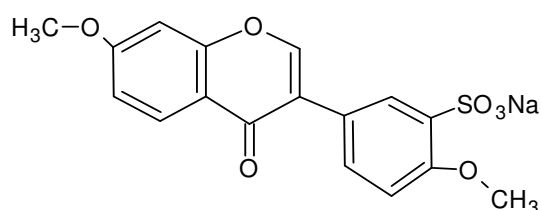


Figura 7: Estrutura da 4',7-dimetoxi-3'-isoflavona sulfônica de sódio (DISS).

1.5. Surfactantes

A particularidade estrutural de um surfactante é a região hidrofílica da molécula (ou o grupo cabeça polar) que pode ser positivo, negativo, neutro ou anfótero e a região hidrofóbica (ou cauda) que consiste de uma ou mais cadeias de hidrocarbonetos, geralmente com 6-22 átomos de carbono. Assim, eles também são chamados de anfifílicos, isto é, compostos tendo ambas as regiões polares e apolares na suas moléculas (VITTAL *et al.*, 2005; NITSCHKE, M. & PASTORE, 2002).

Em função da presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na mesma molécula, os surfactantes tendem a se distribuir nas interfaces entre fases fluídas com diferentes graus de polaridade (óleo/água e água/óleo). A formação de um filme molecular, ordenado nas interfaces, reduz a tensão interfacial e superficial, sendo responsável pelas propriedades únicas dos surfactantes (NITSCHKE, M. & PASTORE, 2002; SALAGER, 2002).

Estas propriedades fazem com que os surfactantes sejam adequados para uma ampla gama de aplicações: nas indústrias como função de detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, solubilização e dispersão das fases, flotação mineral, inibição de corrosão e em eletroquímica (VITTAL *et al.*, 2005; MANIASSO, 2001).

Quando a concentração de surfactantes solúveis é aumentada em água, propriedades físicas tais como condutividade e tensão superficial apresentam um formato descontínuo, essas descontinuidades indicam a formação de agregados dinâmicos de moléculas de

surfactantes, chamadas micelas. Para valores abaixo da concentração micelar crítica (CMC) os surfactantes encontram-se na forma de monômeros (VITTAL *et al.*, 2005). Valores de CMC para surfactantes comumente utilizados estão na faixa de 10^{-4} a 10^{-2} mol.L⁻¹. A adição de sais à solução normalmente diminuem o valor da CMC.

Acima da CMC, a estrutura micelar é considerada sendo esférica e cilíndrica. Em presença de água, sua estrutura apresenta-se com parte hidrofóbica voltada para o centro da micela, enquanto a cabeça (porção hidrofílica) é voltada para o solvente, contudo, a estrutura exata das micelas ainda é controversa (RUSLING, 1997; VITTAL *et al.*, 2005)

Quando os surfactantes são dissolvidos em solventes apolares formam agregados com a cauda em face com o solvente, são as chamadas micelas reversas (NITSCHKE, M. & PASTORE, 2002; SALAGER, 2002). As possíveis estruturas dos surfactantes citadas estão ilustradas na **Figura 8**.

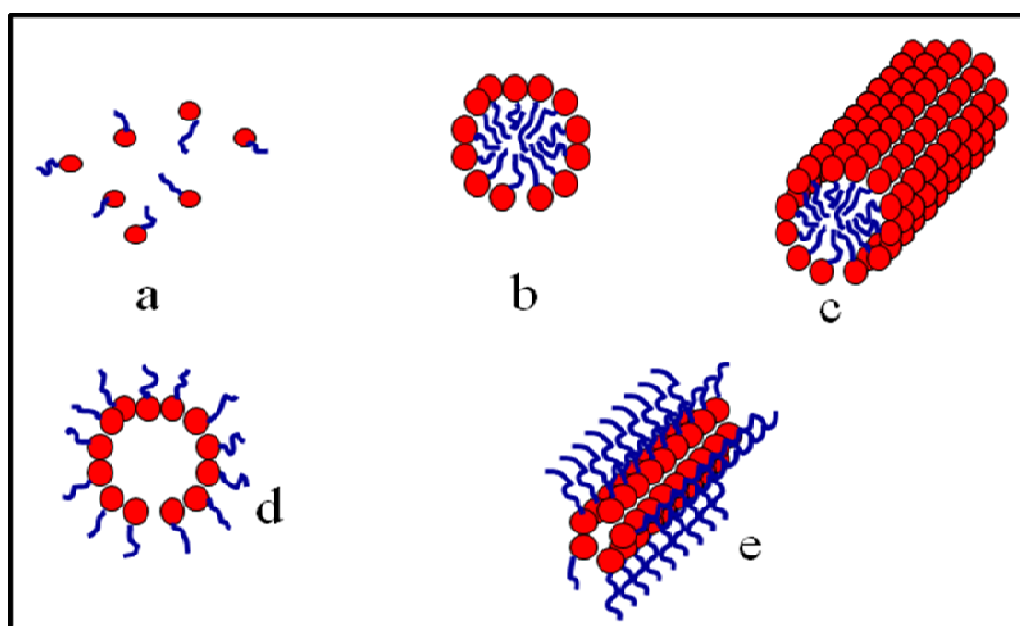


Figura 8: Estruturas de surfactantes: (a) monômeros, (b) micela esférica, (c) micela cilíndrica, (d) micela esférica reversa, (e) micela cilíndrica reversa.

1.5.1. Classificação dos surfactantes

A classificação bastante dos surfactantes é baseada na dissociação destes compostos em água. Esta classificação é apresentada resumidamente na **Tabela 3**.

Tabela 3: Classificação dos surfactantes de acordo com a dissociação em água.

TIPO	DESCRIÇÃO	EXEMPLOS
CATIÔNICOS	São dissociados em um cátion e um ânion (normalmente um halogênio). Uma grande porção dessa classe corresponde a compostos de nitrogênio, tal como amônio quaternário, com uma ou várias cadeias do tipo alquila.	Brometo de cetiltrimetil amônio (BrCTA) Brometo de dodeciltrimetil amônio (BrDTA) Cloreto de cetilpiridino (CICP)
ANIÔNICOS	São dissociados na forma de um ânion (parte hidrofóbica), e um cátion, o qual geralmente é um metal alcalino (Na^+ , K^+) ou amônio quaternário.	Dodecil sulfato sódico (DSS) Bis(2-etilhexil) sulfosuccinatosódico (Aerosol OT) Dihexadecil fosfato (DHF)
NÃO IÔNICOS	Não ionizam em solução aquosa, porque o seu grupo hidrofílico é de um tipo não-dissociável, tal como álcool, fenol, éter, éster, ou amida.	Polioxietileno (9-10) p-tercotil fenol (Triton X-100) Polioxietileno (23) dodecanol (brij 35)
ANFÓTEROS	São moléculas que se dissociam tanto em cátions, como ânions. É o caso de produtos sintéticos como betainas ou sulfobetainas e substâncias naturais tais como aminoácidos e fosfolípidos.	3-(dodecildimetil amônio) propano 1-sulfato (SB-12) 4-(dodecildimetil amônio) butirato (DAB)

Fonte (Adaptado): MANIASSO, 2001; SALAGER, 2002.

1.5.2. Uso de surfactantes em estudos eletroquímicos

As soluções de surfactantes têm encontrado muitas aplicações na eletroquímica. Em polarografia, por exemplo, surfactantes tais como Triton X-100 têm sido utilizados como agentes supressores de máximos polarográficos. No que diz respeito às aplicações modernas dos surfactantes, estes têm sido incluídos em sínteses eletroquímicas, catálise, decomposição de poluentes, análises e decomposição de filmes, dentre outros (RUSLING, 1997).

A presença de surfactantes em reações de transferência eletrônica, entre substâncias eletroativas e eletrodo, pode ter grande efeito na cinética da reação. No entanto, a maior influência dos surfactantes na velocidade de transferência eletrônica está relacionada ao bloqueamento dos eletrodos por estas moléculas ou as interações eletrostáticas entre

solutos e moléculas de surfactantes adsorvidas na superfície eletródica (SALAGER, 2002; RUSLING, 1997; VITTAL *et al.*, 2005)

A adsorção de surfactantes em eletrodos e a solubilização de compostos em agregados micelares pode significar variações no potencial redox, na corrente de pico, variação dos coeficientes de transferência de carga, nos coeficientes de difusão dos processos eletródicos, assim como a estabilização de intermediários eletrogerados (RUSLING, 1997; MEYER *et al.*, 1981)

1.6. OBJETIVOS

1.6.1. Geral

Determinar o conteúdo de daidzeína e genisteína em produtos de soja a partir do desenvolvimento de uma metodologia em eletrodo de gota pendente de mercúrio (HMDE) utilizando a técnica de VOQ.

1.6.2. Específicos

Para atingir o objetivo proposto, os seguintes objetivos específicos foram estabelecidos:

- ✓ Estudar o comportamento eletroquímico das isoflavonas, daidzeína e genisteína, separadamente e na presença de diferentes tipos de surfactantes;
- ✓ Estabelecer condições experimentais e parâmetros instrumentais para o desenvolvimento de método analítico que permita a determinação da daidzeína e da genisteína;
- ✓ Analisar as isoflavonas agliconas em produtos de soja contribuindo para o controle de qualidade;
- ✓ Validar a metodologia desenvolvida por análises comparativas com a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência.

2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

2.1. Especificações gerais dos reagentes e soluções

Para o preparo das soluções foram utilizados água ultra-pura obtida por um sistema de purificação Milli-Q Plus (Millipore) e reagentes de grau analítico.

As soluções padrões de daidzeína e genisteína (Acros Organic); daidzina e genistina (Sigma Aldrich) foram preparadas na concentração de $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, através da pesagem de quantidades da substância em questão, seguido da dissolução em etanol com seu volume aferido em um balão volumétrico de 10 mL. As soluções foram estocadas em vidro âmbar e mantidas sob refrigeração. As soluções de trabalho foram preparadas pela diluição da solução estoque em etanol quando necessário ou pela adição direta de alíquotas da solução estoque na célula eletroquímica.

As seguintes soluções dos tampões foram preparadas para uso como eletrólito suporte:

Tampão Britton-Robinson:etanol (8:2 – v/v): foram misturados ácido acético (Merck), ácido bórico (Merck) e ácido fosfórico (Merck) de forma a obter uma concentração de $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$. A diluição desta mistura foi feita com água ultra-pura:etanol na proporção 8:2 (v/v) e para o ajuste do pH utilizou-se de NaOH (Merck) $1,0 \text{ mol. L}^{-1}$.

Tampão acetato:etanol (8:2 – v/v): ácido acético $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ (Merck) foi diluído com água ultra-pura:etanol na proporção 8:2 (v/v) e o pH foi ajustado com NaOH (Merck) $1,0 \text{ mol. L}^{-1}$.

Tampão fosfato:etanol ou fosfato:metanol (8:2 – v/v): ácido ortofosfórico $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ (Merck) foi diluído com água ultra-pura:etanol ou água ultra-pura:metanol na proporção 8:2 (v/v) e o pH foi ajustado com NaOH (Merck) $1,0 \text{ mol. L}^{-1}$.

Tampão borato:etanol (8:2 – v/v): ácido bórico $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ (Merck) foi diluído com água ultra-pura:etanol na proporção 8:2 (v/v) e o pH foi ajustado com NaOH (Merck) $1,0 \text{ mol. L}^{-1}$.

As soluções dos surfactantes, catiônico brometo de cetiltrimetil amônio – BrCTA (Serva), aniônico lauril-dodecil sulfato de sódio (Sigma) e neutro Triton X-100 (Riedel-de-Haën) foram preparadas pela dissolução em água ultra-pura na concentração de 1% (m/v) e

alíquotas definidas destas soluções foram adicionadas na célula eletroquímica contendo o eletrólito suporte.

O reagente de Carrez utilizado durante o procedimento de extração é de grande importância para o tratamento e limpeza das amostras, pois ocasiona a precipitação de material coloidal, particularmente proteínas e polissacarídeos, que podem formar complexos com os compostos fenólicos (KY *et al.*, 1997). Ele é constituído de duas soluções:

Solução 1: solução de acetato de zinco (Laboratory Chemicals) 21,9% (m/v), contendo 3% (v/v) de ácido acético glacial (Merck), solubilizado em água.

Solução 2: solução 10,6% de ferrocianeto de potássio (Merck) solubilizado em água.

2.2. Especificações gerais dos equipamentos

As pesagens dos materiais foram realizadas em uma balança Sartorius R160, e para transferência das soluções e diluições apropriadas, foram utilizadas micropipetas HTL Série LABMATE. Já as medidas de pH foram realizadas em um titulador automático Titroline alpha (Shott), juntamente com um agitador magnético TM 125 Shott.

Um ultra-som UNIQUE modelo USC-1800A foi utilizado para a dissolução dos reagentes e amostras em geral. Ainda, para a extração em fase sólida utilizou-se de uma bomba (vácuo/pressão) da marca BARNANT – Modelo N° 420-3901, acoplado a um sistema *manifold* ALLTECH – Modelo N° 210351/12, conforme apresentado na **Figura 9**.

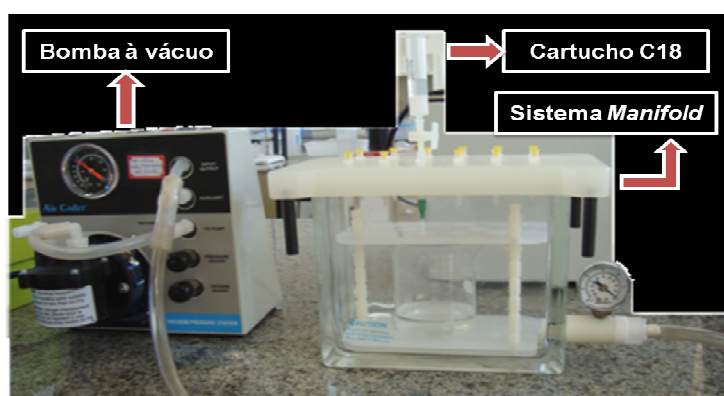


Figura 9: Sistema *manifold* acoplado com bomba à vácuo.

O potenciostato/galvanostato μ Autolab TYPE II (ECO CHEMIE BV) acoplado a um sistema de multi eletrodos Metrohm 663 VA Stand (**Figura 10**) foi utilizado para

obtenção das medidas eletroquímicas e a análise dos dados foi realizada em um software GPES. O eletrodo de trabalho foi utilizado tanto no modo eletrodo de gota pendente (HMDE) para medidas de Voltametria de Onda Quadrada (VOQ) e Voltametria de Pulso Diferencial (VPD), quanto no modo gotejante (área: $0,52 \text{ mm}^2$) para medidas de Polarografia de Pulso Diferencial (PPD); Ag/AgCl foi utilizado como eletrodo de referência e carbono vítreo como eletrodo auxiliar.



Figura 10: Potenciostato/galvanostato μ Autolab TYPE II (ECO CHEMIE BV) acoplado a um sistema de multi eletrodos Metrohm 663 VA Stand.

O cromatógrafo líquido da VARIAN ProStar equipado com bomba ternária ProStar 210 e detector UV-Vis ProStar 320 (Varian Inc., Melbourne, Austrália) foi utilizado para realização das análises comparativas de amostras comerciais de soja. A separação das isoflavonas foi realizada em uma coluna de fase reversa C18 OmniSpher ($5 \mu\text{m}$, $250 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$; VARIAN, Harbor City, CA, USA).

2.3. Amostras de produtos de soja

A aplicação da metodologia desenvolvida e a otimização dos estudos de extração foram feitas partindo-se de amostras de farinha de soja adquiridas em lojas de produtos naturais.

Após a escolha do melhor solvente para a extração, a metodologia desenvolvida foi também utilizada para quantificação de isoflavonas agliconas em dois medicamentos fitoterápicos, vendidos como extrato seco de gérmen de soja rico em isoflavonas:

- Marca A: contém 60 mg de isoflavonas totais em 150 mg do extrato de soja.
- Marca B: contém 50 mg de isoflavonas totais em 200 mg do extrato de soja.

2.3.1. Extração simples

Massas respectivas de cada amostra em estudo foram pesadas ($\approx 3,3$ g de farinha de soja, $\approx 0,25$ g do medicamento fitoterápico A, $\approx 0,015$ g do medicamento fitoterápico B) e solubilizadas em 20 mL de metanol a 80%. A esta solução foram adicionados 3 mL do reagente de Carrez (ver **seção 2.1.**) e a extração foi realizada durante 1 hora em banho ultrassônico.

O extrato obtido foi filtrado em papel de filtro qualitativo (Qualy, 205 μm) e o volume final foi ajustado com metanol (80%) em um balão volumétrico de 25 mL. Alíquotas apropriadas desta solução foram adicionadas à célula eletroquímica para análise e os resultados foram comparados por CLAE.

2.3.2. Extração em fase sólida

A extração em fase sólida (EFS) foi realizada em cartuchos prontos de fase reversa C18 de 1000 mg/6 mL (Applied Separations, cód. A-12007) acoplados a um sistema manifold com bomba a vácuo (**Figura 9**).

O procedimento utilizado para EFS foi descrito por Genovese e Lajolo (2001). Inicialmente foi realizada a extração das isoflavonas de maneira similar a extração simples apresentada (conforme **seção 2.3.1.**), porém massas diferentes das amostras foram utilizadas ($\approx 0,50$ g de farinha de soja, $\approx 0,16$ g do medicamento fitoterápico A, $\approx 0,0090$ g do medicamento fitoterápico B) e não foi adicionado o reagente de Carrez. O extrato metanólico com as isoflavonas foi colocado em capela para a evaporação total do metanol, seguida de uma diluição em 20 mL de água, obtendo-se o extrato aquoso.

Os cartuchos C18 foram pré-condicionados com 20 mL de metanol e 60 mL de água. A passagem do extrato aquoso foi feita em seguida, coletando a solução não retida para análise a fim de verificar se houve perdas das isoflavonas durante este processo. O cartucho foi então lavado com 20 mL de água para diminuir os interferentes e esta solução foi também coletada para análise. Por fim, a eluição das isoflavonas foi feita com 50 mL de metanol e concentrada em capela. O extrato isoflavônico obtido teve seu volume ajustado para 5 mL com metanol aquoso (80%) e foi submetido a análise pela metodologia desenvolvida e por CLAE.

2.4. Medidas eletroquímicas

Para a obtenção das medidas eletroquímicas foi introduzido um volume de 10 mL do eletrólito suporte na célula e desaerado por 10 min com N₂ para minimizar a presença de oxigênio em solução. Em seguida foi realizada uma varredura de potencial na direção negativa e obtendo-se o voltamograma ou o polarograma do branco.

Um volume definido de surfactante foi adicionado e desaerado por 10 s, registrando-se novas medidas polarográficas e voltamétricas no intervalo de potencial de trabalho adequado. Adições posteriores, das amostras e/ou dos padrões, foram realizadas de acordo com o estudo em questão.

2.5. Análise por CLAE

A validação do método por análises comparativas com a cromatografia líquida de alta eficiência (descrição do equipamento no **item 2.2.**) foi realizada no Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN-MS) pelo pesquisador Antonio Marcos Jacques Barbosa e as condições necessárias para uma boa separação das isoflavonas partiram da metodologia descrita por Song *et al.* (1998).

A fase móvel empregada foi um gradiente de solvente **A**: 0,1% de ácido acético glacial em água e solvente **B**: 0,1% de ácido acético glacial em acetonitrila. Após a injeção de 20 µL da amostra ou do padrão através da válvula injetora Rheodyne (Varian, Inc., Cotati, CA, E.U.A.), o solvente B foi mantido a 15% por 15 min, então foi aumentado para 29% até os 31 min, seguido de um aumento para 35% durante 8 min e retornando para 15% até os 45 min. A velocidade de fluxo do solvente foi de 1 mL.min⁻¹ durante os primeiros 5 min, aumentando para 1,5 mL.min⁻¹ durante 30 s e mantendo-se até o final nesta velocidade de fluxo. A detecção das isoflavonas foi realizada a 260 nm no detector UV-Vis (ProStar 320/Dynamax column). Os espectros de ultravioleta foram registrados e as áreas dos picos foram integradas por um software LC Workstation, versão 6.20.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As técnicas voltamétricas de voltametria de pulso diferencial (VPD), voltametria de onda quadrada (VOQ) e polarografia de pulso diferencial (PPD) foram avaliadas quanto a melhor resposta em relação à redução da daidzeína e genisteína. Para isto, foram estudados alguns parâmetros como: influência de pH e de surfactantes, velocidade de varredura, tempo de gotejamento, efeito do tempo e do potencial de deposição, efeito da frequência de aplicação dos pulsos, efeito da amplitude dos pulsos e a influência do incremento de pulso. A VOQ foi a técnica que apresentou uma melhor resposta para fins analíticos, como se observa na **Figura 11**, mesmo utilizando uma concentração de genisteína e daidzeína cerca de 100 vezes menor em relação às outras técnicas, a resposta voltamétrica apresentou picos bem definidos e adequadamente separados, além de ter promovido correntes de pico (I_p) mais elevadas, sendo então selecionada para os estudos posteriores.

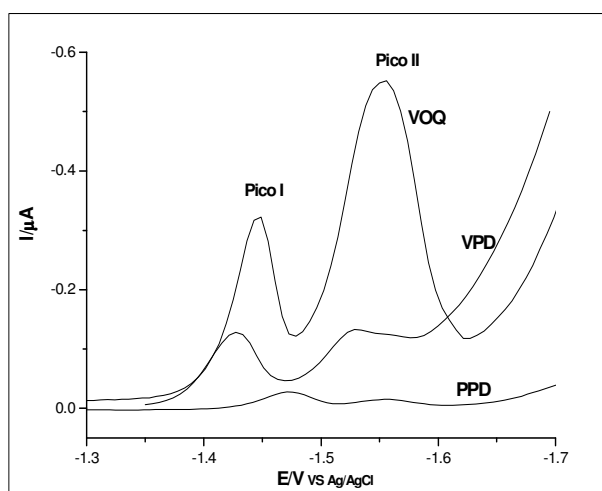


Figura 11: Voltamogramas de redução da daidzeína (Pico I) e genisteína (Pico II), em tampão fosfato:metanol (8:2, v/v), $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ – pH 7,5, na presença de $1,66 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de surfactante BrCTA, por diferentes técnicas voltamétricas. **PPD:** solução de daidzeína e genisteína na concentração de $1,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$. Parâmetros: intervalo de tempo = 0,5 s; tempo de modulação = 0,05 s; $v = 5 \text{ mV.s}^{-1}$; $a = 30 \text{ mV}$. **VPD:** solução de daidzeína e genisteína na concentração de $1,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$. Parâmetros: intervalo de tempo = 0,4 s; tempo de modulação = 0,05 s, $v = 5 \text{ mV.s}^{-1}$; $E_{sw} = 30 \text{ mV}$. **VOQ:** solução de daidzeína e genisteína na concentração de $1,0 \cdot 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$. Parâmetros: $t_{ac} = 50 \text{ s}$; $E_{ac} = 0 \text{ V}$; $\Delta E_s = 6 \text{ mV}$; $E_{sw} = 30 \text{ mV}$; $f = 100 \text{ Hz}$.

3.1. Estudo do comportamento voltamétrico da genisteína e da daidzeína por VOQ

3.1.1. Influência do pH do eletrólito suporte

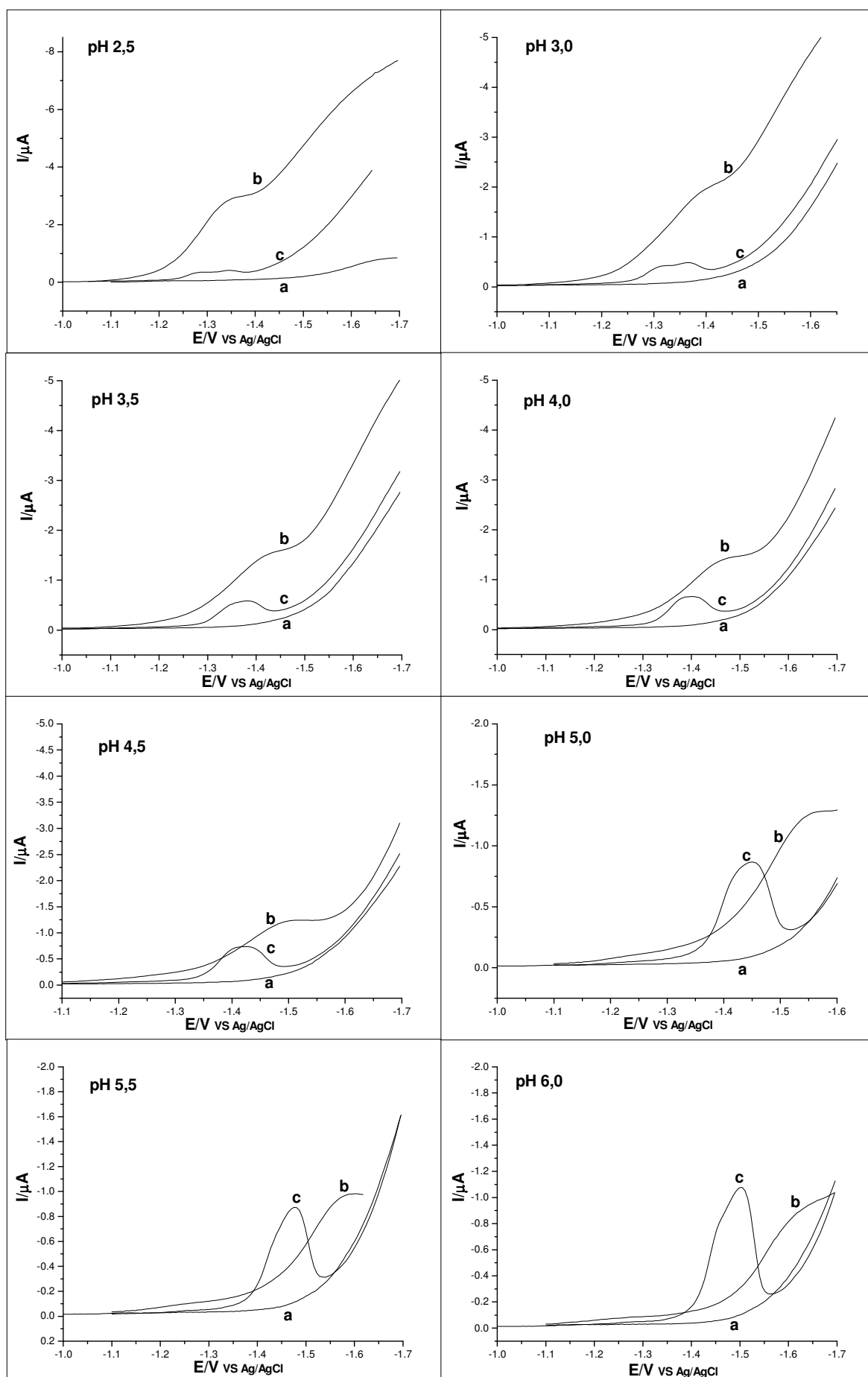
A escolha do eletrólito suporte é de suma importância para os estudos eletroquímicos, pois o eletrólito pode conferir algumas propriedades à solução e à interface. Tais propriedades são bastante amplas, como: mantém os coeficientes de atividade praticamente constantes, o número de transporte da espécie eletroativa aproximadamente zero, diminui a espessura da dupla camada elétrica, mantém a viscosidade e o coeficiente de difusão, além de em meio a solventes polares (orgânicos ou inorgânicos) incrementarem condutividade (AGOSTINHO *et al.*, 2004).

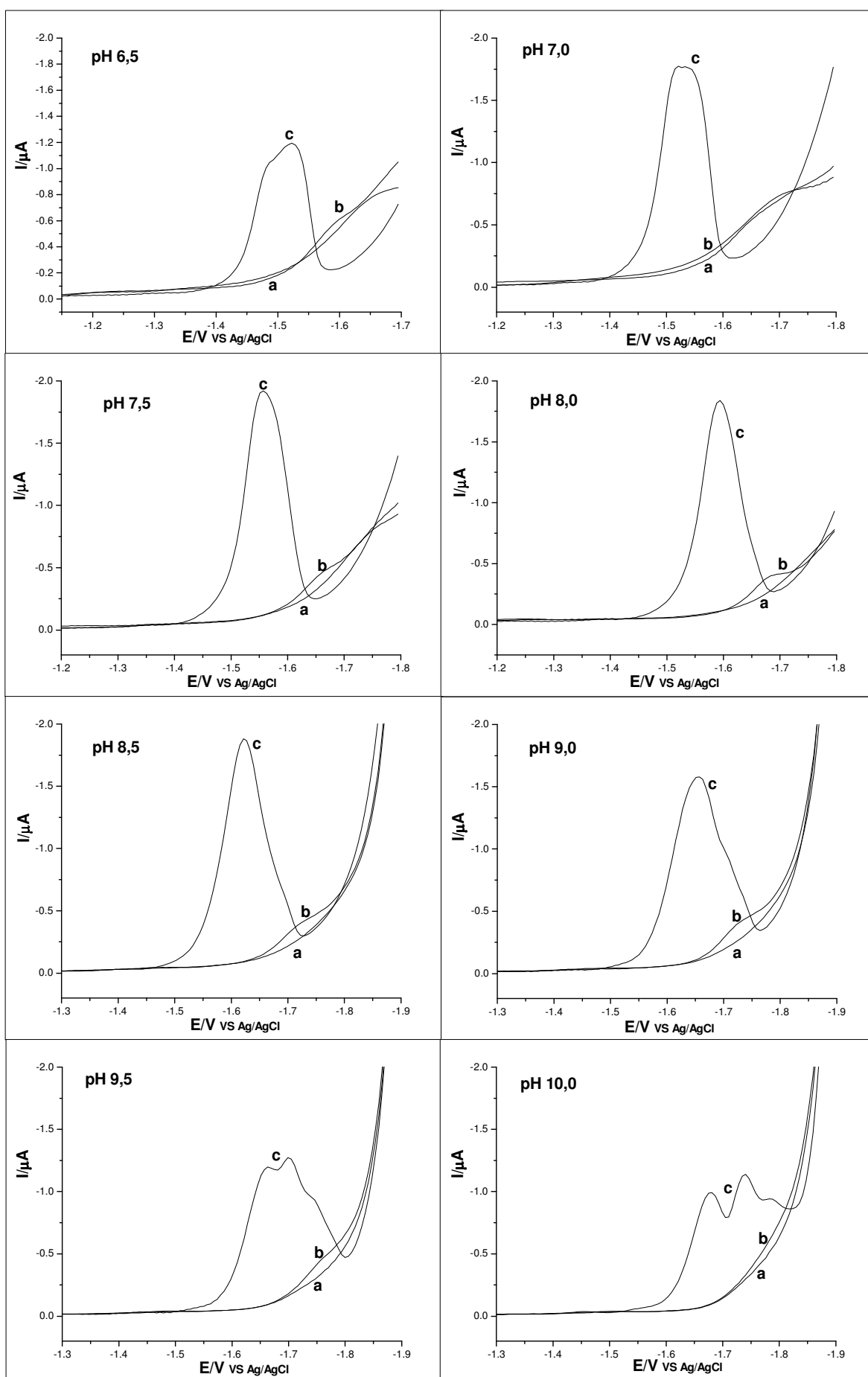
Dada a importância, alguns eletrólitos suportes foram estudados a fim de verificar o efeito do pH na redução da daidzeína e da genisteína, entre eles: tampão BR:etanol (8:2, v/v) – pH 2,5 a 11,0; tampão acetato:etanol (8:2, v/v) – pH 3,5 a 5,0; tampão fosfato:etanol (8:2, v/v) – pH 5,5 a 8,0; tampão fosfato:metanol (8:2, v/v) – pH 6,0 a 8,0; tampão borato:etanol (8:2, v/v) – pH 8,5 a 10,0; todos na concentração de 0,04 mol.L⁻¹. A diluição dos tampões com uma proporção de etanol ou metanol é devida à baixa solubilidade das isoflavonas agliconas em meio aquoso.

Os estudos de pH para a daidzeína e genisteína foram realizados na presença de surfactantes (brometo de cetiltrimetil amônio – BrCTA, lauril-dodecil sulfato de sódio - DSS e Triton X-100), pois os picos de redução destas isoflavonas se apresentam pouco definidos ou ausentes sem a adição de surfactantes impossibilitando a avaliação dos resultados.

3.1.1.1. Efeito do pH na redução da genisteína em presença de diferentes tipos de eletrólitos suporte

Inicialmente a redução da genisteína foi estudada em um intervalo amplo de pH de 2,5 a 11,0, em tampão BR:etanol (8:2, v/v), 0,04 mol.L⁻¹. A **Figura 12** mostra os voltamogramas de onda quadrada obtidos no estudo de pH utilizando uma solução de genisteína 1,9.10⁻⁵ mol.L⁻¹, com e sem a adição de surfactante BrCTA (1,9.10⁻⁴ mol.L⁻¹).





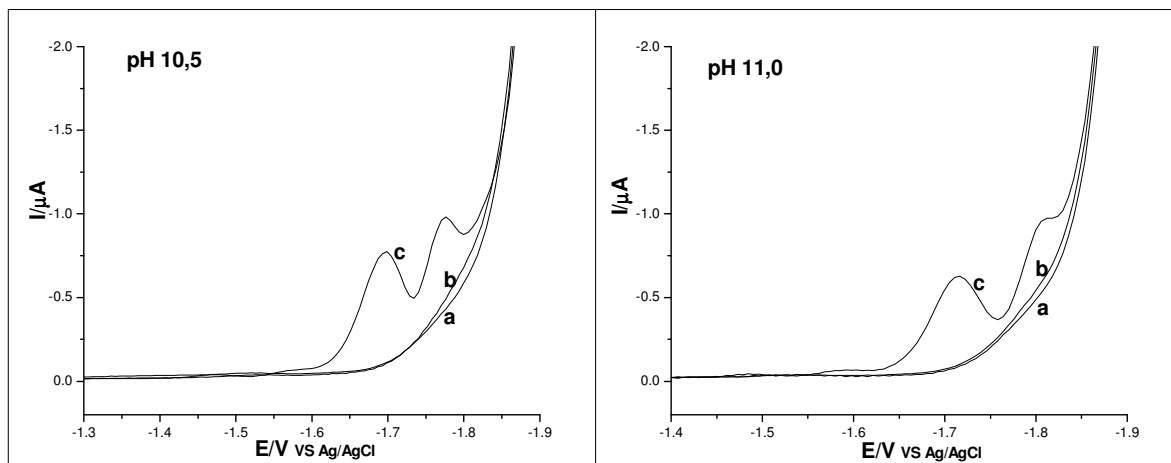


Figura 12: Voltamogramas de onda quadrada de redução da genisteína no intervalo de pH de 2,5 a 11,0, onde: (a) Branco – tampão BR:etanol (8:2, v/v), 0,04 mol.L⁻¹; (b) solução de genisteína, 1,9.10⁻⁵ mol.L⁻¹; (c) adição de 1,9.10⁻⁴ mol.L⁻¹ de surfactante catiônico BrCTA.

Na presença do surfactante BrCTA, observa-se através dos voltamogramas (**Figura 12**, voltamogramas **c**) a formação de dois picos de redução da genisteína em meio fortemente ácido (pH 2,5 e 3,0), com a formação gradual de apenas um pico de redução a medida que se aumentam estes valores de pH (entre 3,5 e 8,5). A partir do pH 8,5 é possível notar um decaimento significativo da I_p , juntamente com a formação de um segundo pico de redução que torna-se mais definido em meio fortemente básico (pH 10,5 e 11,0).

Ainda, sem a adição de BrCTA (**Figura 12**, voltamogramas **b**) evidencia-se a resposta de redução da genisteína, em alguns valores de pH, pela presença de picos pouco definidos e próximos a descarga do eletrólito, isto ressalta a importância do uso de surfactantes neste estudo. A resposta do potencial de pico (E_p) e corrente de pico (I_p) de redução da genisteína na presença de BrCTA, devido a variação do pH, pode ser melhor visualizada nas **Figuras 13 A e B**.

A análise da **Figura 13 A** mostra que os potenciais de pico deslocam-se linearmente na direção catódica com o aumento do pH do meio, este comportamento pode ser atribuído a existência de uma reação de pré-protonação acoplada ao processo de transferência eletrônica (VAZ *et al.*, 1996; ZUMAN, 1972).

Além disso, o gráfico de E_p versus pH, apresenta segmentos lineares de diferentes inclinações, onde as abscissas dos pontos de intersecção desses segmentos refletem as mudanças na protonação dos grupos hidroxilas presentes na genisteína e, portanto, correspondem aos valores de pK_a do composto em estudo (HEYROVSKÝ & VAVRICKA,

1972; ZIELONKA *et al.*, 2003). Os três segmentos lineares encontrados para a influência do pH no potencial de pico de redução da genisteína através da VOQ são apresentados na **Tabela 4**.

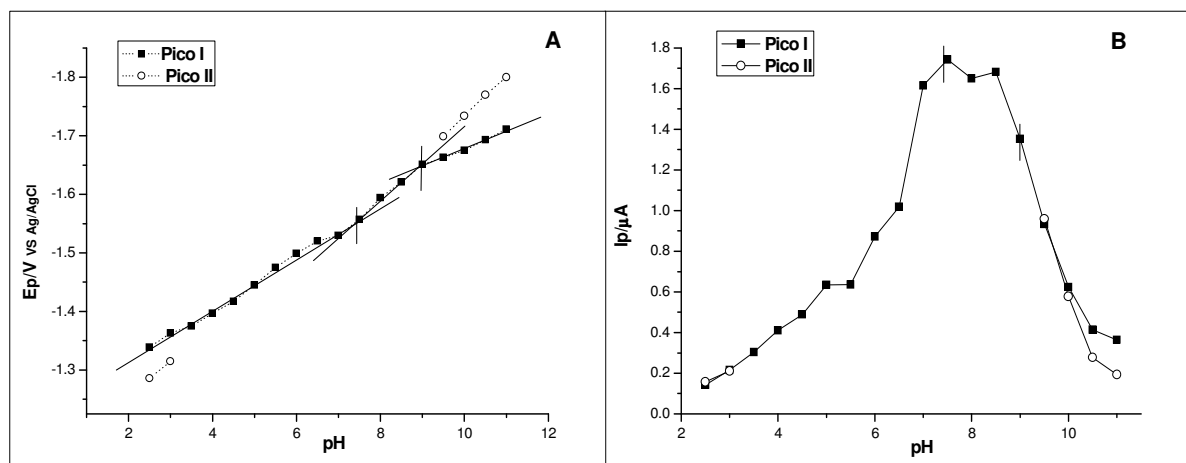


Figura 13: (A) Variação do E_p de redução de genisteína em função do pH do meio. (B) Variação da I_p de redução de genisteína em função do pH do meio. Eletrólito suporte: tampão BR:etanol (8:2, v/v) - $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$, na presença de $1,9 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de surfactante catiônico BrCTA.

Tabela 4: Dados obtidos para regressão linear dos três segmentos apresentados no estudo da influência do pH sobre o E_p de redução da genisteína através da VOQ.

Intervalo de pH	$Y = a + bx^{(a)}$	$r^{(b)}$
2,5 – 7,0	$1,218 + 0,046 \cdot \text{pH}$	0,992
7,0 – 9,0	$1,101 + 0,061 \cdot \text{pH}$	0,998
9,0 - 11,0	$1,353 + 0,032 \cdot \text{pH}$	0,992

^(a) equação linear.

^(b) coeficiente de correlação.

Na literatura são reportados alguns estudos que procuram desvendar a sequência de desprotonação de polihidroxiflavonas e todos estão em concordância que a desprotonação ocorre, em ordem crescente, nos grupos hidroxilas: 7-OH, 4'-OH e 5-OH (SLABBERT, 1977; AGRAWAL & SCHNEIDER, 1983; LEMAŃSKA *et al.*, 2001).

Zielonka e colaboradores (2003) propõem os equilíbrios de desprotonação para genisteína conforme é apresentado na **Figura 14**. A molécula GenH_3 sofre a primeira reação de desprotonação levando ao correspondente monoânion GenH_2^- , seguida da

segunda desprotonação gerando o diânion GenH^{2-} e, por fim, a terceira desprotonação formando o triânion Gen^{3-} .

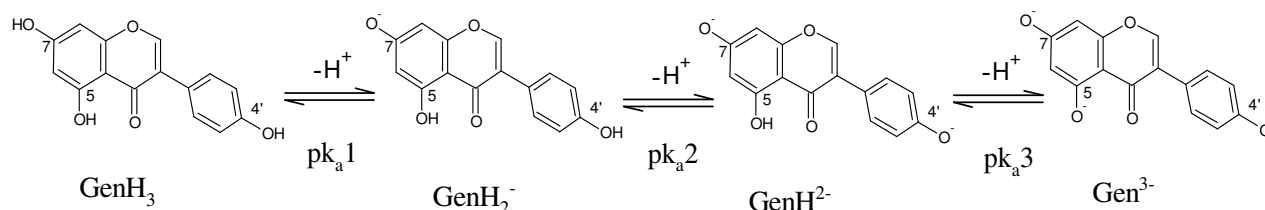


Figura 14: Esquema de desprotonação da genisteína (ZIELONKA *et al.*, 2003).

Esta sequência de desprotonação foi comprovada por resultados obtidos através de cálculos DFT que prevêem a energia de desprotonação da molécula em vários sítios (ZIELONKA *et al.*, 2003). Na **Tabela 5** são apresentados os valores de pK_a e de energia de desprotonação propostos pela literatura em comparação com os valores de pK_a obtidos experimentalmente por VOQ para a genisteína.

Tabela 5: Valores de pK_a e energia de desprotonação para a genisteína abordados na literatura em comparação com valores de pK_a obtidos por VOQ.

Espécies	Grupo	LITERATURA ^(*)		VOQ
		Energia de Desprotonação (kcal.mol ⁻¹)	pK_a	pK_a
Genisteína – forma neutra	5-OH	353,2		
	7-OH	335,0	7,2	7,4
	4'-OH	344,0		
Genisteína (7)-monoânion	5-OH	440,7		
	4'-OH	393,3	10,0	9,0
Genisteína (7,4')-diânion	5-OH	492,7	13,1	—

(—) não foi obtido experimentalmente.

(*) Referência - ZIELONKA *et al.*, 2003.

Como observado, através do estudo da influência do pH *versus* E_p , só foi possível obter os dois primeiros valores de pK_a da genisteína, sendo que o pK_{a1} apresenta-se em maior concordância do que o pK_{a2} em relação aos valores citados pela literatura.

Ainda, nota-se que os valores de pK_a da genisteína obtidos experimentalmente são menores que os reportados para este composto em solução aquosa (ver **Tabela 5**). Isto pode estar relacionado com a presença do surfactante BrCTA no meio, pois de acordo com estudos de interação da puerarina (isoflavona análoga a genisteína) com micelas catiônicas (XI & GUO, 2008), pode ocorrer um deslocamento no equilíbrio ácido-base com o aumento da concentração de surfactante no meio facilitando a formação de espécies mais desprotonadas, obtendo assim, menores valores de pK_a .

Avaliando a influência do pH sobre a resposta de corrente de pico da genisteína (**Figura 13 B**), observou-se um aumento gradual de I_p até alcançar valores máximos em torno de pH 7,0 até pH 8,5. Estes valores máximos de corrente estão relacionados, provavelmente, com a primeira desprotonação da genisteína que ocorre em torno de pH 7,4 e facilita a forte interação do cátion cetiltrimetil amônio com as espécies aniônicas formadas e, que consequentemente, se adsorvem sobre a superfície do eletrodo de Hg.

O mecanismo de redução da genisteína e de outras isoflavonas análogas sobre a superfície eletródica de Hg tem sido proposto por alguns autores (ZHANG *et al.*, 2001; DONG *et al.*, 2003; HU & LI, 1995).

Zhang e colaboradores (2001) estudaram o comportamento eletroquímico da genisteína e afirmaram que ocorre um processo de adsorção irreversível, onde o composto sofre a pré-protonação no grupo carbonila ($C=O$), seguida pela adsorção sobre a superfície eletródica. No eletrodo, a espécie adsorvida passa pela primeira etapa de redução envolvendo $1 e^-$ para formar um radical livre neutro. A segunda etapa consiste na redução de $1 e^-$ do radical livre e a adição de um próton H^+ estabilizando o composto formado. As reações envolvidas neste processo estão apresentadas na **Figura 15**.

Através deste mecanismo apresentado, pode-se desvendar uma das possibilidades do decaimento brusco da I_p de genisteína a partir de pH 8,5, pois em meio fortemente básico a disponibilidade de prótons é reduzida, de forma que prejudique o processo de pré-protonação necessário para a redução da genisteína (LUND & HAMMERICH, 2001).

Outro fator de importante destaque é que para valores de pH acima de 8,0, é observado um comportamento de oxidação dos grupos hidroxilas de compostos fenólicos (LAMY *et al.* 1995), isto pode influenciar também no decréscimo de I_p pela estabilização dos grupos ionizados e dificuldade de interação com o surfactante BrCTA, em meio fortemente alcalino.

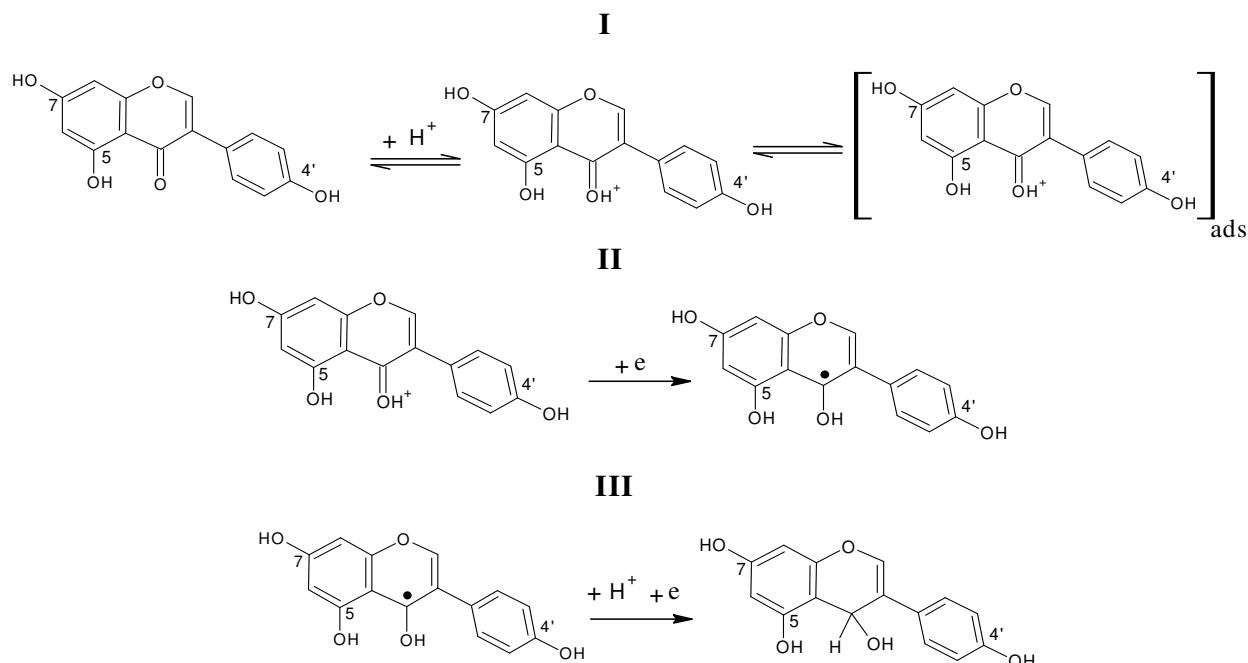


Figura 15: Mecanismo de redução da genisteína sobre a superfície eletródica (Adaptado de ZHANG *et al.*, 2001).

Dando continuidade ao desenvolvimento da metodologia, procurou-se definir um valor ótimo de pH para fins analíticos, portanto, foram considerados fatores como a definição, a altura e o potencial de pico da genisteína.

Os maiores valores de I_p e a melhor definição de pico foram proporcionados pelos pHs 7,5 e 8,0. No entanto, o E_p de redução da genisteína em pH 7,5 ($E_p = -1,55$ V vs Ag/AgCl) encontrou-se mais afastado da descarga do eletrólito que em pH 8,0 ($E_p = -1,59$ V vs Ag/AgCl), e sabe-se que um alto E_p comprometeria a análise do composto na presença da amostra, em virtude do efeito de matriz que normalmente antecipa a descarga do eletrólito suporte. Portanto, optou-se por utilizar o pH 7,5 nos estudos posteriores.

Outros eletrólitos suporte foram também estudados quanto a influência na redução da genisteína em presença do surfactante BrCTA. A **Figura 16** apresenta uma comparação da variação de I_p em função do pH do meio para os diferentes eletrólitos: tampão BR:etanol (8:2, v/v) - pH 2,5 a 11,0; tampão acetato:etanol (8:2, v/v) - pH 3,5 a 5,0; tampão fosfato:etanol (8:2, v/v) - pH 5,5 a 8,0; tampão borato:etanol (8:2, v/v) - pH 8,5 a 10,0 e tampão fosfato:metanol (8:2, v/v) - pH 6,0 a 8,0.

De maneira similar aos resultados com o tampão BR:etanol (8:2, v/v), que apresentaram valores máximos de I_p em pH 7,5 e 8,0 com boa definição de pico, o tampão fosfato:etanol (8:2, v/v) e o tampão fosfato:metanol (8:2, v/v) propiciaram ainda um aumento de I_p nestes pHs. Na **Figura 17** pode-se visualizar os voltamogramas de redução

da genisteína em pH 7,5 (selecionado para fins analíticos) comparando os eletrólitos estudados.

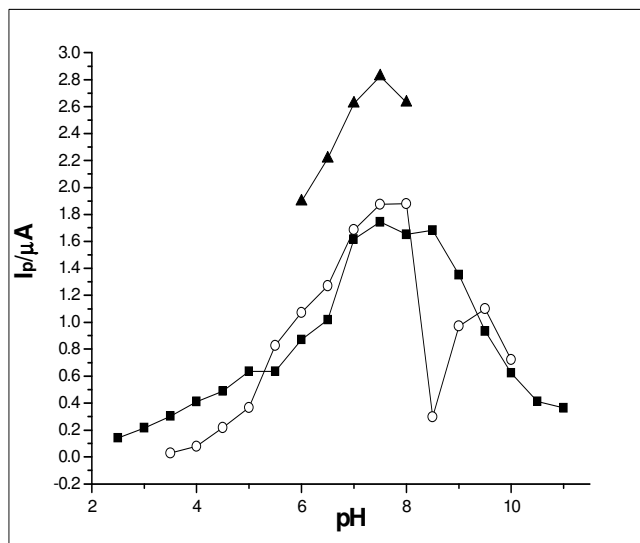


Figura 16: Variação de I_p para a redução de uma solução de genisteína ($1,9 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) em função do pH do meio, na presença de $1,9 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de surfactante catiônico BrCTA. (—■—) Tampão BR:etanol (8:2, v/v), pH de 2,5 a 11,0. (—○—) Tampão acetato:etanol (8:2, v/v) – pH 3,5 a 5,0; tampão fosfato:etanol (8:2, v/v) – pH 5,5 a 8,0; tampão borato:etanol (8:2, v/v) – pH 8,5 a 10,0. (—▲—) Tampão fosfato:metanol (8:2, v/v) – pH 6,0 a 8,0. Todos os eletrólitos suporte na concentração de $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$.

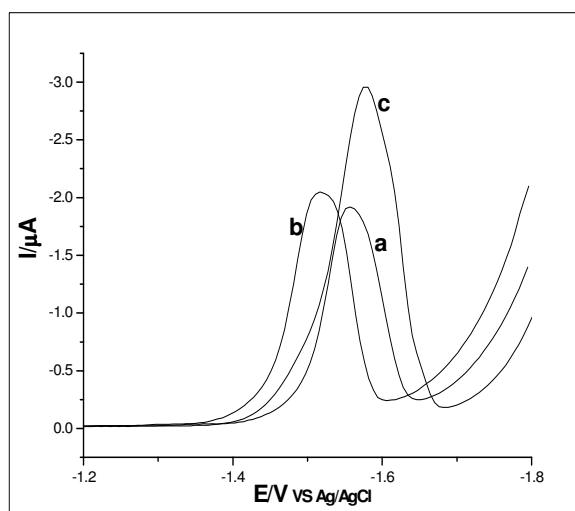
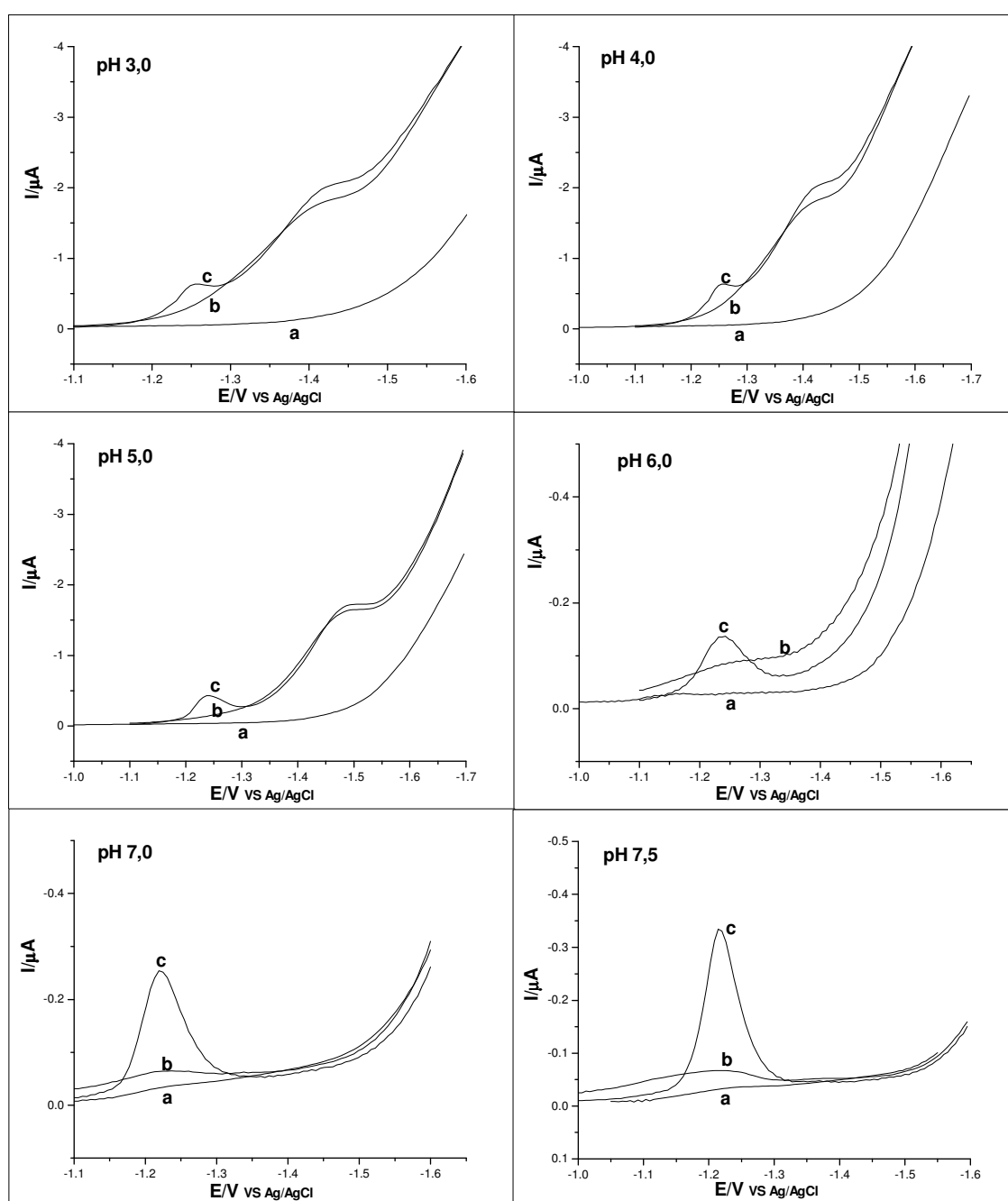


Figura 17: Voltamogramas de onda quadrada de redução da genisteína ($1,9 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$), na presença de $1,9 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de surfactante BrCTA, para diferentes eletrólitos suporte em pH 7,5, onde: (a) Tampão BR:etanol (8:2, v/v), $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$; (b) Tampão fosfato:etanol (8:2, v/v), $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$; (c) Tampão fosfato:metanol (8:2, v/v), $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$.

3.1.1.2. Influência de diferentes tipos de surfactantes na redução da genisteína

Até o momento, os estudos de pH foram realizados em presença do surfactante catiônico BrCTA mostrando-se de fundamental importância para a redução da genisteína. A influência do surfactante aniônico DSS ($4,1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) foi também avaliada com a variação de pH no intervalo de 3,0 a 10,0 em tampão BR:etanol (8:2, v/v), $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ com o intuito de otimizar a resposta voltamétrica. Os voltamogramas obtidos neste estudo são apresentados na **Figura 18**.



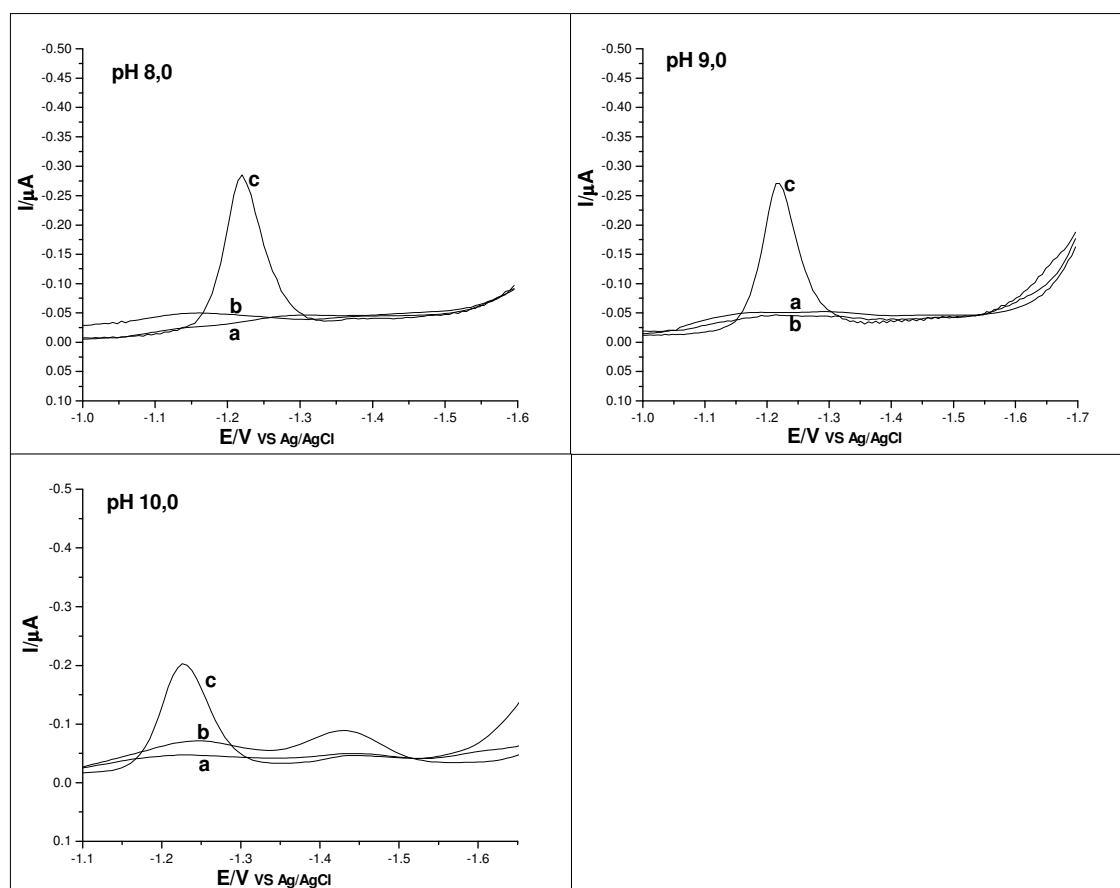
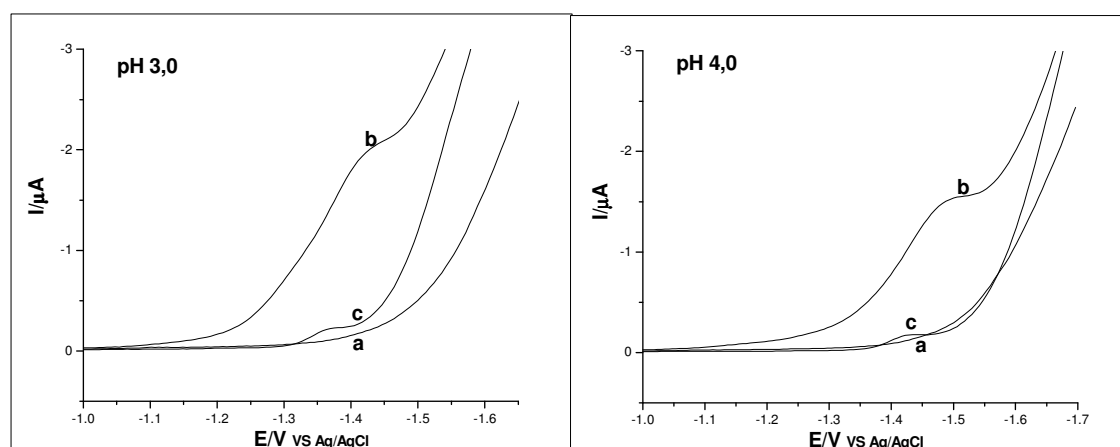


Figura 18: Voltamogramas de onda quadrada de redução da genisteína no intervalo de pH de 3,0 a 10,0, onde: (a) Branco – tampão BR:etanol (8:2, v/v), 0,04 mol.L⁻¹; (b) solução de genisteína 1,9.10⁻⁵ mol.L⁻¹; (c) adição de 4,1.10⁻⁴ mol.L⁻¹ de surfactante aniônico DSS.

Da mesma forma foi realizado o estudo com o surfactante neutro Triton X-100, variando os valores de pH entre 3,0 e 10,0, tendo como eletrólito suporte tampão BR:etanol 0,04 mol.L⁻¹ (8:2, v/v). Os voltamogramas obtidos para alguns valores de pH podem ser verificados na **Figura 19** abaixo.



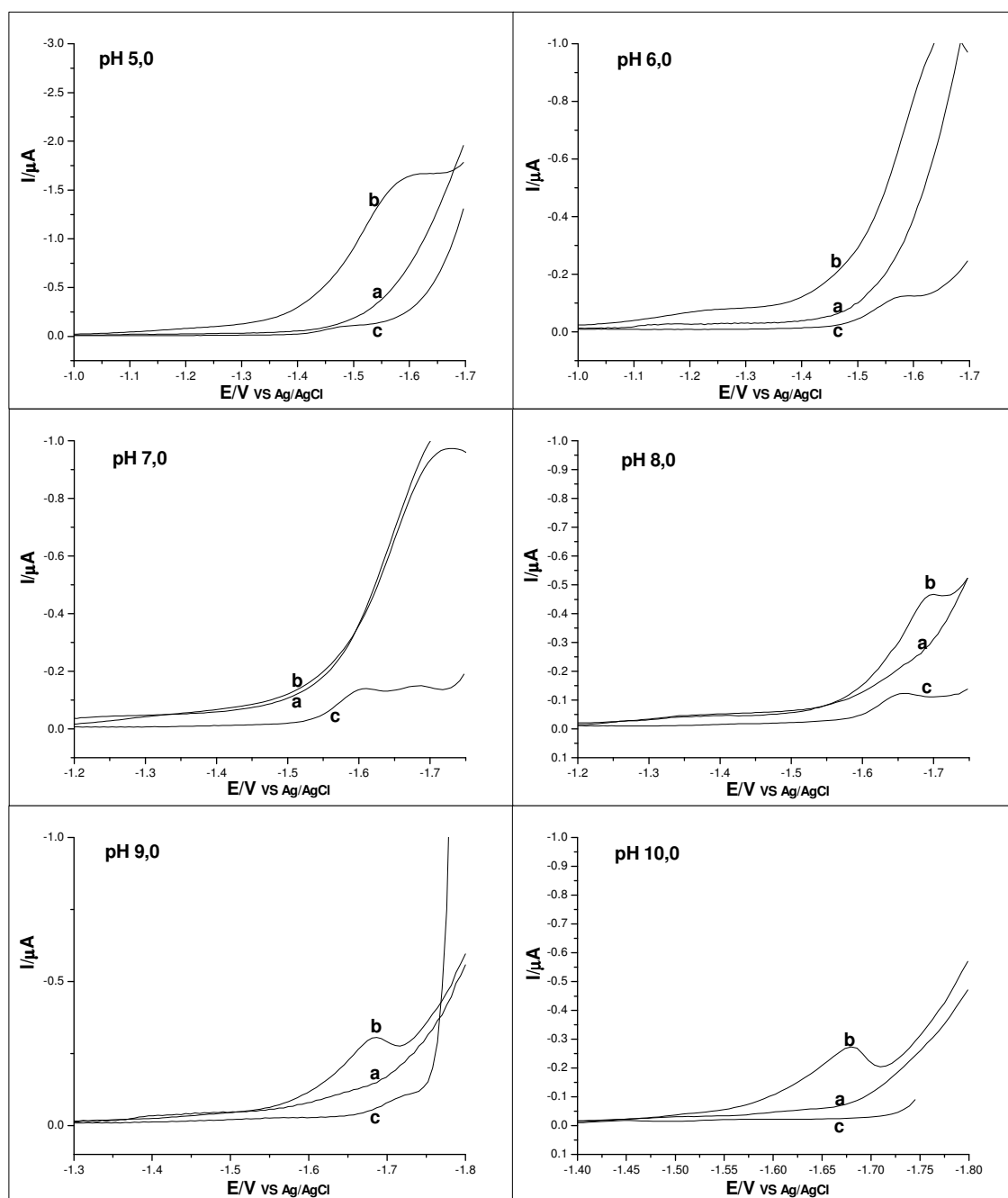


Figura 19: Voltamogramas de onda quadrada de redução da genisteína no intervalo de pH de 3,0 a 10,0, onde: (a) Branco – tampão BR:etanol 0,04 mol.L⁻¹ (8:2, v/v); (b) solução de genisteína 1,9.10⁻⁵ mol.L⁻¹; (c) adição de 2,3.10⁻³ mol.L⁻¹ de surfactante neutro Triton X-100.

O uso do surfactante neutro Triton X-100 não contribuiu satisfatoriamente para o processo de redução da genisteína (**Figura 19**), este comportamento provavelmente ocorre devido à adsorção do surfactante neutro na superfície eletródica, dificultando a redução da genisteína e deslocando o E_p para valores muito negativos.

Diferentemente, os voltamogramas obtidos de redução da genisteína para alguns valores de pH com a adição dos surfactantes BrCTA e DSS (**Figuras 12 e 18**, respectivamente) resultaram em picos bem definidos, com um aumento da I_p , além de promoverem um deslocamento favorável do potencial de pico (E_p). Dessa forma, uma comparação entre os valores de I_p em função do pH do meio para ambos os surfactantes foi realizada e pode ser observada na **Figura 20**.

Os valores de I_p , após a adição de surfactante BrCTA, foram significativamente maiores que os obtidos com o surfactante DSS, o que é um fator importante, pois em estudos posteriores permitirá alcançar menores limites de detecção e quantificação.

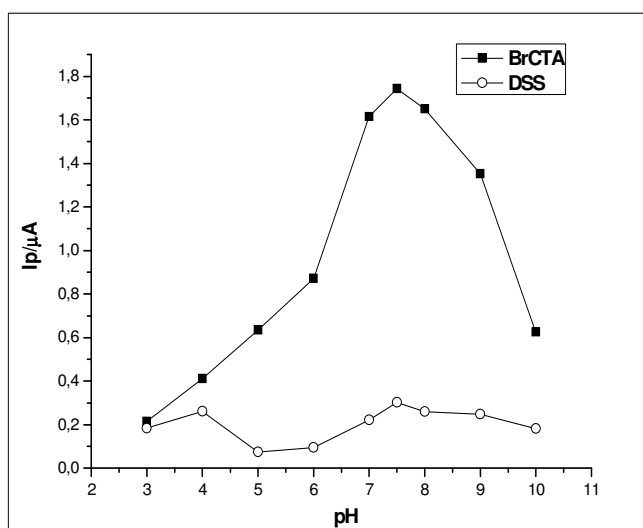
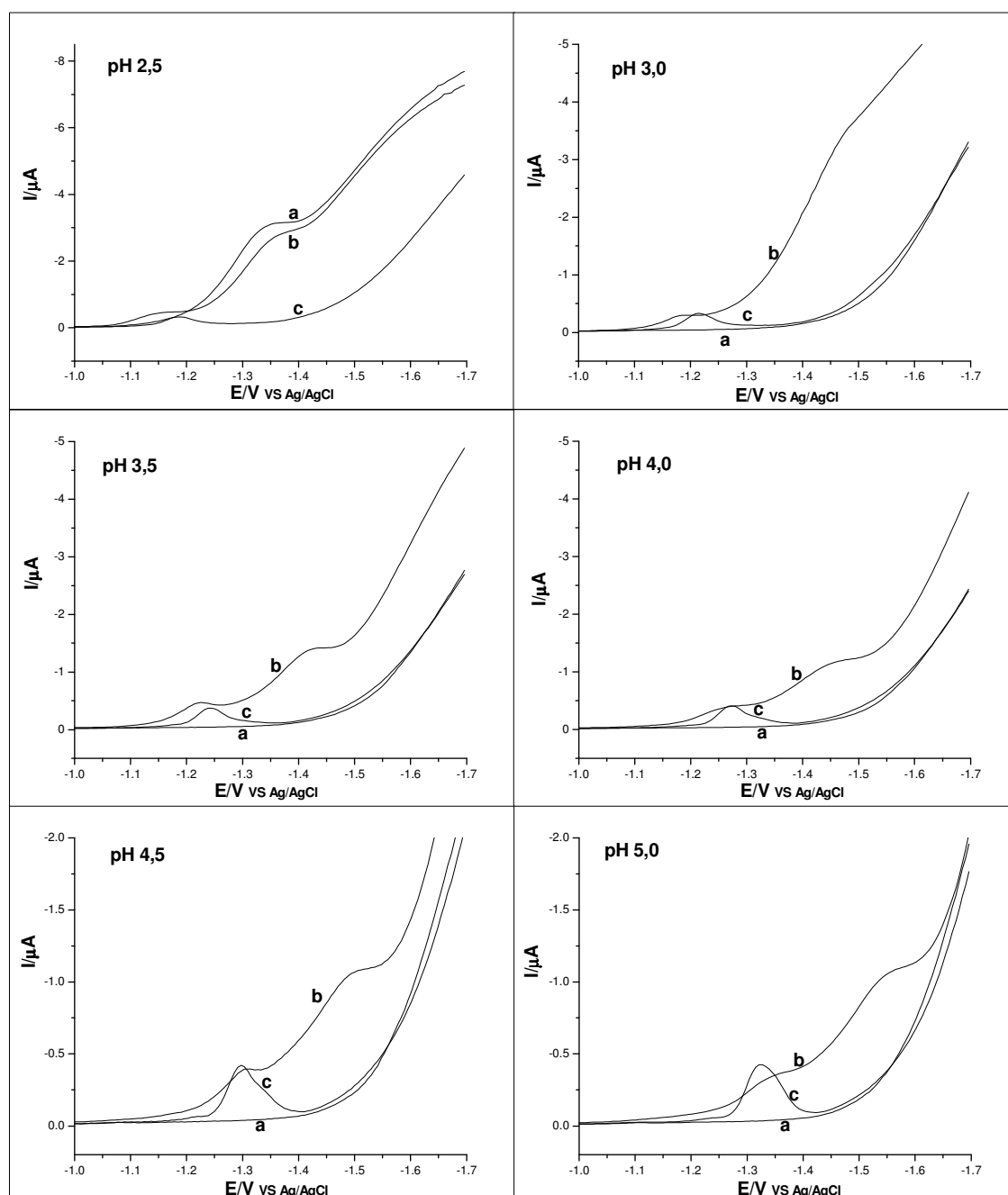
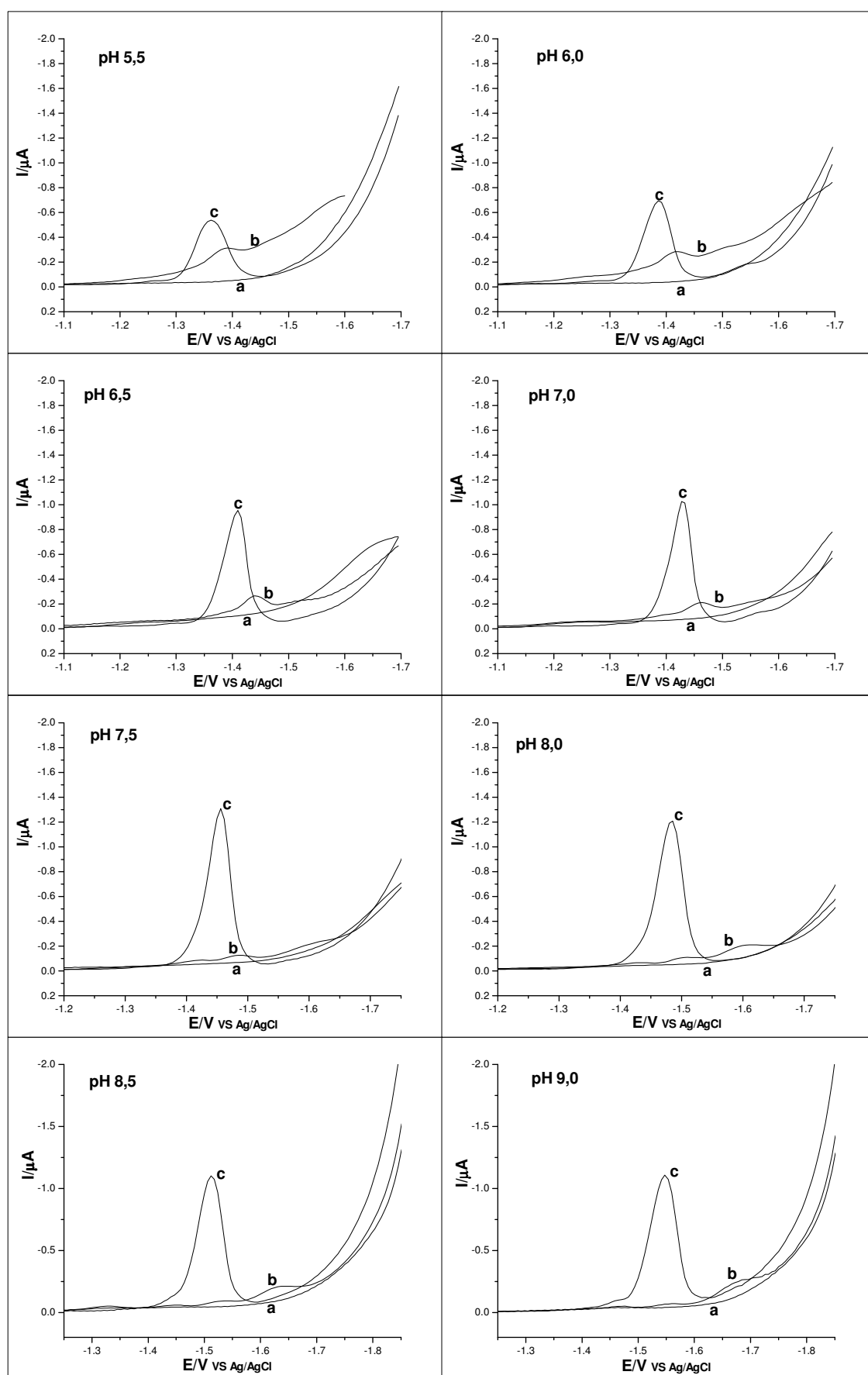


Figura 20: Variação de corrente de pico de redução de uma solução de genisteína ($1,9 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) em função do pH do meio. (—■—) Na presença de $1,9 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de surfactante catiônico BrCTA. (—○—) Na presença de $4,1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de surfactante aniônico DSS. Eletrólito suporte: tampão BR:etanol (8:2, v/v), $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$.

3.1.1.3. Efeito do pH na redução da daidzeína em presença de diferentes tipos de eletrólitos suporte

O estudo do comportamento de redução da daidzeína iniciou-se de maneira similar ao estudo demonstrado acima para a genisteína, ou seja, avaliou-se a influência do pH do meio, em tampão BR:etanol (8:2, v/v), 0,04 mol.L⁻¹, no intervalo de pH de 2,5 a 11,0. Os voltamogramas de onda quadrada obtidos neste estudo utilizando uma solução de daidzeína (1,8.10⁻⁵ mol.L⁻¹), com e sem a adição de surfactante BrCTA (1,9.10⁻⁴ mol.L⁻¹) são apresentados na **Figura 21**.





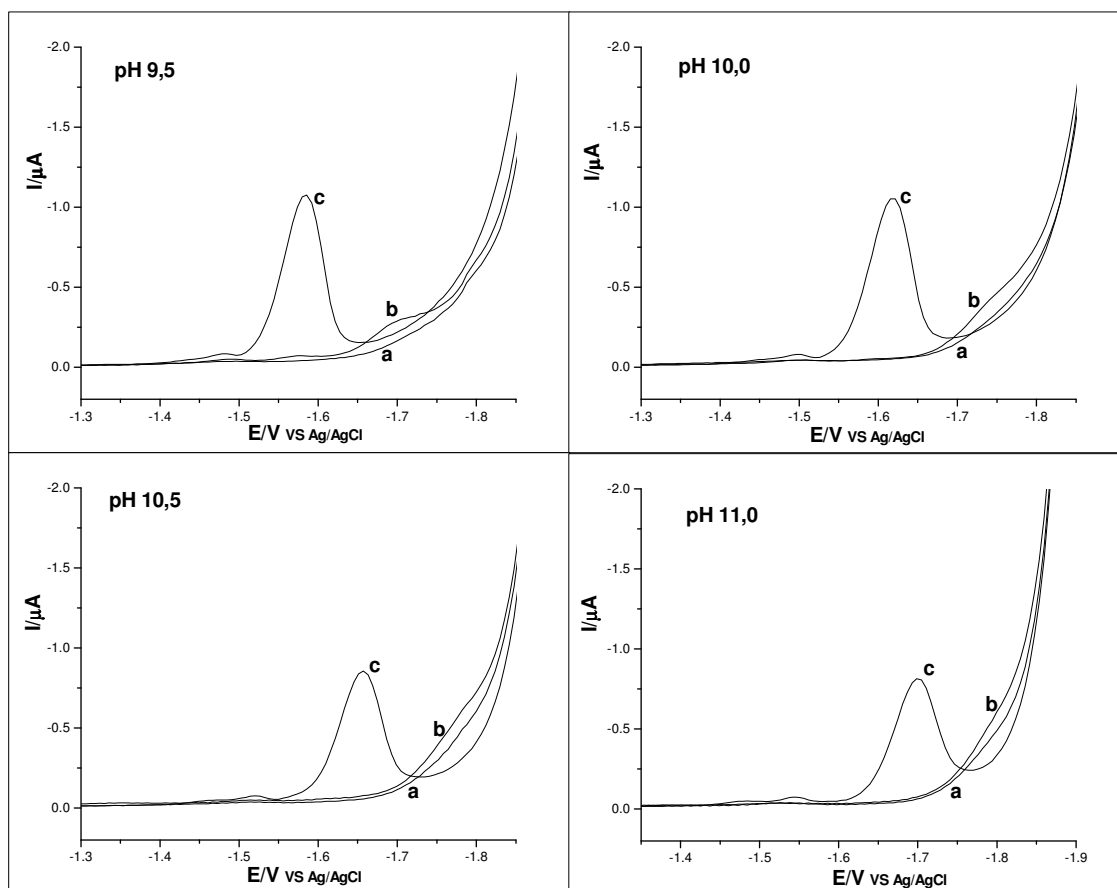


Figura 21: Voltamogramas de onda quadrada de redução da daidzeína no intervalo de pH de 2,5 a 11,0, onde: (a) Branco – tampão BR:etanol (8:2, v/v), $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$; (b) solução de daidzeína, $1,8 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$; (c) adição de $1,9 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de surfactante catiônico BrCTA.

Em todo o intervalo de pH estudado (**Figura 21**), na presença do surfactante BrCTA, observa-se a formação de apenas um pico de redução da daidzeína. Também é possível notar, para determinados valores de pH, a presença de picos de redução da daidzeína sem a adição do surfactante BrCTA. Nas **Figuras 22 A e B** são apresentadas as variações de E_p e de I_p em função do pH do meio para a resposta de redução da daidzeína na presença e na ausência do surfactante BrCTA.

Assim como para a genisteína, os valores de E_p de redução da daidzeína, apresentados na **Figura 22 A**, deslocam-se no sentido negativo com o aumento do pH do meio, podendo então concluir que trata-se de um processo que envolve pré-protonação da espécie. Este comportamento linear observado no gráfico de E_p versus pH está subdividido em três segmentos de diferentes inclinações, nos quais se interligam por dois pontos de intersecção, refletindo as mudanças na protonação dos grupos hidroxilas da daidzeína

(GAO *et al.*, 2001). Na **Tabela 6** são apresentadas as equações de reta referentes a cada segmento linear obtido.

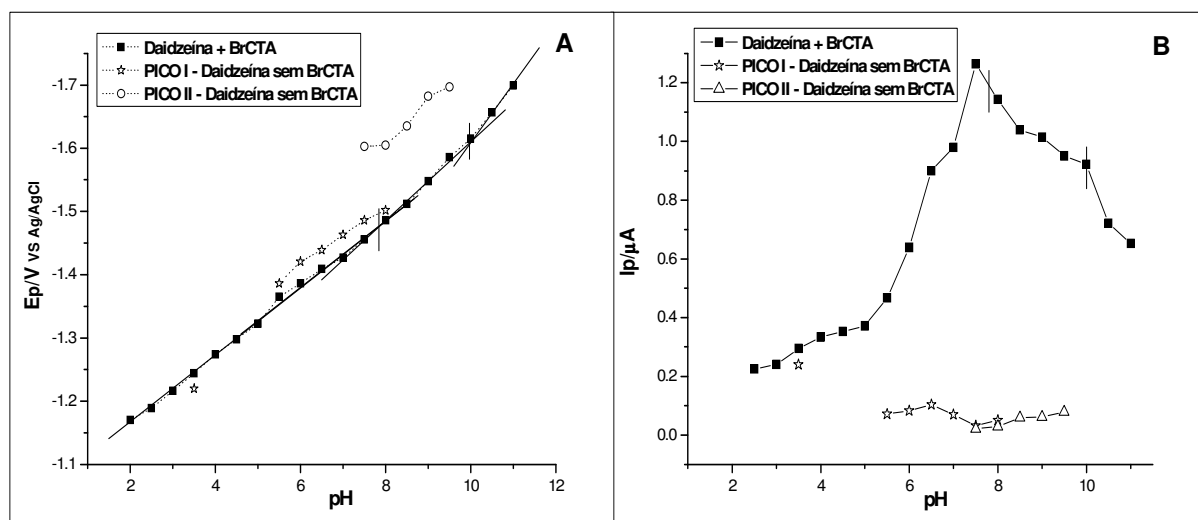


Figura 22: (A) Variação da E_p de redução de daidzeína ($1,8 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) em função do pH do meio. (B) Variação do I_p de redução de daidzeína ($1,8 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) em função do pH do meio. Eletrólito suporte: tampão BR:etanol (8:2, v/v) – $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$, com ou sem a adição de $1,9 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de surfactante BrCTA.

Tabela 6: Dados obtidos para regressão linear dos três segmentos apresentados no estudo da influência do pH no E_p de redução da daidzeína através da VOQ.

Intervalo de pH	$Y = a + bx^{(a)}$	$r^{(b)}$
2,5 – 7,5	$1,054 + 0,055 \cdot \text{pH}$	0,997
7,5 – 10,0	$0,985 + 0,063 \cdot \text{pH}$	0,996
10,0 – 11,0	$0,775 + 0,084 \cdot \text{pH}$	1,000

^(a) equação linear.

^(b) coeficiente de correlação.

Levando em consideração os equilíbrios ácido-base da daidzeína, espera-se que esta molécula sofra duas etapas de desprotonação devido à presença das hidroxilas: 7-OH e 4'-OH. Justamente, são encontrados estudos (LIANG *et al.*, 2008; GAO *et al.*, 2001) comprovando a desprotonação da molécula DaidH₂ no grupo 7-OH, levando ao correspondente monoânion DaidH⁻, seguida da segunda desprotonação no grupo 4'-OH gerando o diânion Daid²⁻ (**Figura 23**).

Na **Tabela 7** são apresentados a comparação entre os valores de pK_a encontrados para a daidzeína experimentalmente pela técnica de VOQ e os fornecidos pela literatura.

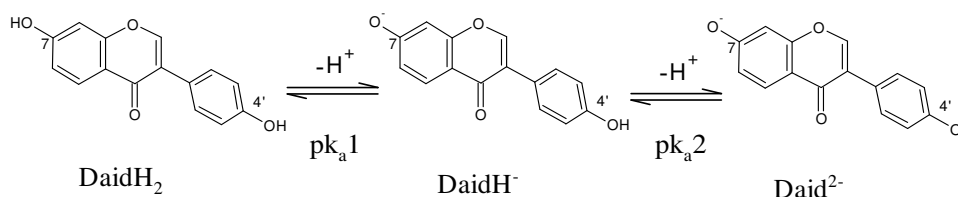


Figura 23: Esquema de desprotonação da daidzeína (LIANG *et al.*, 2008; GAO *et al.*, 2001).

Tabela 7: Valores de pK_a da daidzeína abordados na literatura em comparação com os obtidos por VOQ.

Espécies	Grupo	LITERATURA		VOQ
		pK_a^1	pK_a^2	pK_a
Daidzeína – forma neutra	7-OH	7,47	7,6	7,8
	4'-OH			
Daidzeína (7)-monoânion	4'-OH	9,65	11,2	10,0

¹Referência 1 - LIANG *et al.*, 2008.

²Referência 2 - GAO *et al.*, 2001.

Como apresentado, os valores de pK_a fornecidos pela literatura para a daidzeína variaram de forma razoável, principalmente para o segundo pK_a , portanto não se pode concluir que há uma discordância em relação aos valores de pK_a obtidos experimentalmente. Além disso, deve-se ressaltar que os pK_a s encontrados na literatura se dão para o composto em meio aquoso e, como já abordado anteriormente, a presença do surfactante BrCTA no meio pode também influenciar no deslocamento do equilíbrio ácido-base da daidzeína (XI & GUO, 2008).

Quanto à influência do pH na resposta de corrente de pico da daidzeína (**Figura 22 B**), o comportamento é semelhante ao já observado pelo estudo com a genisteína. A resposta de I_p se eleva de maneira sutil em torno dos pHs 2,5 a 5,0 e a partir do pH 5,0 este aumento torna-se mais evidenciado até alcançar um valor máximo de I_p em pH 7,5. Este comportamento se justifica pela formação de espécies desprotonadas no grupo 7-OH (em torno de pH 7,5) e a forte interação com o cátion cetiltrimetil amônio gerando um par iônico que facilita a adsorção sobre a superfície eletródica de Hg.

O decaimento gradual da I_p de redução da daidzeína para valores acima de pH 7,5 está relacionado, de modo similar, aos mesmos fatores que influenciaram esta queda de I_p no processo de redução da genisteína. Ou seja, a dificuldade de pré-protonação da espécie visto a escassez de prótons em meio fortemente alcalino (LUND & HAMMERICH, 2001) e também a estabilização destas espécies pela oxidação dos grupos ionizados dificultando a interação com o surfactante BrCTA.

Ao analisar a estrutura da daidzeína, espera-se que a redução deste composto ocorra no grupo carbonila (C=O) do anel pirano, assim sendo, o seu mecanismo de redução sobre a superfície do eletrodo de Hg se dá como o previsto para a genisteína. Esta afirmação se confirma por estudos propostos por Dong e colaboradores (2003) e Hu & Li (1995) que apresentam o mecanismo de redução da daidzeína conforme demonstrado na **Figura 24**.

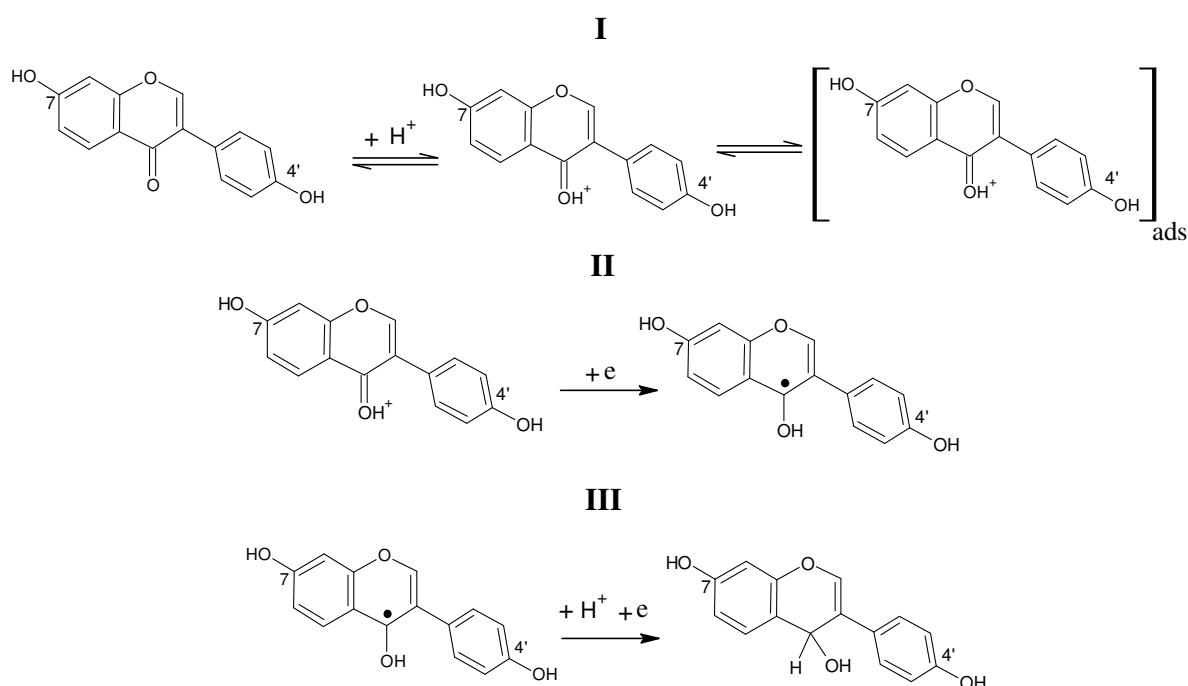


Figura 24: Mecanismo de redução da daidzeína sobre a superfície eletródica (Adaptado de DONG *et al.*, 2003; HU & LI, 1995).

Ao avaliar a possibilidade do desenvolvimento de uma metodologia de análise simultânea para a daidzeína e genisteína, verificou-se a resposta de redução da daidzeína com a variação de pH na presença do surfactante BrCTA (**Figuras 22 A e B**) quanto ao maior valor de I_p e com um E_p suficientemente distante do obtido para a genisteína. A escolha do pH 7,5 foi então confirmada, pois promoveu um valor máximo de I_p , com E_p de redução da daidzeína em -1,46 V vs Ag/AgCl, e ainda, uma boa definição de pico.

O estudo de pH foi repetido para a daidzeína com outros eletrólitos suporte em presença do surfactante BrCTA. A **Figura 25** apresenta uma comparação da variação de I_p em função do pH do meio para os diferentes eletrólitos estudados.

Os valores máximos de I_p foram obtidos em pH 7,5, com boa simetria do pico de redução da daidzeína, o que leva a confirmar a escolha deste pH para prosseguir os estudos. Ainda é possível visualizar na **Figura 26** os voltamogramas de redução da daidzeína comparando os três eletrólitos estudados em pH 7,5.

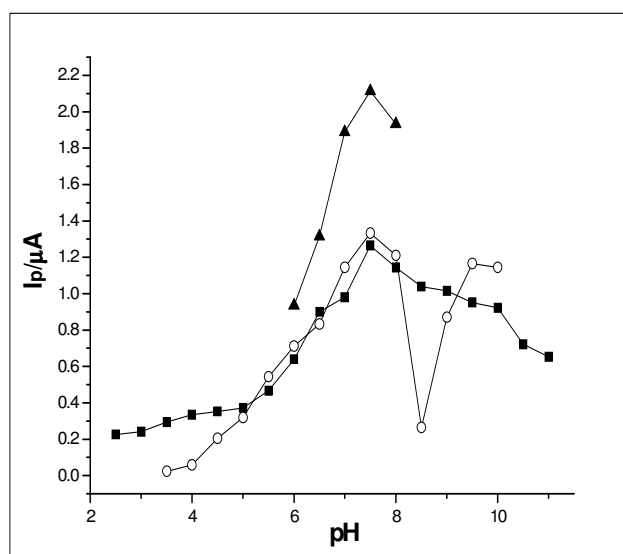


Figura 25: Variação de I_p para a redução de uma solução de daidzeína ($1,8 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) em função do pH do meio, na presença de $1,9 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de surfactante catiônico BrCTA. (—■—) Tampão BR:etanol (8:2, v/v), pH de 2,5 a 11,0. (—○—) Tampão acetato:etanol (8:2, v/v) – pH 3,5 a 5,0; tampão fosfato:etanol (8:2, v/v) – pH 5,5 a 8,0; tampão borato:etanol (8:2, v/v) – pH 8,5 a 10,0. (—▲—) Tampão fosfato:metanol (8:2, v/v) – pH 6,0 a 8,0. Todos os eletrólitos suporte na concentração de $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$.

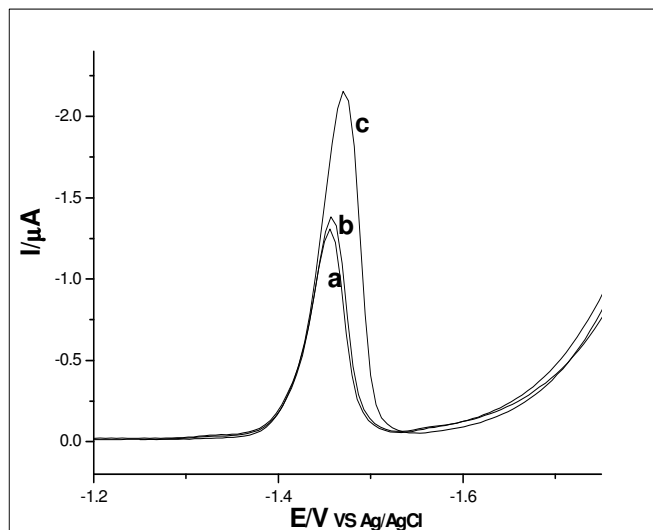
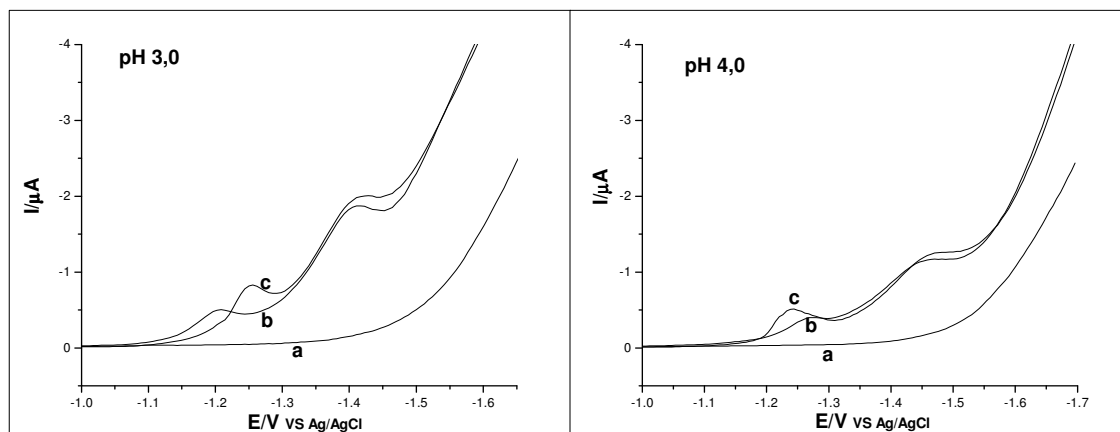


Figura 26: Voltamogramas de onda quadrada de redução da daidzeína ($1,8 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$), na presença de $1,9 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de surfactante BrCTA, para diferentes eletrólitos suporte em pH 7,5, onde: (a) Tampão BR:etanol (8:2, v/v), $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$; (b) Tampão fosfato:etanol (8:2, v/v), $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$; (c) Tampão fosfato:metanol (8:2, v/v), $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$.

3.1.1.4. Influência de diferentes tipos de surfactantes na redução da daidzeína

A otimização do tipo de surfactante a ser utilizado é fundamental para o desenvolvimento da metodologia, portanto além dos estudos realizados com o surfactante catiônico BrCTA, estudou-se também a influência do surfactante aniônico DSS ($4,1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) no intervalo de pH entre 3,0 e 10,0 em tampão BR:etanol (8:2, v/v), $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ com o intuito de otimizar a resposta voltamétrica. Na **Figura 27** podem ser observados os voltamogramas referentes a este estudo.



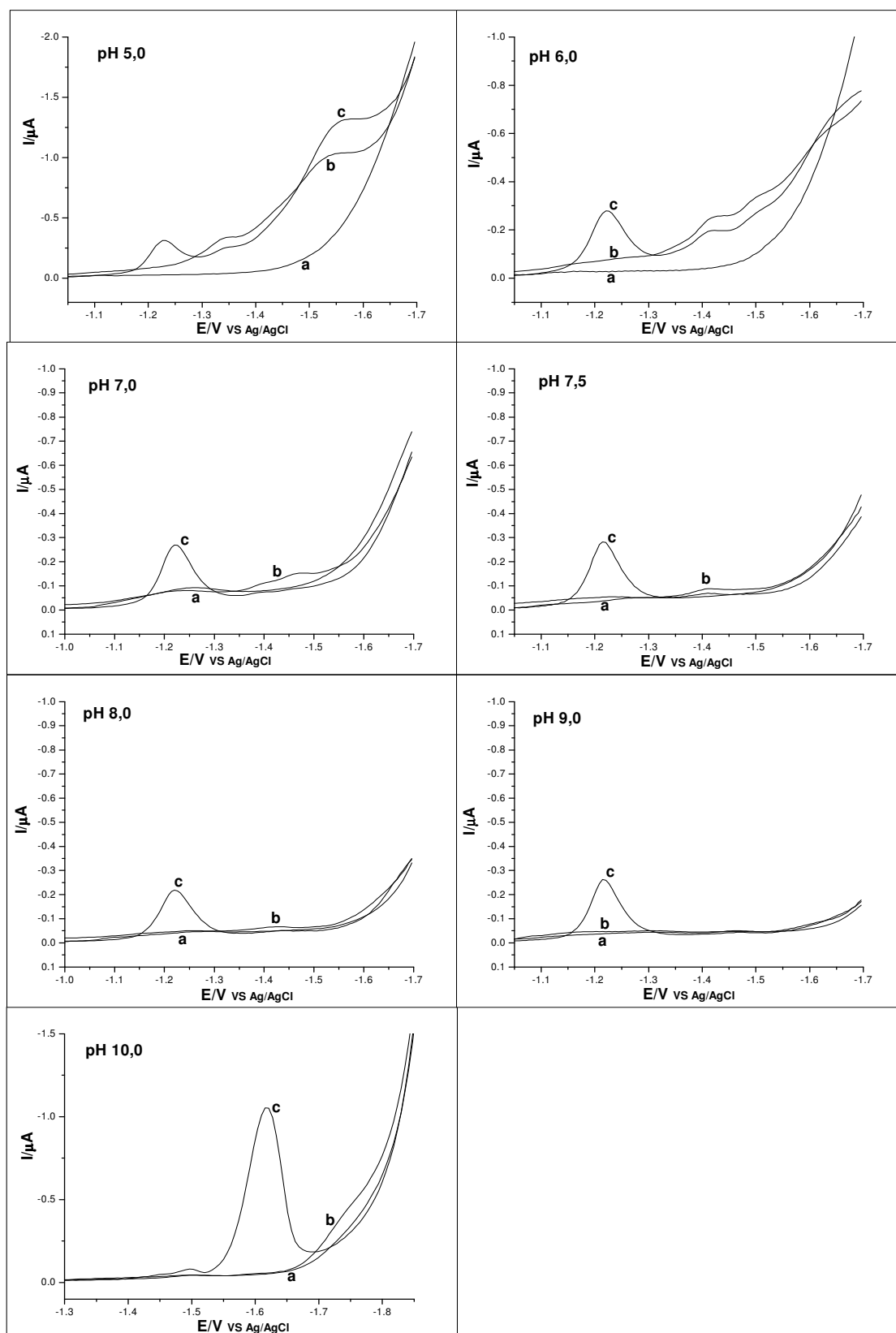
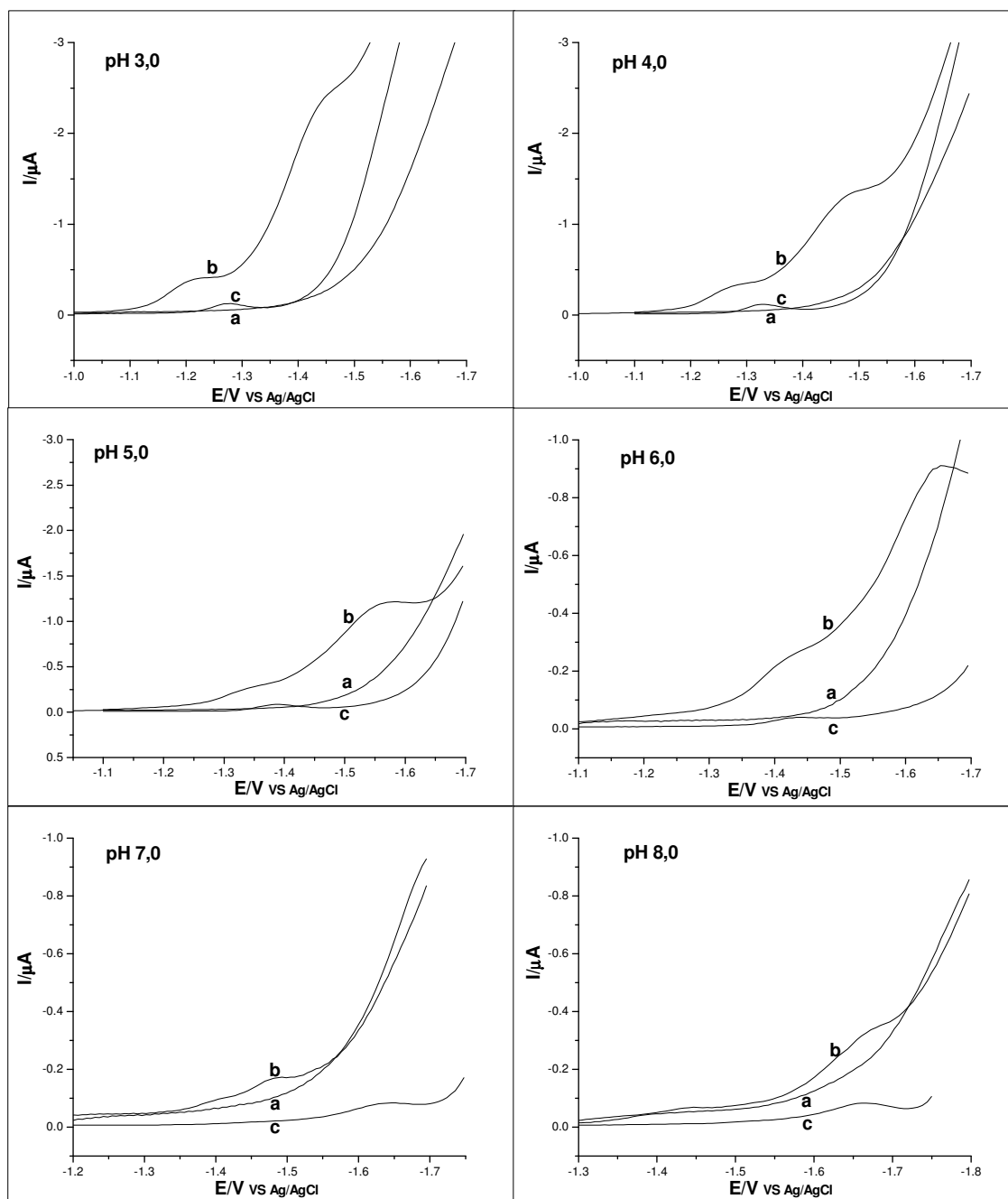


Figura 27: Voltamogramas de onda quadrada de redução da daidzeína no intervalo de pH de 3,0 a 10,0, onde: (a) Branco – tampão BR:etanol (8:2, v/v), 0,04 mol.L⁻¹; (b) solução de daidzeína, 2,0.10⁻⁵ mol.L⁻¹; (c) adição de 4,1.10⁻⁴ mol.L⁻¹ de surfactante aniônico DSS.

Da mesma forma foi realizado o estudo com o surfactante neutro Triton X-100 (**Figura 28**), variando os valores de pH entre 3,0 e 10,0, tendo como eletrólito suporte tampão BR:etanol 0,04 mol.L⁻¹ (8:2, v/v).



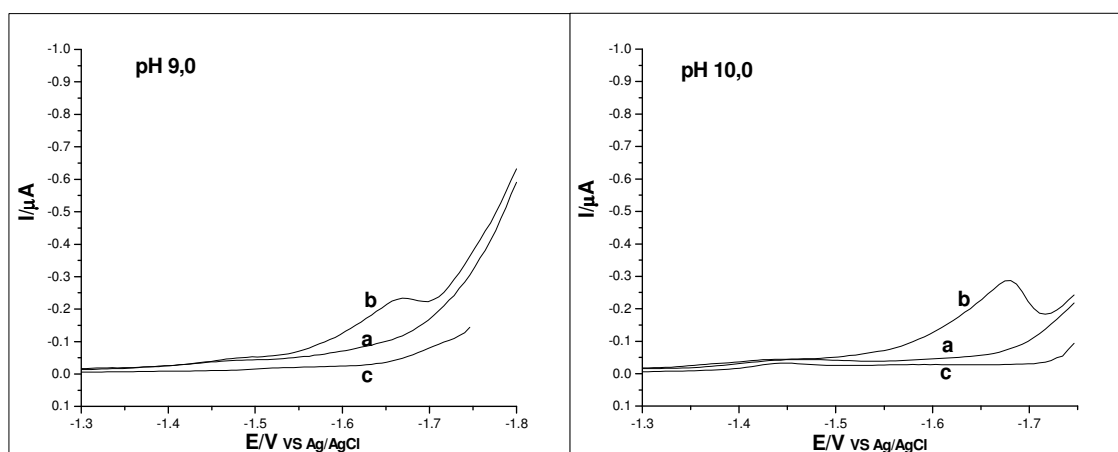


Figura 28: Voltamogramas de onda quadrada de redução da daidzeína no intervalo de pH de 3,0 a 10,0, onde: (a) Branco – tampão BR:etanol 0,04 mol.L⁻¹ (8:2, v/v); (b) solução de daidzeína, 2,0.10⁻⁵ mol.L⁻¹; (c) adição de 2,3.10⁻³ mol.L⁻¹ de surfactante neutro Triton X-100.

Os resultados obtidos com uso do surfactante neutro Triton X-100, tanto para genisteína quanto para daidzeína, não foram satisfatórios no processo de redução (**Figuras 19 e 28**), descartando o seu uso em estudos posteriores.

Já os voltamogramas de redução da daidzeína para alguns valores de pH com a adição dos surfactantes BrCTA e DSS (**Figuras 21 e 27**, respectivamente) resultaram em picos bem simétricos, o que levou a compará-los para verificar qual promoveria maiores valores de I_p em função do pH do meio (**Figura 29**). Apesar de o surfactante BrCTA fornecer uma resposta voltamétrica consideravelmente melhor, ainda é necessário a realização de estudos de redução simultânea da daidzeína e genisteína, pois só assim será possível verificar o comportamento destes compostos na presença dos dois surfactantes e concluir qual apresenta uma separação adequada entre os picos destes compostos, que é imprescindível para continuidade dos estudos.

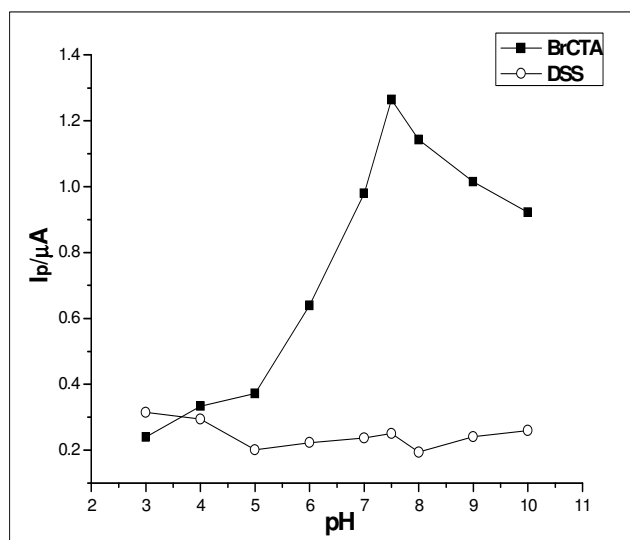


Figura 29: Variação de corrente de pico de redução de uma solução de daidzeína ($2,0 \cdot 10^{-5}$ mol.L⁻¹) em função do pH do meio. (—■—) Na presença de $1,9 \cdot 10^{-4}$ mol.L⁻¹ de surfactante catiônico BrCTA. (—○—) Na presença de $4,1 \cdot 10^{-4}$ mol.L⁻¹ de surfactante aniônico DSS. Eletrólito suporte: tampão BR:etanol (8:2, v/v), 0,04 mol.L⁻¹.

3.2. Metodologia para determinação simultânea de daidzeína e genisteína por VOQ

3.2.1. Otimização do tipo de eletrólito suporte e surfactante

Como já exposto anteriormente, os estudos com os surfactantes BrCTA e DSS foram testados para verificar o comportamento de redução simultânea da daidzeína e genisteína a fim de se obter uma separação adequada entre os picos. As **Figuras 30 A e B** mostram a variação do E_p de redução da daidzeína e genisteína em função do pH do meio sob a influência dos surfactantes BrCTA e DSS, respectivamente.

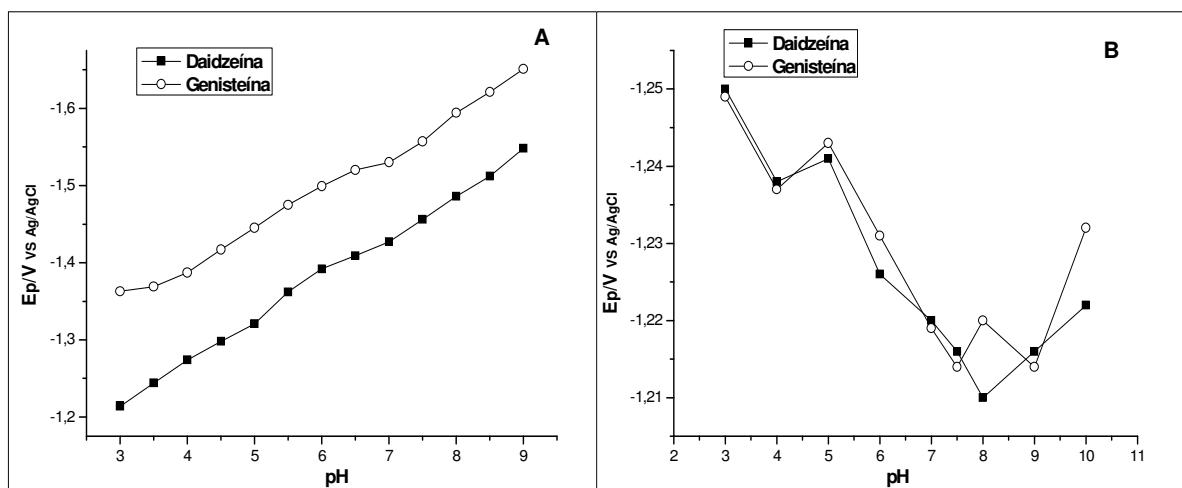


Figura 30: Variação de E_p de redução de uma solução de daidzeína e genisteína ($\approx 9,7 \cdot 10^{-6}$ mol.L $^{-1}$) em função do pH do meio. **(A)** Na presença de $1,9 \cdot 10^{-4}$ mol.L $^{-1}$ de surfactante catiônico BrCTA. **(B)** Na presença de $4,1 \cdot 10^{-4}$ mol.L $^{-1}$ de surfactante aniônico DSS. Eletrólito suporte: tampão BR:etanol (8:2, v/v), 0,04 mol.L $^{-1}$.

A **Figura 30 B** mostra que a redução simultânea da daidzeína e genisteína na presença do surfactante DSS não é possível já que os valores de E_p de redução destas isoflavonas estão muito próximos em todo intervalo de pH estudado, impossibilitando utilizá-lo para os fins analíticos propostos neste projeto.

Ao contrário, na presença do surfactante BrCTA as reduções da daidzeína e da genisteína (**Figura 30 A**) obtiveram uma boa resposta quanto a separação dos picos. No pH 7,5, selecionado nos estudos anteriores, foi observada uma separação de 109 mV entre os picos de redução das isoflavonas, sendo então de primordial importância o uso do surfactante catiônico BrCTA no desenvolvimento desta metodologia.

Após a escolha do surfactante BrCTA, torna-se necessário otimizar a concentração deste de forma a se obter uma melhor resposta de I_p e de E_p de redução da daidzeína e genisteína. Portanto, estudou-se a influência da concentração de BrCTA sobre a redução destas isoflavonas, no intervalo de $5,56 \cdot 10^{-5}$ a $4,39 \cdot 10^{-4}$ mol.L $^{-1}$, em função de I_p e de E_p em dois eletrólitos suporte: tampão fosfato:etanol (8:2, v/v) (**Figuras 31 A e B**) e em tampão fosfato:metanol (8:2, v/v) (**Figuras 32 A e B**), ambos em pH 7,5 - 0,04 mol.L $^{-1}$.

Nas **Figuras 31 e 32 A** observa-se que o E_p permanece praticamente constante com a variação da concentração de BrCTA, independente do eletrólito suporte utilizado no estudo, portanto não foi tomado como um fator de escolha da concentração de surfactante a ser utilizada.

Avaliando os valores de I_p , na **Figura 31 B**, nota-se um máximo de corrente de pico de redução para ambos os compostos na concentração de $2,04 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, em tampão fosfato:etanol (8:2, v/v). Já considerando o estudo realizado em tampão fosfato:metanol (8:2, v/v) (**Figura 32 B**), os valores máximos de corrente de pico foram observados em uma concentração de BrCTA de $2,21 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$. Portanto, estes valores de concentrações do surfactante BrCTA foram adotados para o desenvolvimento da metodologia nos dois eletrólitos em estudo.

Os voltamogramas de redução da daidzeína e genisteína em algumas das concentrações de surfactante BrCTA são apresentados nas **Figuras 33 A e B**. Pode ser visualizado que nas concentrações escolhidas não houve perda das definições dos picos de redução da daidzeína e da genisteína.

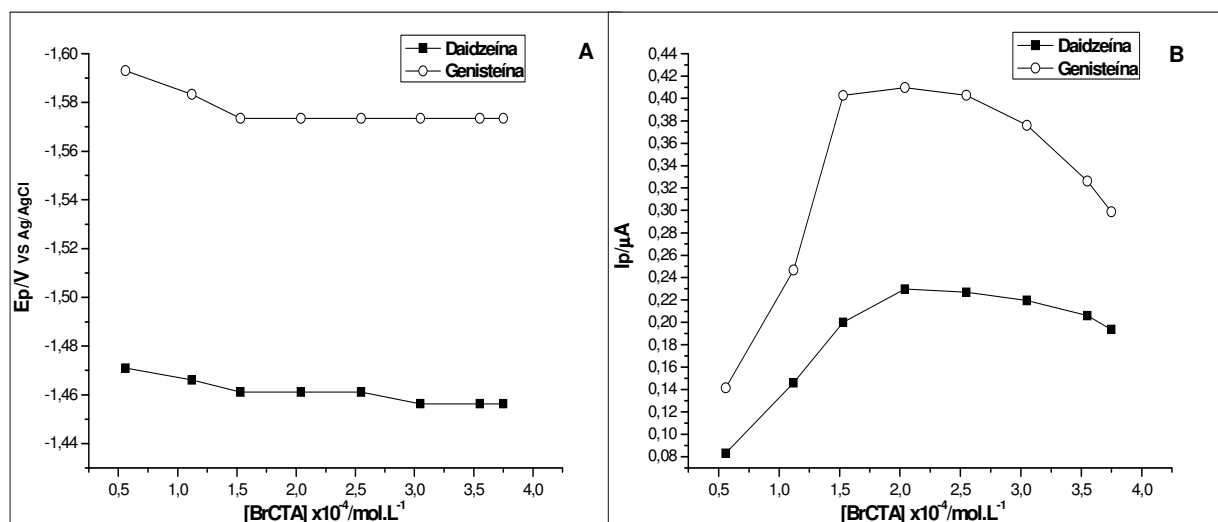


Figura 31: (A) Variação de E_p em função da concentração do surfactante BrCTA ($5,59 \cdot 10^{-5}$ a $3,75 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) para uma solução de daidzeína e genisteína ($\approx 2,6 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$). (B) Variação de I_p em função da concentração do surfactante BrCTA ($5,59 \cdot 10^{-5}$ a $3,75 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) para uma solução de daidzeína e genisteína ($\approx 2,6 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$). Eletrólito suporte: tampão fosfato:etanol (8:2, v/v), pH 7,5 - $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$.

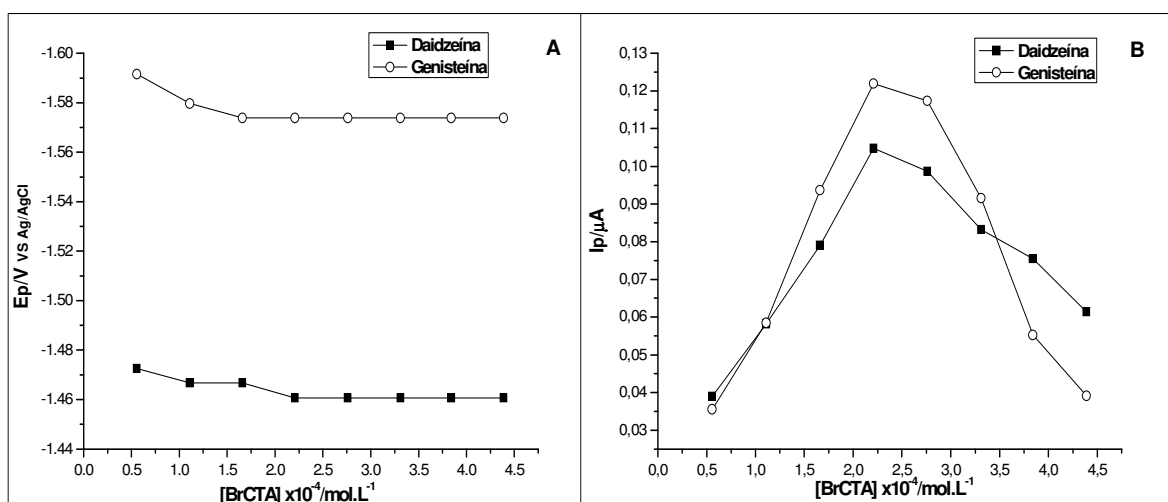


Figura 32: (A) Variação de E_p em função da concentração do surfactante BrCTA ($5,56 \cdot 10^{-5}$ a $4,39 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) para uma solução de daidzeína e genisteína ($\approx 5,2 \cdot 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$). (B) Variação de I_p em função da concentração do surfactante BrCTA ($5,56 \cdot 10^{-5}$ a $4,39 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) para uma solução de daidzeína e genisteína ($\approx 5,2 \cdot 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$). Eletrólito suporte: tampão fosfato:metanol (8:2, v/v), pH 7,5 - $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$.

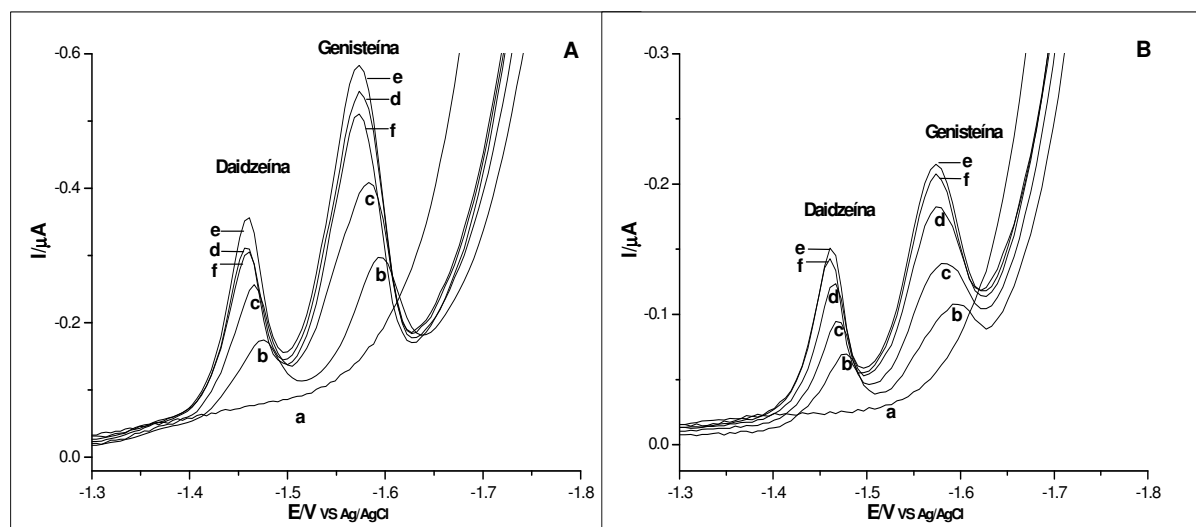


Figura 33: Voltamogramas de onda quadrada de redução da daidzeína e genisteína em diferentes concentrações de BrCTA. (A) (a) Tampão fosfato:etanol (8:2, v/v), pH 7,5 - $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ + solução de daidzeína e genisteína a $2,6 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$. (b-f) Adições do surfactante BrCTA: (b) $5,59 \cdot 10^{-5}$; (c) $1,12 \cdot 10^{-4}$; (d) $1,53 \cdot 10^{-4}$; (e) $2,04 \cdot 10^{-4}$; (f) $3,05 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$. (B) (a) Tampão fosfato:metanol (8:2, v/v), pH 7,5 - $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ + solução de daidzeína e genisteína a $5,2 \cdot 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$. (b-f) Adições do surfactante BrCTA: (b) $5,56 \cdot 10^{-5}$; (c) $1,11 \cdot 10^{-4}$; (d) $1,66 \cdot 10^{-4}$; (e) $2,21 \cdot 10^{-4}$; (f) $2,76 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$.

O comportamento de redução simultânea da daidzeína e genisteína foi avaliado nos eletrólitos suporte: tampão BR:etanol (8:2, v/v), tampão fosfato:etanol (8:2, v/v) e tampão fosfato:metanol (8:2, v/v), todos em pH 7,5 ($0,04 \text{ mol.L}^{-1}$). Como pode ser observado na **Figura 34**, os tampões BR:etanol (8:2, v/v) e fosfato:etanol (8:2, v/v) apresentaram respostas voltamétricas similares com uma separação entre os picos das isoflavonas em torno de 110 mV. O tampão fosfato:metanol (8:2, v/v) proporcionou um valor maior de I_p de redução das isoflavonas estudadas, com uma separação entre os picos de 97 mV.

Mesmo com um dos eletrólitos suporte apresentando uma melhor resposta voltamétrica para fins analíticos, optou-se por desenvolver a metodologia de determinação simultânea da daidzeína e genisteína em dois deles: tampão fosfato:etanol (8:2, v/v) e tampão fosfato:metanol (8:2, v/v), pH 7,5 ($0,04 \text{ mol.L}^{-1}$), pois não se tem uma resposta prevista para estes eletrólitos na presença das diferentes matrizes de amostras que serão estudadas.

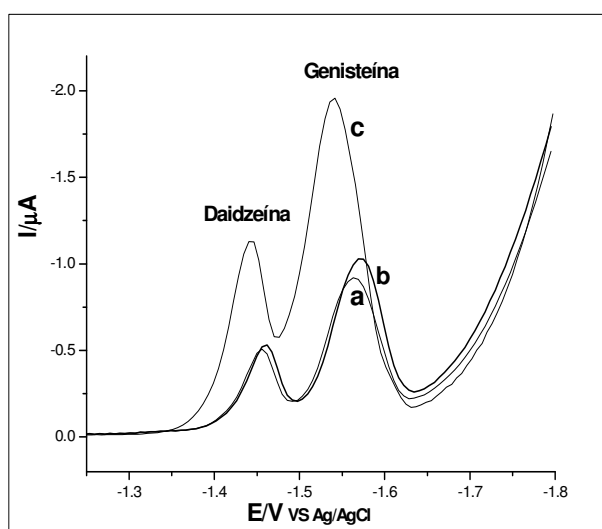


Figura 34: Voltamogramas de onda quadrada de redução da daidzeína e genisteína ($\approx 9,7 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$), na presença de $2,21 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de surfactante BrCTA, para diferentes eletrólitos suporte em pH 7,5, onde: (a) Tampão BR:etanol (8:2, v/v), $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$; (b) Tampão fosfato:etanol (8:2, v/v), $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$; (c) Tampão fosfato:metanol (8:2, v/v), $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$.

3.2.2. Influência dos parâmetros instrumentais

3.2.2.1. Estudo do tempo de deposição (t_{ac})

O tempo de deposição da daidzeína e genisteína sobre a gota de mercúrio foi avaliado para uma solução de $2,5 \cdot 10^{-6}$ mol.L⁻¹ contendo ambos compostos, em meio tampão fosfato:etanol (8:2, v/v), pH 7,5 e em meio tampão fosfato:metanol (8:2, v/v), pH 7,5. Variou-se o tempo de acúmulo de 0 a 250 s e manteve-se constante o potencial de deposição (E_{ac}): 0 V, amplitude (E_{sw}): 20 mV, frequência (f): 120 Hz e incremento de varredura (ΔE_s): 6 mV. As **Figuras 35 A e B** mostram a influência do t_{ac} na I_p de redução da daidzeína e genisteína para os dois eletrólitos suportes.

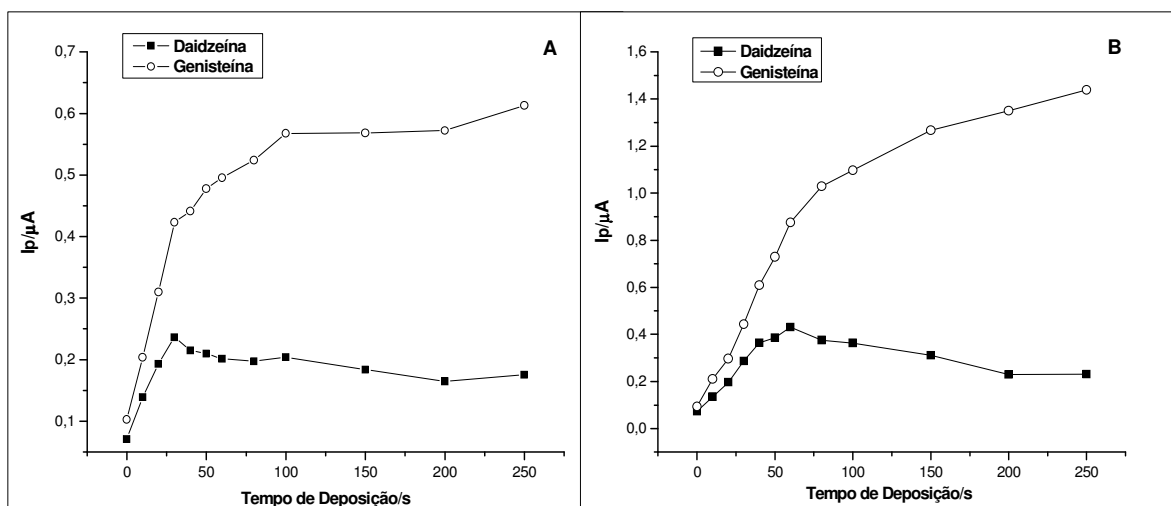


Figura 35: Efeito do tempo de deposição sobre I_p de redução da genisteína e daidzeína ($\approx 2,5 \cdot 10^{-6}$ mol.L⁻¹). (A) Tampão fosfato:etanol (8:2, v/v), pH 7,5 - $0,04$ mol.L⁻¹, na presença de $2,04 \cdot 10^{-4}$ mol.L⁻¹ de surfactante BrCTA. (B) Tampão fosfato:metanol (8:2, v/v), pH 7,5 - $0,04$ mol.L⁻¹, na presença de $2,21 \cdot 10^{-4}$ mol.L⁻¹ de surfactante BrCTA. Parâmetros: E_{sw} : 20 mV; f : 120 Hz; E_{ac} : 0 V; ΔE_s : 6 mV.

Na figura acima, verifica-se um aumento da I_p devido à deposição de daidzeína e genisteína no eletrodo até 30 s em tampão fosfato:etanol (8:2, v/v), pH 7,5; e em torno de 50 s em tampão fosfato:metanol (8:2, v/v), pH 7,5. Até estes t_{ac} mencionados, para cada eletrólito em estudo, ocorre um aumento linear da corrente de pico denotando a característica adsorptiva da daidzeína e da genisteína sobre a superfície eletródica (DONG *et*

al., 2003; ZHANG *et al.*, 2001), porém, acima destes tempos de deposição observa-se um desvio da linearidade e certa estabilidade da I_p devido ao processo de saturação da gota de mercúrio.

A partir destas análises foi estabelecido que os t_{ac} de 30 s para o tampão fosfato:etanol (8:2, v/v) e de 50 s para o fosfato:metanol (8:2, v/v), em pH 7,5, promoveriam o aumento da sensibilidade para a faixa de concentração estudada.

3.2.2.2. Estudo do potencial de deposição (E_{ac})

O efeito do potencial de deposição foi avaliado de 0 a -0,8 V nos tampões fosfato:etanol (8:2, v/v) e fosfato:metanol (8:2, v/v), em pH 7,5, para uma solução de $2,5 \cdot 10^{-6}$ mol.L⁻¹ de daidzeína e genisteína, com o tempo de deposição já estabelecido e mantendo-se constante os demais parâmetros. As **Figuras 36 A e B** apresentam a variação de I_p de redução da genisteína e daidzeína em função do potencial de deposição aplicado para os dois eletrólitos suporte estudados.

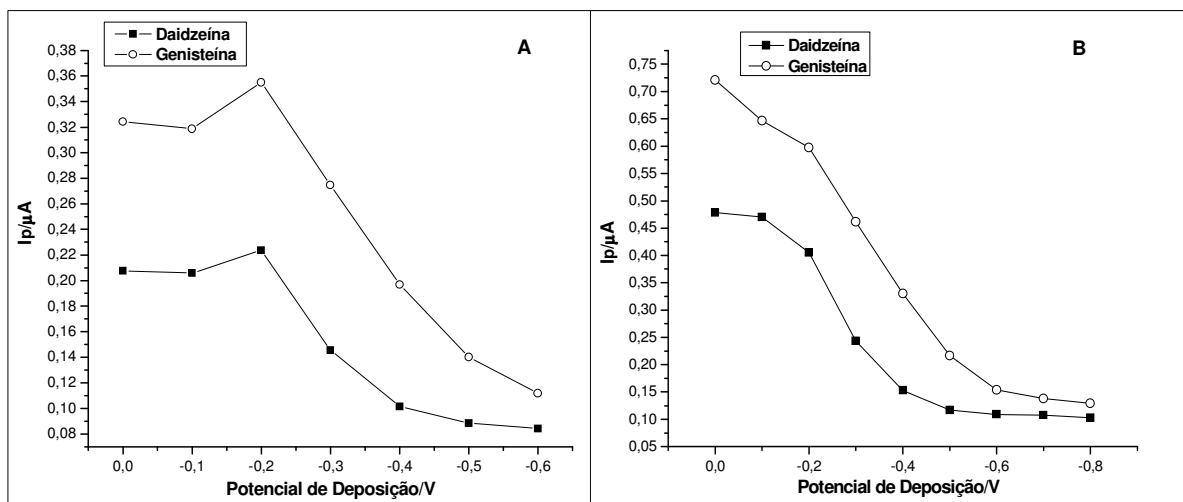


Figura 36: Efeito do potencial de deposição sobre I_p de redução da genisteína e daidzeína ($\approx 2,5 \cdot 10^{-6}$ mol.L⁻¹). (A) Tampão fosfato:etanol (8:2, v/v), pH 7,5 - $0,04$ mol.L⁻¹, na presença de $2,04 \cdot 10^{-4}$ mol.L⁻¹ de surfactante BrCTA. Parâmetros: E_{sw} : 20 mV; f : 120 Hz; t_{ac} : 30 s; ΔE_s : 6 mV. (B) Tampão fosfato:metanol (8:2, v/v), pH 7,5 - $0,04$ mol.L⁻¹, na presença de $2,21 \cdot 10^{-4}$ mol.L⁻¹ de surfactante BrCTA. Parâmetros: E_{sw} : 20 mV; f : 120 Hz; t_{ac} : 50 s; ΔE_s : 6 mV.

Ao observar a resposta de I_p em função do E_{ac} (**Figuras 36 A e B**), nota-se que há um decréscimo acentuado da I_p a medida que se aplicam potenciais de deposição mais

negativos. Este comportamento é semelhante para a daidzeína e genisteína nos dois eletrólitos estudados, embora que em tampão fosfato:etanol (8:2, v/v) este decréscimo de I_p se inicie em potenciais acima de -0,2V. Isto sugere que a polarização do eletrodo de trabalho em potenciais mais negativos pode estar dificultando a chegada das moléculas em função delas já se apresentarem carregadas negativamente.

Portanto, os valores de E_{ac} de -0,2 V para o tampão fosfato:etanol (8:2, v/v) e de 0 V para o tampão fosfato:metanol (8:2, v/v) foram escolhidos para o prosseguimento dos estudos por permitirem um aumento da sensibilidade do método.

3.2.2.3. Estudo da amplitude dos pulsos (E_{sw})

Na VOQ, a amplitude dos pulsos é um parâmetro importante para uma melhora da sensibilidade analítica. No caso de processos redox totalmente irreversíveis, um aumento da amplitude de aplicação dos pulsos (E_{sw}), leva a um aumento da sensibilidade, isto porque, para valores de amplitudes maiores que 20 mV, a largura de meia-altura ($\Delta E_{p/2}$) se mantêm praticamente constante (SOUZA & MACHADO, 2003; SOUZA *et al.*, 2003).

As **Figuras 37 A e B** apresentam o efeito da variação de E_{sw} , no intervalo de 10 a 120 mV, sobre a I_p das isoflavonas agliconas e as **Figuras 38 A e B** apresentam a influência de E_{sw} , no mesmo intervalo, sobre o E_p de redução da daidzeína e genisteína, para os tampões fosfato:etanol (8:2, v/v) e fosfato:metanol (8:2, v/v) em pH 7,5.

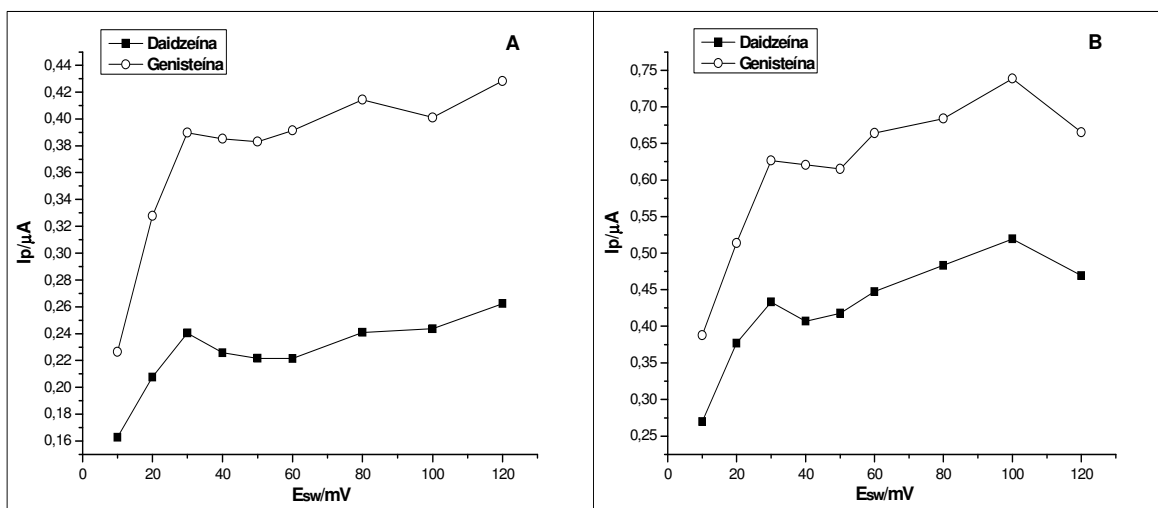


Figura 37: Efeito da amplitude dos pulsos sobre I_p de redução da genisteína e daidzeína ($\approx 2,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$). (A) Tampão fosfato:etanol (8:2, v/v), pH 7,5 - $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$, na presença de $2,04 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de surfactante BrCTA. Parâmetros: t_{ac} : 30 s; E_{ac} : -0,2V; f : 120 Hz;

ΔE_s : 6 mV. **(B)** Tampão fosfato:metanol (8:2, v/v), pH 7,5 - $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$, na presença de $2,21 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de surfactante BrCTA. Parâmetros: t_{ac} : 50 s; E_{ac} : 0 V; f : 120 Hz; ΔE_s : 6 mV.

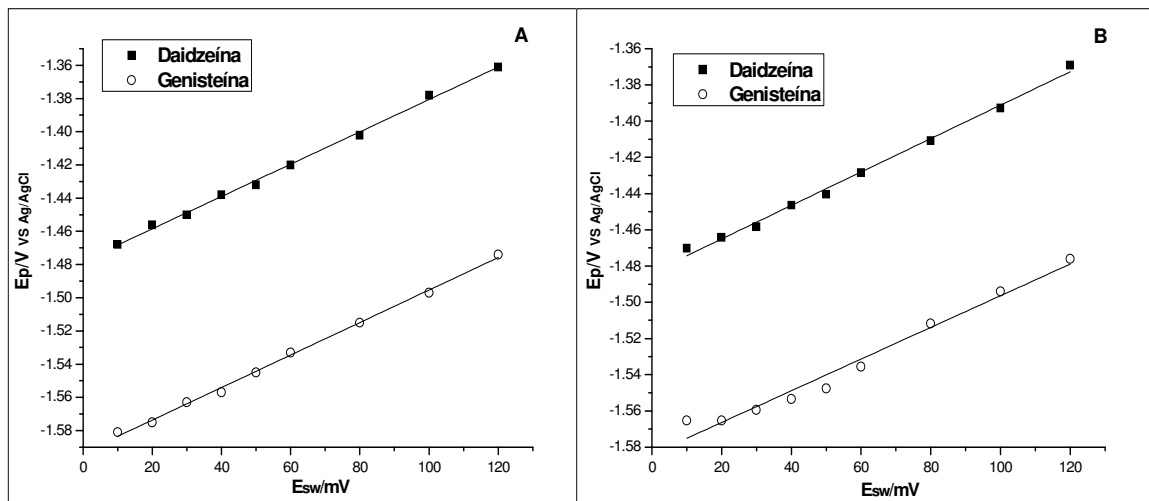


Figura 38: Efeito da amplitude dos pulsos (E_{sw}) sobre E_p de redução da genisteína e daidzeína ($\approx 2,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$). **(A)** Tampão fosfato:etanol (8:2, v/v), pH 7,5 - $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$, na presença de $2,04 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de surfactante BrCTA. Parâmetros: t_{ac} : 30 s; E_{ac} : -0,2 V; f : 120 Hz; ΔE_s : 6 mV. **(B)** Tampão fosfato:metanol (8:2, v/v), pH 7,5 - $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$, na presença de $2,21 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de surfactante BrCTA. Parâmetros: t_{ac} : 50 s; E_{ac} : 0 V; f : 120 Hz; ΔE_s : 6 mV.

Como observado, valores de amplitudes maiores que 30 mV pareceram não atuar de modo significativo na sensibilidade da técnica, para os propósitos analíticos, pois a partir deste valor a corrente de pico tornou-se praticamente constante.

Em função disto, no desenvolvimento da metodologia eletroanalítica para determinação de daidzeína e genisteína, através da técnica de VOQ, optou-se por trabalhar com amplitude da onda quadrada de 30 mV para os dois eletrólitos estudados. Os voltamogramas mostrados nas **Figuras 39 A e B**, confirmam que um melhor sinal é obtido nesta amplitude de pulso, com picos simétricos e com a linha de base menos afetada pela descarga do eletrólito.

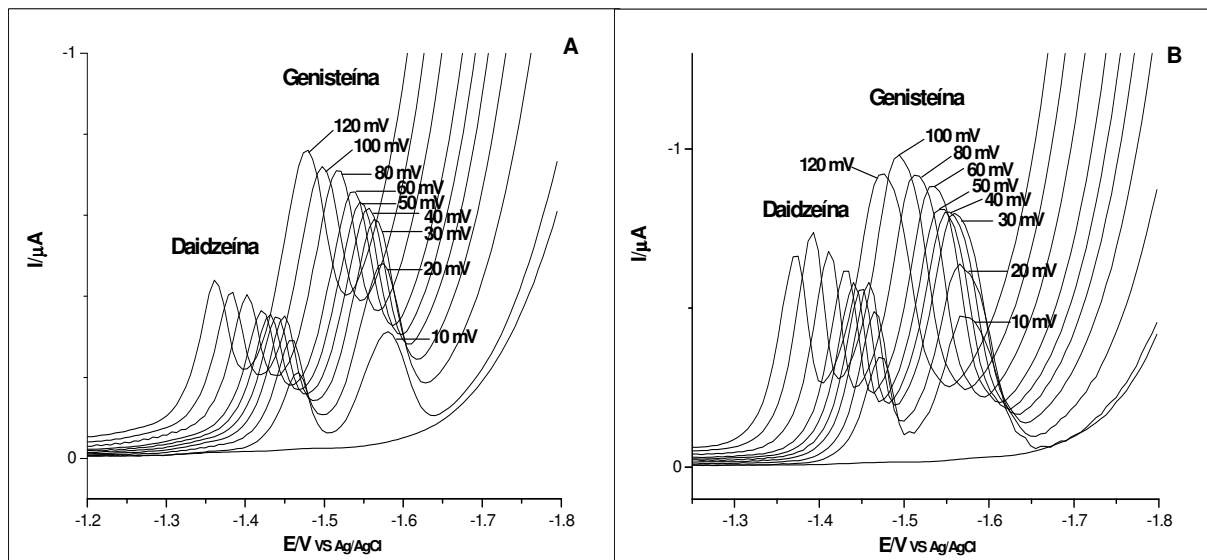


Figura 39: Voltamogramas de onda quadrada de redução da genisteína e daidzeína ($\approx 2,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$) em diferentes valores de amplitude de pulso. **(A)** Tampão fosfato:etanol (8:2, v/v), pH 7,5 - $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$, na presença de $2,04 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de surfactante BrCTA. Parâmetros: t_{ac} : 30 s; E_{ac} : -0,2 V; f : 120 Hz; ΔE_s : 6 mV. **(B)** Tampão fosfato:metanol (8:2, v/v), pH 7,5 - $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$, na presença de $2,21 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de surfactante BrCTA. Parâmetros: t_{ac} : 50 s; E_{ac} : 0 V; f : 120 Hz; ΔE_s : 6 mV.

3.2.2.4. Estudo da frequência de aplicação dos pulsos (f)

A frequência de aplicação dos pulsos (f) é um dos parâmetros mais importantes em VOQ, pois através dela pode-se determinar a intensidade dos sinais, com a consequente melhoria na sensibilidade da análise. Ainda, o estudo da frequência possibilita identificar o tipo de processo e o número de elétrons envolvidos na transferência eletrônica (PEDROSA *et al.*, 2003; SOUZA *et al.*, 2003).

As **Figuras 40 A e B** apresentam os valores de I_p de redução da daidzeína e genisteína para frequências no intervalo de 30 a 250 Hz, sendo estudados nos tampões fosfato:etanol (8:2, v/v) e fosfato:metanol (8:2, v/v), em pH 7,5.

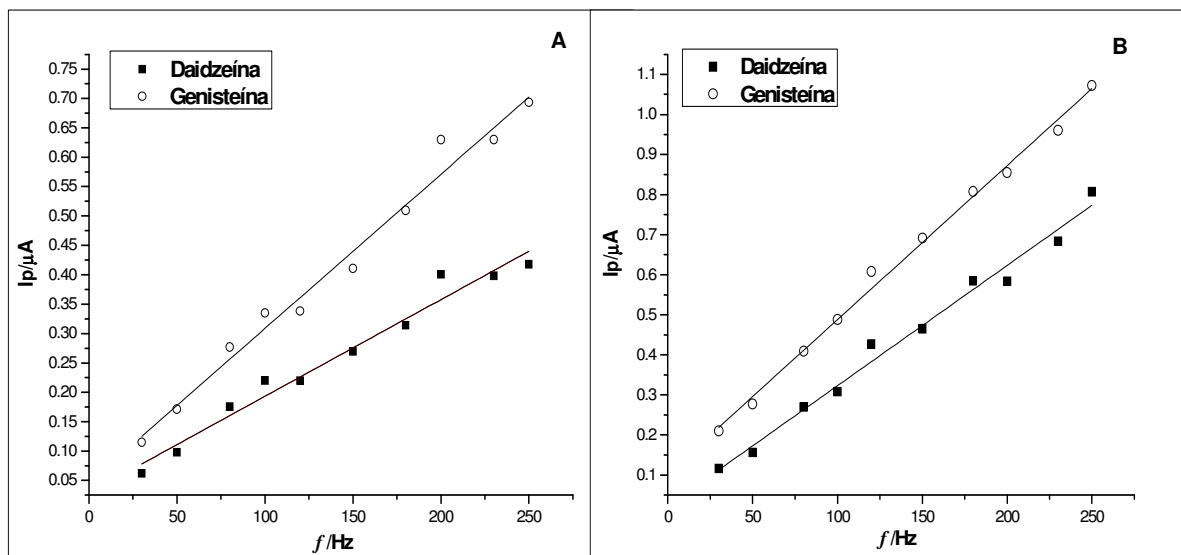


Figura 40: Efeito da frequência de aplicação dos pulsos sobre I_p de redução da genisteína e daidzeína ($\approx 2,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$). **(A)** Tampão fosfato:etanol (8:2, v/v), pH 7,5 - $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$, na presença de $2,04 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de surfactante BrCTA. Parâmetros: t_{ac} : 30 s; E_{ac} : -0,2 V; E_{sw} : 30 mV; ΔE_s : 6 mV. **(B)** Tampão fosfato:metanol (8:2, v/v), pH 7,5 - $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$, na presença de $2,21 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de surfactante BrCTA. Parâmetros: t_{ac} : 50 s; E_{ac} : 0 V; E_{sw} : 30 mV; ΔE_s : 6 mV.

De acordo com Souza e colaboradores (2003), para reações irreversíveis com processos controlados por adsorção do reagente ou reagente e produto, a intensidade de I_p varia linearmente com a f . Diante do exposto, verifica-se que existe uma relação linear entre I_p e f para a daidzeína e genisteína, nos dois eletrólitos selecionados (**Figuras 40 A e B**), apesar dos desvios de linearidade apresentados. Este comportamento indica que o processo de redução destas isoflavonas sobre a superfície do eletrodo de Hg é irreversível e controlado por adsorção.

Analisando os voltamogramas representativos deste estudo nas **Figuras 41 A e B**, justifica-se a escolha das frequências de 150 Hz e 100 Hz para os tampões fosfato:etanol (8:2, v/v) e fosfato:metanol (8:2, v/v), respectivamente, pois estes valores fornecem melhores resultados na construção das curvas analíticas quanto a repetitividade e ainda foi observado que para f maiores ocorrem o alargamento da base dos picos de redução e o deslocamento gradativo para valores de potenciais mais negativos.

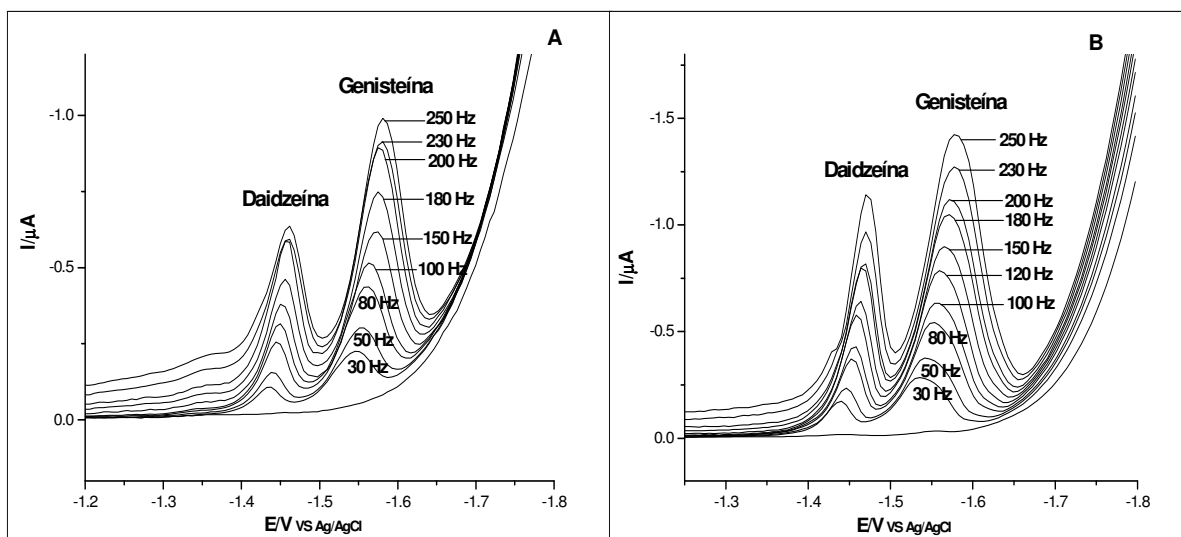


Figura 41: Voltamogramas de onda quadrada de redução da genisteína e daidzeína ($\approx 2,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$) em diferentes valores de frequência de aplicação dos pulsos. (A) Tampão fosfato:etanol (8:2, v/v), pH 7,5 - $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$, na presença de $2,04 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de surfactante BrCTA. Parâmetros: t_{ac} : 30 s; E_{ac} : -0,2 V; E_{sw} : 30 mV; ΔE_s : 6 mV. (B) Tampão fosfato:metanol (8:2, v/v), pH 7,5 - $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$, na presença de $2,21 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de surfactante BrCTA. Parâmetros: t_{ac} : 50 s; E_{ac} : 0 V; E_{sw} : 30 mV; ΔE_s : 6 mV.

3.2.2.5. Influência do incremento de varredura (ΔE_s)

A velocidade de varredura para voltametria de onda quadrada é obtido pelo produto da frequência pelo incremento de varredura (ΔE_s). Assim sendo, um aumento do incremento de varredura também leva a uma melhora na sensibilidade analítica. Porém, com incrementos de varredura elevados pode ocorrer o alargamento e comprometimento do sinal obtido (SOUZA *et al.*, 2003).

O efeito da variação de I_p de redução da daidzeína e genisteína para diferentes valores de ΔE_s , no intervalo de 2 a 12 mV, é apresentado nas **Figuras 42 A e B**, para os tampões fosfato:etanol (8:2, v/v) e fosfato:metanol (8:2, v/v), em pH 7,5.

A resolução dos voltamogramas para cada valor de ΔE_s (**Figuras 43 A e B**), levam a escolha de 5 e 6 mV para os tampões fosfato:etanol (8:2, v/v) e fosfato:metanol (8:2, v/v), respectivamente, pois a partir destes ΔE_s observa-se um alargamento mais significativo da linha base tanto para a daidzeína quanto para genisteína.

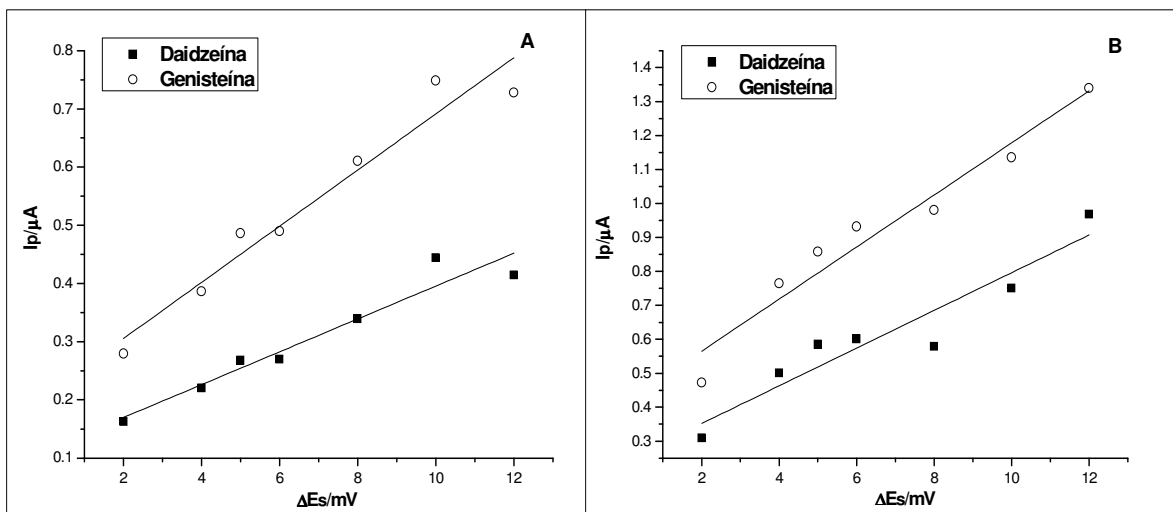


Figura 42: Efeito do incremento de varredura sobre I_p de redução da genisteína e daidzeína ($\approx 2,5 \cdot 10^{-6}$ mol.L⁻¹). (A) Tampão fosfato:etanol (8:2, v/v), pH 7,5 - 0,04 mol.L⁻¹, na presença de $2,04 \cdot 10^{-4}$ mol.L⁻¹ de surfactante BrCTA. Parâmetros: t_{ac} : 30 s; E_{ac} : -0,2 V; E_{sw} : 30 mV; f : 150 Hz. (B) Tampão fosfato:metanol (8:2, v/v), pH 7,5 - 0,04 mol.L⁻¹, na presença de $2,21 \cdot 10^{-4}$ mol.L⁻¹ de surfactante BrCTA. Parâmetros: t_{ac} : 50 s; E_{ac} : 0 V; E_{sw} : 30 mV; f : 100 Hz.

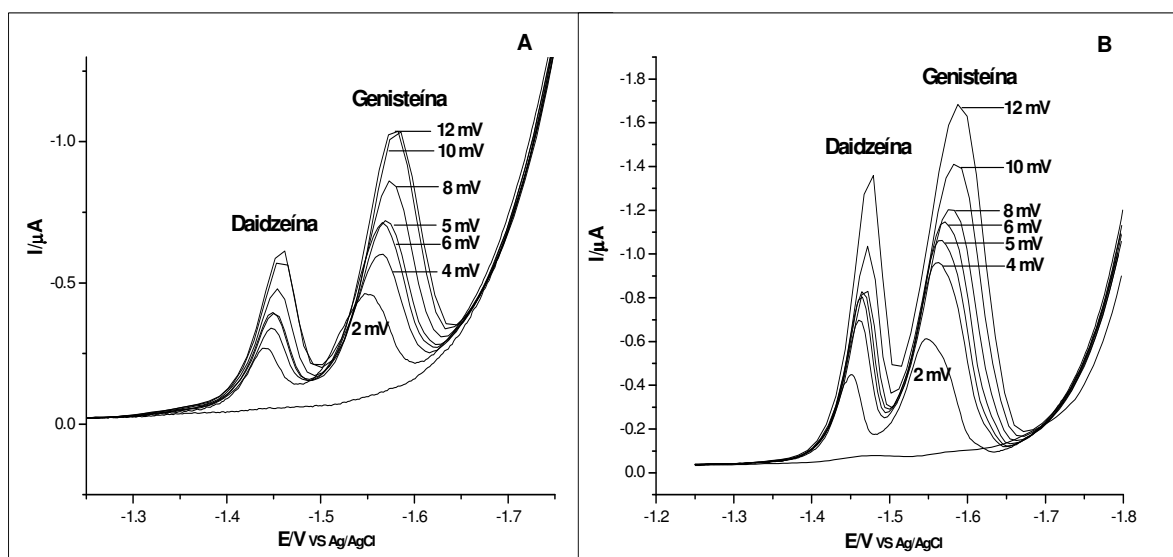


Figura 43: Voltamogramas de onda quadrada de redução da genisteína e daidzeína ($\approx 2,5 \cdot 10^{-6}$ mol.L⁻¹) em diferentes valores de incremento de varredura. (A) Tampão fosfato:etanol (8:2, v/v), pH 7,5 - 0,04 mol.L⁻¹, na presença de $2,04 \cdot 10^{-4}$ mol.L⁻¹ de surfactante BrCTA. Parâmetros: t_{ac} : 30 s; E_{ac} : -0,2 V; E_{sw} : 30 mV; f : 150 Hz. (B) Tampão fosfato:metanol (8:2, v/v), pH 7,5 - 0,04 mol.L⁻¹, na presença de $2,21 \cdot 10^{-4}$ mol.L⁻¹ de surfactante BrCTA. Parâmetros: t_{ac} : 50 s; E_{ac} : 0 V; E_{sw} : 30 mV; f : 100 Hz.

3.2.3. Parâmetros instrumentais otimizados

Após todo o estudo apresentado foi possível encontrar condições experimentais necessárias para a construção de curvas analíticas, nos dois eletrólitos estudados (tampão fosfato:etanol; 8:2, v/v e tampão fosfato:metanol; 8:2, v/v), visando à determinação simultânea de daidzeína e genisteína em derivados de soja. As condições eletroanalíticas obtidas são apresentadas na **Tabela 8**.

Tabela 8: Parâmetros instrumentais para análise de daidzeína e genisteína através da técnica de VOQ em tampão fosfato:etanol (8:2, v/v) e em tampão fosfato:metanol (8:2, v/v).

Parâmetros	Parâmetros selecionados	
	Tampão Fosfato:Etanol (8:2, v/v)	Tampão Fosfato:Metanol (8:2, v/v)
Tipo de eletrólito		
Concentração do eletrólito	0,04 mol.L ⁻¹	0,04 mol.L ⁻¹
pH	7,50	7,50
Concentração do BrCTA	2,04.10 ⁻⁴ mol.L ⁻¹	2,21.10 ⁻⁴ mol.L ⁻¹
Tempo de deposição	30 s	50 s
Potencial de deposição	-0,2 V	0 V
Amplitude do pulso	30 mV	30 mV
Frequência do pulso	150 Hz	100 Hz
Incremento de varredura	5 mV	6 mV
Área da gota de Hg	0,52 mm ²	0,52 mm ²
Tempo de equilíbrio	15 s	15 s

3.2.4. Validação da metodologia por VOQ

A validação de um método analítico é o processo de comprovação, através de evidências, de que os requisitos a uma determinada aplicação foram atendidos. Este processo visa diminuir ou controlar os fatores que levam à imprecisão ou inexatidão de um dado gerado, tais como: variabilidade da amostra, contaminação, reagentes inadequados, variações de temperatura, calibração ineficiente, analista despreparado e perdas durante a análise (GREEN, 1996).

Existem diversas formas de conduzir à validação de um método analítico. Alguns dos principais parâmetros avaliados são: exatidão, precisão, linearidade, curva analítica, limite de detecção, limite de quantificação e recuperação.

A exatidão do método analítico é o grau de concordância entre o valor médio obtido de uma série de resultados e o valor de referência aceito, podendo ser expressa em termos do erro relativo (E_r), (INMETRO DOQ-CGCRE-008, 2002).

Uma avaliação da exatidão pode ser feita pela comparação dos resultados obtidos com material de referência certificado ou com outro método validado. Outra forma é comparar a média dos resultados com a média de um programa interlaboratorial, ou ainda por meio de estudos de recuperação de quantidades conhecidas do analito adicionado na matriz da amostra (HORWITZ, 1980).

Precisão do método analítico consiste na reprodutibilidade dos resultados, ou seja, o grau de concordância entre resultados de medidas independentes em torno de um valor central, efetuadas várias vezes em uma amostra homogênea, sob condições pré-estabelecidas, sendo expressa em termos de desvio padrão (S) e desvio padrão relativo (RSD), (HORWITZ, 1980, DE BARROS, 2002).

Limite de detecção (LD) é a menor concentração do analito em uma amostra que produz uma resposta detectável, mas não necessariamente quantificável, sob determinadas condições experimentais. Já o limite de quantificação (LQ) é a menor concentração do analito que pode ser determinada quantitativamente, com precisão e exatidão aceitáveis, (GREEN, 1996).

Geralmente o LD e LQ são calculados a partir das seguintes equações:

$$LD = 3 \times DP_a/b \quad \text{(Equação 1)}$$

$$LQ = 10 \times DP_a/b \quad \text{(Equação 2)}$$

Onde, DP_a pode ser o desvio padrão do intercepto ou desvio padrão da média aritmética da corrente do branco, medida no potencial de pico da substância em estudo, e b é a média da inclinação da curva de calibração, obtido para a construção de no mínimo três curvas analíticas.

A Linearidade de um procedimento analítico corresponde à habilidade de produzir resultados que são diretamente proporcionais à concentração do analito dentro de uma faixa de aplicação. A faixa de aplicação do método analítico é validada verificando se o método fornece precisão, exatidão e linearidade aceitáveis quando aplicado a amostras contendo o analito nos extremos da faixa e dentro da mesma (DE BARROS, 2002).

3.2.4.1. Curvas analíticas para daidzeína e genisteína em tampão fosfato:etanol (8:2, v/v)

As curvas de calibração de daidzeína e genisteína foram construídas simultaneamente, no intervalo de concentração de $5,0 \cdot 10^{-7}$ a $2,2 \cdot 10^{-6}$ mol.L⁻¹, utilizando como eletrólito suporte o tampão fosfato:etanol (8:2, v/v), pH 7,5, pela técnica de VOQ. Na **Figura 44** são apresentados os voltamogramas das adições do padrão preparado com uma mesma concentração de daidzeína e genisteína.

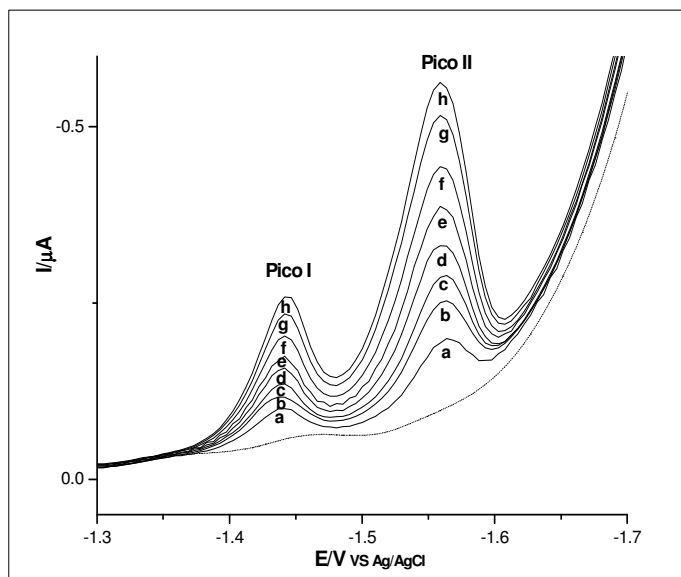


Figura 44: Voltamogramas de redução da daidzeína (Pico I) e genisteína (Pico II) em tampão fosfato:etanol (8:2, v/v) – pH 7,5 ($0,04 \text{ mol.L}^{-1}$), na presença de BrCTA ($2,04 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$); onde: (a) $5,0 \cdot 10^{-7}$, (b) $7,5 \cdot 10^{-7}$, (c) $9,9 \cdot 10^{-7}$, (d) $1,2 \cdot 10^{-6}$, (e) $1,5 \cdot 10^{-6}$, (f) $1,7 \cdot 10^{-6}$,

(g) $1,9 \cdot 10^{-6}$, (h) $2,2 \cdot 10^{-6}$ mol.L⁻¹. Parâmetros: t_{ac} : 30 s, E_{ac} : -0,2 V; f : 150 Hz, E_{sw} : 30 mV, ΔE_s : 5 mV.

As curvas de calibração apresentando a dependência de I_p em função da concentração de daidzeína e genisteína no intervalo de $5,0 \cdot 10^{-7}$ a $2,2 \cdot 10^{-6}$ mol.L⁻¹, podem ser observadas nas **Figuras 45 A e B**.

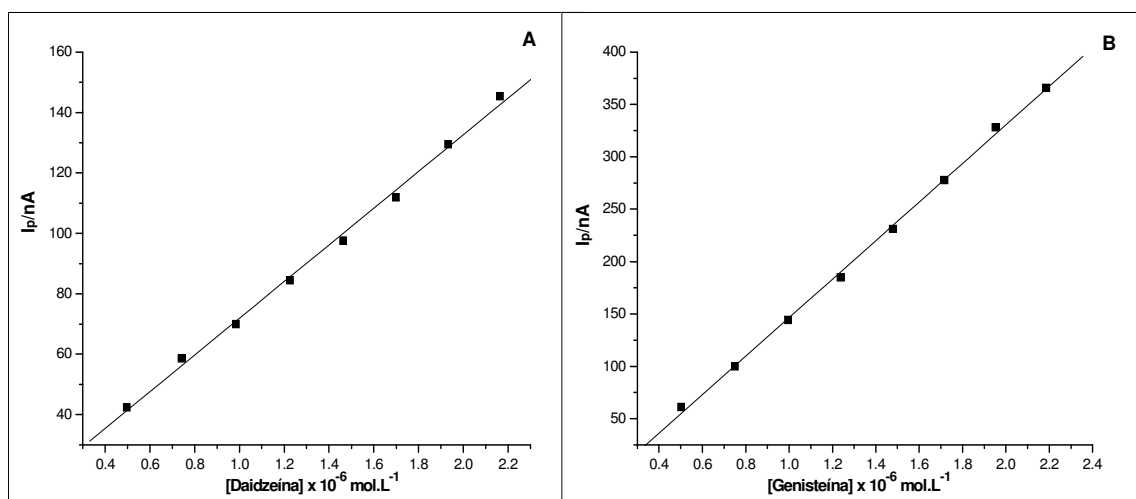


Figura 45: Curvas de calibração mostrando a dependência de I_p em função da concentração de daidzeína (A) e de genisteína (B), no intervalo de $5,0 \cdot 10^{-7}$ a $2,2 \cdot 10^{-6}$ mol.L⁻¹.

Os parâmetros obtidos para as curvas analíticas construídas em tampão fosfato:etanol (8:2, v/v) – pH 7,5, estão resumidos na **Tabela 9**. Os resultados apresentados foram obtidos pela média de cinco curvas analíticas e de acordo com estes dados foi possível obter os valores de LD e LQ para daidzeína e genisteína, que foram calculados a partir do desvio padrão da média aritmética da corrente de 10 voltamogramas do branco, medida na região do E_p do analito.

As curvas de calibração obtidas apresentaram coeficientes de correlação médio de 0,9983 e 0,9992 para as curvas de daidzeína e genisteína, respectivamente, fornecendo portanto uma boa linearidade.

Os limites de detecção e de quantificação do instrumento obtidos pelas **Equações 1** e **2** foram de $1,49 \cdot 10^{-7}$ e $4,97 \cdot 10^{-7}$ mol.L⁻¹ para daidzeína e de $8,16 \cdot 10^{-8}$ e $2,72 \cdot 10^{-7}$ mol.L⁻¹ para genisteína, respectivamente, para o intervalo de concentração entre $5,0 \cdot 10^{-7}$ e $2,2 \cdot 10^{-6}$ mol.L⁻¹. Estes limites de detecção e quantificação encontrados permitem uma quantificação adequada das isoflavonas agliconas em derivados de soja, pois geralmente as

concentrações mínimas destas variam entre 10 a 150 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de amostra (BARNES, 1995; GENOVESE & LAJOLO, 2001; WANG *et al.*, 1990 e SONG *et al.*, 1998).

Tabela 9: Parâmetros estudados para a validação do método eletroanalítico na análise de daidzeína e genisteína em tampão fosfato:etanol (8:2, v/v), através da técnica de VOQ.

Parâmetros	Curva Daidzeína	Curva Genisteína
Intervalo de concentração (mol.L^{-1})	$5,0.10^{-7} - 2,2.10^{-6}$	$5,0.10^{-7} - 2,2.10^{-6}$
I_p do branco (nA)*	64,48	124,89
DP_a	$4,51.10^{-9}$	$5,01.10^{-9}$
Inclinação* (A.L.mol^{-1})	$9,07.10^{-2}$	$18,41.10^{-2}$
Coefficiente de correlação (r)*	0,9983	0,9992
LD (mol.L^{-1})	$1,49 \times 10^{-7}$	$8,16 \times 10^{-8}$
LQ (mol.L^{-1})	$4,97 \times 10^{-7}$	$2,72 \times 10^{-7}$

* média de cinco curvas de calibração.

LD = limite de detecção.

LQ = limite de quantificação.

3.2.4.2. Curvas analíticas para daidzeína e genisteína em tampão fosfato:metanol (8:2, v/v)

As curvas de calibração de daidzeína e genisteína foram também construídas utilizando o tampão fosfato:metanol (8:2, v/v), pH 7,5, no intervalo de concentração de $1,5.10^{-7}$ a $1,1.10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$, pela técnica de VOQ.

Os voltamogramas das adições sucessivas da solução padrão contendo daidzeína e genisteína ($5,0.10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) e as curvas de calibração construídas a partir da resposta de I_p em função da concentração destas isoflavonas agliconas, no intervalo de $1,5.10^{-7}$ a $1,1.10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$, podem ser observadas nas **Figuras 46 e 47 A e B**, respectivamente.

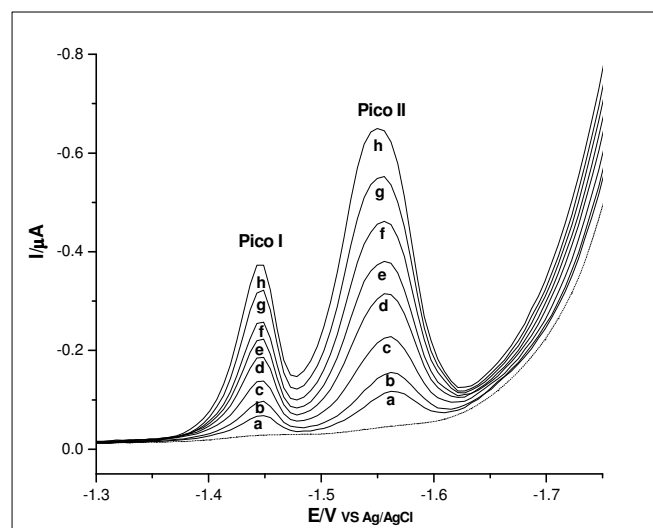


Figura 46: Voltamogramas de redução da daidzeína (Pico I) e genisteína (Pico II) em tampão fosfato:metanol (8:2, v/v) – pH 7,5 ($0,04 \text{ mol.L}^{-1}$), na presença de BrCTA ($2,21 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$); onde: (a) $1,5 \cdot 10^{-7}$, (b) $2,5 \cdot 10^{-7}$, (c) $4,0 \cdot 10^{-7}$, (d) $5,5 \cdot 10^{-7}$, (e) $7,0 \cdot 10^{-7}$, (f) $8,4 \cdot 10^{-7}$, (g) $9,9 \cdot 10^{-7}$, (h) $1,1 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$. Parâmetros: t_{ac} : 50 s, E_{ac} : 0 V; f : 100 Hz, E_{sw} : 30 mV, ΔE_s : 6 mV.

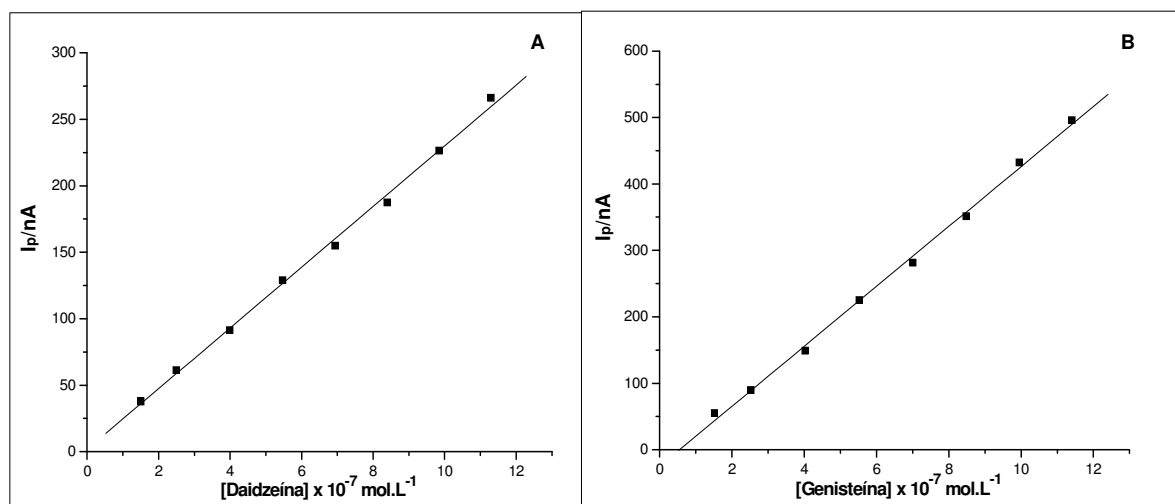


Figura 47: Curvas de calibração mostrando a dependência de I_p em função da concentração de daidzeína (A) e de genisteína (B), no intervalo de $1,5 \cdot 10^{-7}$ a $1,1 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$.

Assim como para o outro eletrólito estudado, foram construídas cinco curvas analíticas em tampão fosfato:metanol (8:2, v/v) – pH 7,5 e através destas obteve-se os

valores médios dos parâmetros, sendo possível calcular os limites de detecção e quantificação, como descrito anteriormente.

As curvas de calibração obtidas forneceram uma boa linearidade, com coeficientes de correlação médio encontrados para as curvas de daidzeína e genisteína de 0,9986 e 0,9988, respectivamente (**Tabela 10**). Os limites de detecção e de quantificação do instrumento obtidos foram de $5,61 \cdot 10^{-8}$ e $1,87 \cdot 10^{-7}$ mol.L⁻¹ para daidzeína e de $3,43 \cdot 10^{-8}$ e $1,14 \cdot 10^{-7}$ mol.L⁻¹ para genisteína, respectivamente, para o intervalo de concentração de $1,5 \cdot 10^{-7}$ a $1,1 \cdot 10^{-6}$ mol.L⁻¹. Estes limites de detecção e de quantificação encontrados mostraram-se mais baixos que para o outro eletrólito suporte (**Tabela 9**), proporcionando um aumento na sensibilidade do método.

Tabela 10: Parâmetros estudados para a validação do método eletroanalítico na análise de daidzeína e genisteína em tampão fosfato:metanol (8:2, v/v), através da técnica de VOQ.

Parâmetros	Curva Daidzeína	Curva Genisteína
Intervalo de concentração (mol.L ⁻¹)	$1,5 \cdot 10^{-7} - 1,1 \cdot 10^{-6}$	$1,5 \cdot 10^{-7} - 1,1 \cdot 10^{-6}$
I _p do branco (nA)*	48,15	84,28
DP _a	$4,27 \cdot 10^{-9}$	$5,16 \cdot 10^{-9}$
Inclinação* (A.L.mol ⁻¹)	$22,82 \cdot 10^{-2}$	$45,13 \cdot 10^{-2}$
Coeficiente de correlação (r)*	0,9986	0,9988
LD (mol.L ⁻¹)	$5,61 \times 10^{-8}$	$3,43 \times 10^{-8}$
LQ (mol.L ⁻¹)	$1,87 \times 10^{-7}$	$1,14 \times 10^{-7}$

* média de cinco curvas de calibração.

LD = limite de detecção.

LQ = limite de quantificação.

Após um estudo prévio utilizando ambas as metodologias desenvolvidas na análise das isoflavonas em amostras de farinha de soja, optou-se por trabalhar com a metodologia otimizada em tampão fosfato:metanol (8:2, v/v) – pH 7,5 (0,04 mol.L⁻¹), pois esta forneceu uma melhor resposta de I_p de redução das isoflavonas, o que foi de fundamental importância porque o efeito de matriz destas amostras eleva consideravelmente os valores de corrente da linha de base e dificulta a definição dos picos de interesse.

3.3. Perfil voltamétrico das isoflavonas glicosiladas, daidzina e genistina

Uma avaliação importante a ser realizada, antes da aplicação da metodologia desenvolvida na determinação de isoflavonas agliconas em amostras de soja, é a do comportamento de redução eletroquímica das isoflavonas em sua forma glicosilada.

Sob as mesmas condições otimizadas para redução simultânea de daidzeína e genisteína (**Tabela 8**), os comportamentos voltamétricos da daidzina e genistina foram estudados (**Figuras 48 A e B**). Nos voltamogramas abaixo observam-se que a daidzina apresenta apenas um pico de redução bem definido com E_p igual a $-1,40$ V vs Ag/AgCl (**Figura 48 A**), enquanto que a genistina apresenta dois picos de redução com $E_{p1} = -1,43$ V vs Ag/AgCl e $E_{p2} = -1,49$ V vs Ag/AgCl (**Figura 48 B**). Estes potenciais de redução dos picos da daidzina e da genistina estão muito próximos e, sob estas condições, impossibilita a análise das isoflavonas glicosiladas individualmente. Porém, o interesse do estudo é de verificar se estas isoflavonas glicosil conjugadas interferem na redução da daidzeína e genisteína, já que há uma grande diversificação destas formas isoflavônicas nas amostras de soja.

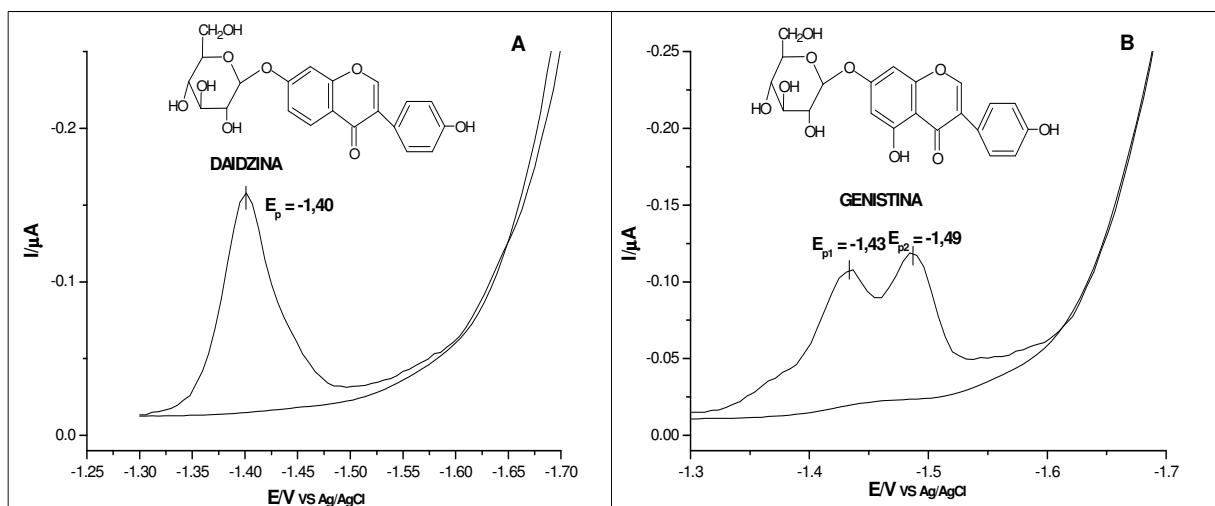


Figura 48: Perfil voltamétrico das isoflavonas glicosiladas (A) Solução contendo $1,2 \cdot 10^{-5}$ mol.L⁻¹ de daidzina (B) Solução contendo $3,0 \cdot 10^{-6}$ mol.L⁻¹ de genistina. Branco: tampão fosfato:metanol (8:2, v/v) – pH 7,5 ($0,04$ mol.L⁻¹), na presença de BrCTA ($2,21 \cdot 10^{-4}$ mol.L⁻¹). Parâmetros: t_{ac} : 50 s, E_{ac} : 0 V; f : 100 Hz, E_{sw} : 30 mV, ΔE_s : 6 mV.

Assim sendo, o comportamento de redução da genisteína na presença da daidzina (**Figura 49 A**) e da genistina (**Figura 49 B**) foi estudado. Nota-se que embora haja um deslocamento no E_p e uma mudança no perfil voltamétrico destas isoflavonas em relação ao comportamento de redução individual de cada, as isoflavonas glicosiladas não interferiram no pico de redução da genisteína.

A daidzina apresenta um $E_p = -1,41$ V vs Ag/AgCl, havendo um intervalo de potencial de 180 mV em relação ao E_p da genisteína ($E_p = -1,59$ V vs Ag/AgCl). Já a genistina apresentou uma distorção no perfil de seus dois picos de redução na presença da genisteína devido a uma aproximação do pico 1 ($E_{p1} = -1,45$ V vs Ag/AgCl) em relação ao pico 2 ($E_{p2} = -1,49$ V vs Ag/AgCl), mas mesmo assim o pico 2 de redução da genistina manteve-se a um intervalo de 100 mV em relação ao pico da genisteína ($E_p = -1,59$ V vs Ag/AgCl). Portanto, a quantificação de genisteína em produtos de soja poderá ser realizada sem a interferência de compostos similares como é o caso das isoflavonas glicosiladas.

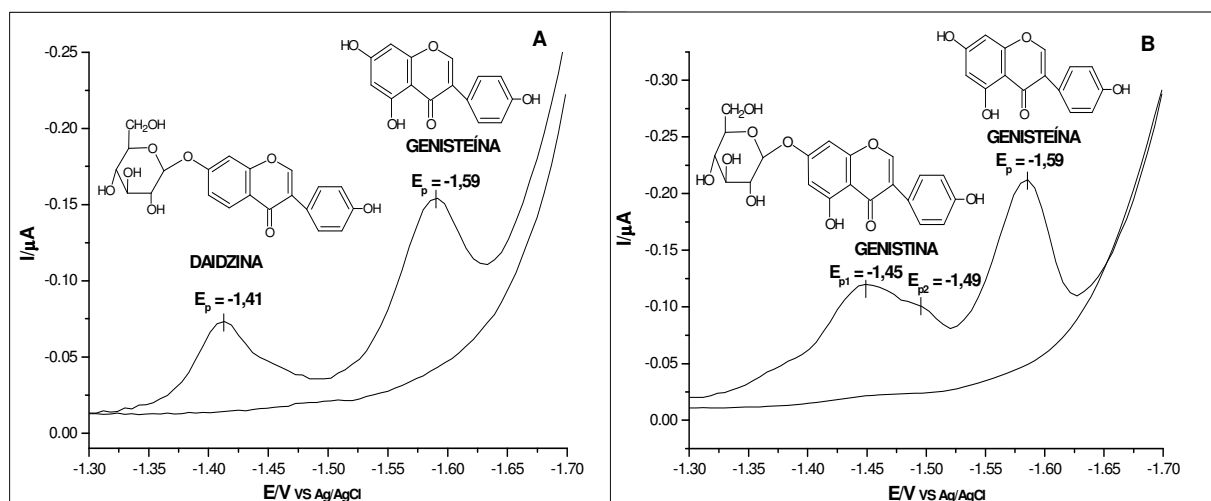


Figura 49: Influência da redução das isoflavonas glicosiladas em relação à redução da genisteína (**A**) Solução contendo $6,5 \cdot 10^{-6}$ mol.L⁻¹ de daidzina e $4,5 \cdot 10^{-7}$ mol.L⁻¹ de genisteína (**B**) Solução contendo $3,0 \cdot 10^{-6}$ mol.L⁻¹ de genistina e $4,5 \cdot 10^{-7}$ mol.L⁻¹ de genisteína. Branco: tampão fosfato:metanol (8:2, v/v) – pH 7,5 ($0,04$ mol.L⁻¹), na presença de BrCTA ($2,21 \cdot 10^{-4}$ mol.L⁻¹). Parâmetros: t_{ac} : 50 s, E_{ac} : 0 V; f : 100 Hz, E_{sw} : 30 mV, ΔE_s : 6 mV.

Visando também a determinação de daidzeína em produtos de soja, o comportamento de redução das isoflavonas glicosiladas (daidzina e genistina) foi estudado

na presença deste composto. Na **Figura 50 A** observa-se que a daidzina apresenta um E_p em $-1,41$ V vs Ag/AgCl e apesar de se reduzir mais facilmente que a daidzeína (com $E_p = -1,47$ V vs Ag/AgCl) os picos de redução destes compostos estão muito próximos dificultando a análise.

Quando se verifica o comportamento voltamétrico da genistina (**Figura 50 B**) frente à daidzeína, nota-se que os picos de redução destes compostos se sobrepõem impossibilitando uma distinção se analisados simultaneamente. Porém, as matrizes das amostras de alimentos e medicamentos de soja apresentam uma grande variabilidade quanto ao conteúdo de isoflavonas e outros compostos, então a quantificação de daidzeína não pode ser descartada antes de verificar o perfil voltamétrico das amostras e, se possível esta quantificação, os resultados serão comparados com CLAE para se certificar de que as isoflavonas glicosiladas não estejam interferindo nestas análises, validando os resultados.

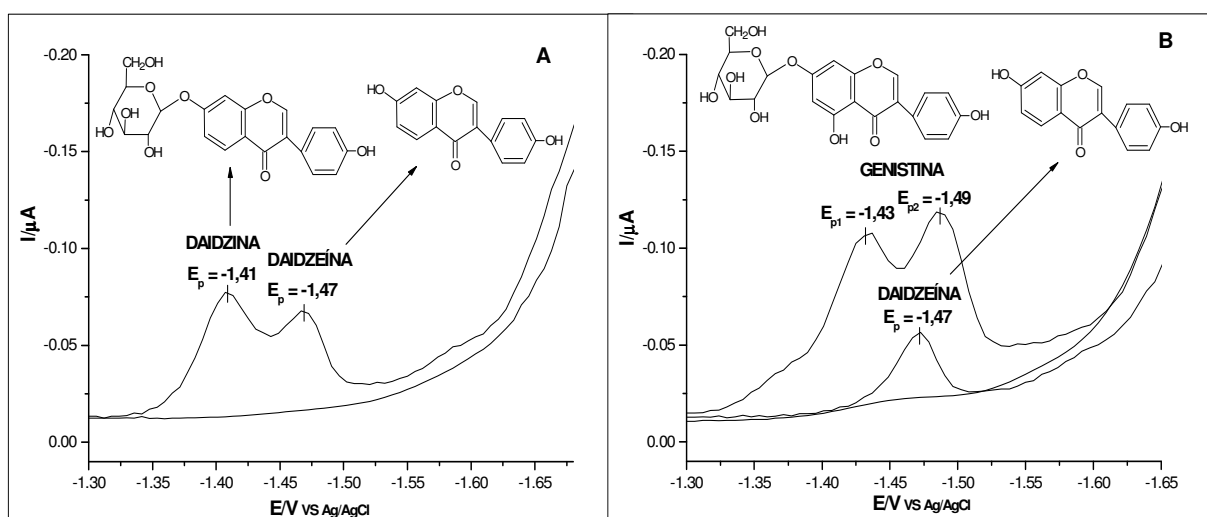


Figura 50: Influência da redução das isoflavonas glicosiladas em relação à redução da daidzeína (A) Solução contendo $6,6 \cdot 10^{-6}$ mol.L $^{-1}$ de daidzina e $2,2 \cdot 10^{-7}$ mol.L $^{-1}$ de daidzeína (B) Solução contendo $3,0 \cdot 10^{-6}$ mol.L $^{-1}$ de genistina e $2,2 \cdot 10^{-7}$ mol.L $^{-1}$ de daidzeína. Branco: tampão fosfato:metanol (8:2, v/v) – pH 7,5 ($0,04$ mol.L $^{-1}$), na presença de BrCTA ($2,21 \cdot 10^{-4}$ mol.L $^{-1}$). Parâmetros: t_{ac} : 50 s, E_{ac} : 0 V; f : 100 Hz, E_{sw} : 30 mV, ΔE_s : 6 mV.

3.4. Aplicação da metodologia eletroanalítica na determinação das isoflavonas agliconas em farinha de soja

3.4.1. Determinação e recuperação de genisteína em farinha de soja por extração simples

De início, foi necessária uma escolha adequada do solvente para extração das isoflavonas em amostras de farinha de soja. De acordo com os estudos publicados, os melhores solventes para extração das isoflavonas agliconas ou em suas formas glucosídeo-conjugadas em variados produtos de soja foram: metanol 80% (IRVINE *et al.*, 1998; GENOVESE & LAJOLO, 2001; LIGGINS *et al.*, 2002) e acetonitrila aquosa acidificada em diferentes proporções (WANG & MURPHY, 1994; SONG *et al.*, 1998; ACOURI *et al.*, 2005).

Utilizando-se da metodologia descrita no **item 2.3.1.** foi realizada uma comparação entre as extrações com: **a)** metanol aquoso a 80% e **b)** CH₃CN:H₂O:HCl (0,1 mol.L⁻¹) na proporção 10:7:2 (v/v).

Para as análises foram preparadas três amostras para extração com metanol aquoso a 80% e outras três amostras para extração com CH₃CN:H₂O:HCl-0,1 mol.L⁻¹ (10:7:2, v/v), na proporção 10:7:2 (v/v), sendo que cada amostra foi analisada por VOQ em triplicata a fim de avaliar a repetibilidade do método. Os voltamogramas de uma destas análises após a extração com cada solvente estão representados nas **Figuras 51 A e B.**

Nota-se, pelo perfil voltamétrico do extrato de farinha de soja, que não é possível a determinação de daidzeína devido à interferência das isoflavonas glicosiladas (já discutido anteriormente), portanto a escolha do melhor solvente de extração foi baseada na quantificação de genisteína nestas amostras.

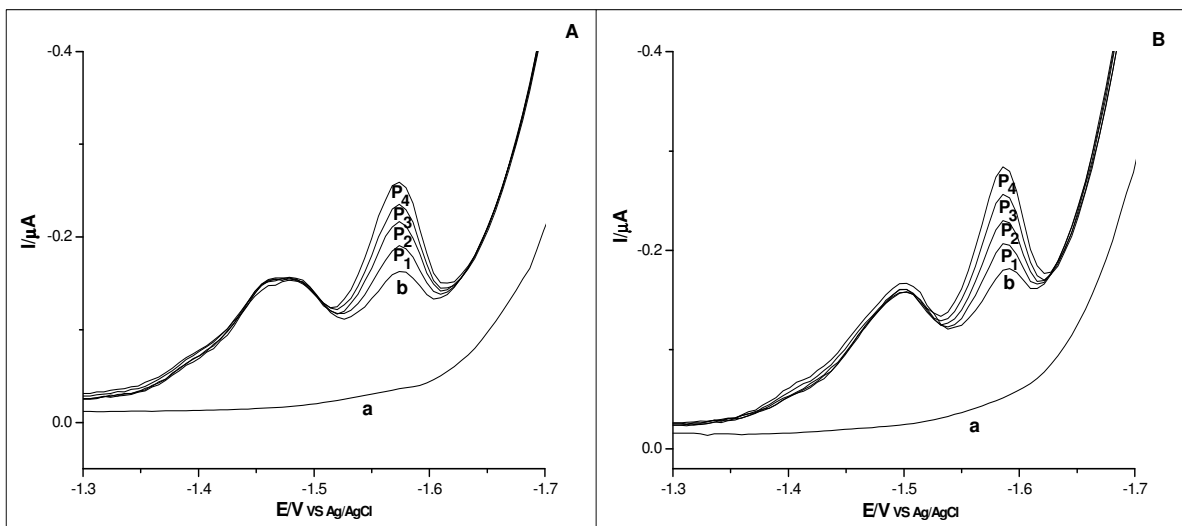


Figura 51: Voltamogramas de onda quadrada referente a análise de determinação de genisteína em amostras de farinha de soja – (A) Após extração com metanol aquoso a 80%; (B) Após extração com $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}:\text{HCl}$ (0,1 mol.L⁻¹), na proporção 10:7:2 (v/v); onde: (a) Branco: tampão fosfato:metanol (8:2, v/v) – pH 7,5 (0,04 mol.L⁻¹), na presença de BrCTA (2,21.10⁻⁴ mol.L⁻¹); (b) 100 μL do extrato de farinha de soja; (P₁ – P₄) adições do padrão de genisteína. Parâmetros: t_{ac} : 50 s, E_{ac} : 0 V; f : 100 Hz, E_{sw} : 30 mV, ΔE_s : 6 mV.

Primeiramente, foi realizado o estudo de recuperação da genisteína pelo método de adição de padrão. Neste método a recuperação é calculada pelas respostas de I_p obtidas pela adição da amostra e pelas posteriores adições do padrão. O valor de I_p da amostra é subtraído de todas as I_p obtidas pelas adições de padrão. Então, a primeira adição do padrão é considerada como tendo uma concentração desconhecida (de valor igual a zero) e esta é determinada por extrapolação da reta obtida pelas adições dos padrões posteriores (P₂, P₃ e P₄). Desta forma, a concentração encontrada para o padrão 1 (P₁) é comparado com o seu valor adicionado, obtendo a recuperação de cada análise.

Nas **Figuras 52 A e B** estão representadas as curvas de recuperação de uma das análises da extração com metanol aquoso (80%) e da extração com acetonitrila aquosa acidificada, respectivamente. A adição P₁ de genisteína foi de 1,126.10⁻⁷ mol.L⁻¹, mas como pode-se observar nas curvas de recuperação apresentadas, P₁ foi tomada como uma concentração desconhecida (zero) e foi obtida para cada análise. As porcentagens de recuperação foram calculadas em triplicatas e os resultados são apresentados na **Tabela 11**.

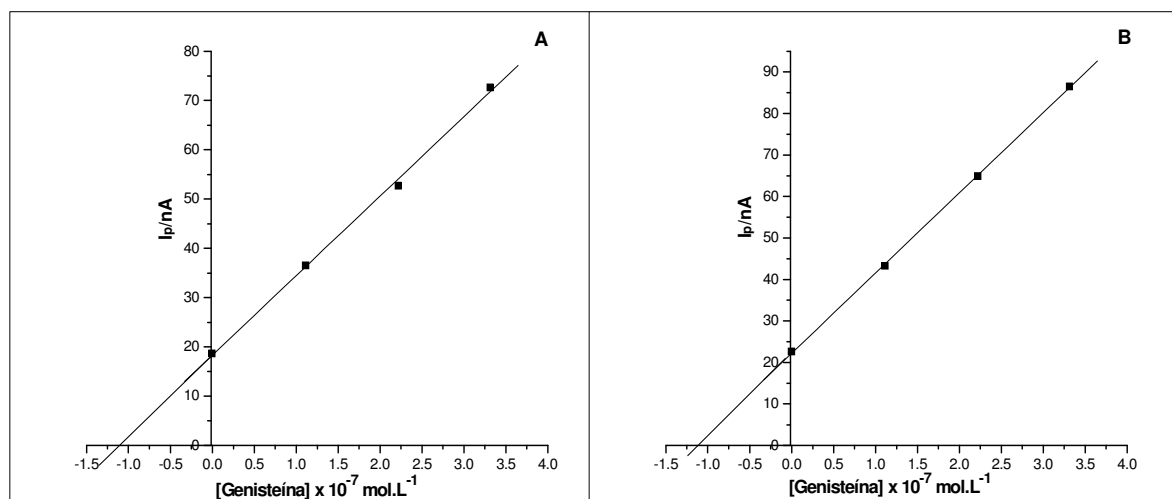


Figura 52: Curvas de recuperação de genisteína em farinha de soja – (A) Após extração com metanol aquoso a 80%; (B) Após extração com $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}:\text{HCl}$ (0,1 mol.L⁻¹), na proporção 10:7:2 (v/v).

Tabela 11: Resultados do estudo de recuperação de genisteína em amostras de farinha de soja por extração simples, através da técnica de VOQ.

Amostra	Adição/ mol.L ⁻¹	[Gen.]/ mol.L ⁻¹	R./ %	R _M / %	S	RSD/ %	[Gen.] _M / mol.L ⁻¹	E _r / %
Farinha de soja (metanol aquoso)		1,134.10 ⁻⁷	100,73					
	1,126.10 ⁻⁷	1,174.10 ⁻⁷	104,31	101,52	2,495	2,457	1,143.10 ⁻⁷	1,515
		1,120.10 ⁻⁷	99,51					
Farinha de soja (acetonitrila acidificada aquosa)		1,150.10 ⁻⁷	102,16					
	1,126.10 ⁻⁷	1,160.10 ⁻⁷	103,05	100,20	4,183	4,175	1,128.10 ⁻⁷	0,202
		1,074.10 ⁻⁷	95,40					

Onde: [Gen.] = Concentração de genisteína encontrada pelo método.

R. = Recuperação do método.

R_M = Média obtida pelas triplicatas da recuperação.

S = Desvio Padrão das recuperações.

RSD = Desvio Padrão Relativo das recuperações.

[Gen.]_M = Média das concentrações de genisteína encontradas pelo método.

E_r = Erro Relativo entre o valor adicionado e o valor encontrado das concentrações de genisteína.

Bons valores de recuperação foram encontrados de acordo com os resultados da **Tabela 11**. Para a amostra de farinha de soja extraída com metanol aquoso (80%), estes valores variaram entre 99,51 e 104,31%; e para amostra de farinha de soja extraída com acetonitrila aquosa acidificada as recuperações variaram entre 95,40 e 103,05%.

A precisão do método na análise de genisteína foi avaliada em termos do desvio padrão (S) e desvio padrão relativo (RSD), assim como a exatidão foi avaliada pelo erro relativo (E_r) através da comparação com o padrão de genisteína que é tido como um material de referência certificado. De acordo com o INMETRO (2003), os critérios de aceitação em ensaios de recuperação devem obedecer a faixa de $80 \leq \% \text{ de recuperação} \leq 120$ e o RSD deve ter uma porcentagem menor que 15%.

Assim sendo, os resultados se apresentaram satisfatórios após as extrações com os dois solventes e mostraram a viabilidade do método quanto a sua aplicação em amostras de farinha de soja. As análises de genisteína foram então realizadas e as curvas analíticas para quantificação deste analito após a extração com os dois solventes estão representadas pelas **Figuras 53 A e B**.

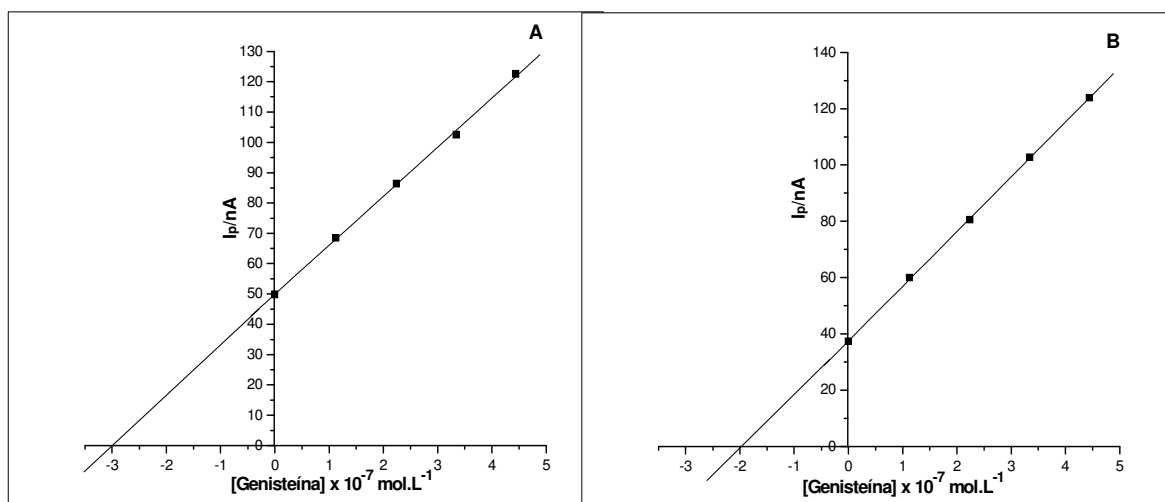


Figura 53: Dependência de I_p com a concentração de genisteína para sua quantificação em farinha de soja – (A) Após extração com metanol aquoso a 80%; (B) Após extração com $CH_3CN:H_2O:HCl$ (0,1 mol.L⁻¹), na proporção 10:7:2 (v/v).

As concentrações de genisteína e os valores de desvio padrão e desvio padrão relativo das análises em farinha de soja são apresentados na **Tabela 12**. Os resultados apresentaram valores de S e RSD satisfatórios e as concentrações obtidas pela extração

com metanol aquoso (80%) e com $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}:\text{HCl}$ (0,1 mol.L⁻¹), na proporção 10:7:2 (v/v) foram comparados.

Nota-se que a média das concentrações encontradas pela extração com metanol a 80% (igual a 0,0594 $\mu\text{g.g}^{-1}$) foi aproximadamente 1,5 vezes maior que a concentração média obtida por extração com acetonitrila aquosa acidificada (igual a 0,0400 mg.g^{-1}). Desta forma, a escolha do metanol aquoso (80%) para as demais extrações fica justificada pela praticidade e melhor eficiência apresentadas.

Tabela 12: Determinação de genisteína em amostras de farinha de soja por extração simples, através da técnica de VOQ.

Amostra	[Gen.]/ mg.g^{-1}	[Gen.] _M / mg.g^{-1}	S	RSD/ %
Farinha de soja (metanol aquoso)	0,0609	0,0594	0,0014	2,284
	0,0589			
	0,0584			
Farinha de soja (acetonitrila acidificada aquosa)	0,0427	0,0400	0,0033	8,348
	0,0378			
	0,0368			

Onde: [Gen.] = Concentração de genisteína na amostra encontrada pelo método.

[Gen.]_M = Média das concentrações de genisteína.

S = Desvio Padrão das determinações.

RSD = Desvio Padrão Relativo das determinações.

3.4.2. Determinação e recuperação de genisteína em farinha de soja por extração em fase sólida (EFS)

Avaliou-se o processo de extração em fase sólida visando a determinação de isoflavonas em produtos de soja nos quais os teores muito baixos e/ou a presença de interferentes dificultariam a análise direta dos extratos metanólicos obtidos por extração simples (item 2.3.1.).

Os eluatos contendo isoflavonas foram obtidos partindo-se do preparo de 5 amostras de farinha de soja de acordo com o procedimento descrito no item 2.3.2. e foram

analisados em triplicata pela metodologia desenvolvida em tampão fosfato:metanol (8:2, v/v) – pH 7,5 ($0,04 \text{ mol.L}^{-1}$) com adição do surfactante catiônico BrCTA. Na **Figura 54** são apresentados os voltamogramas ilustrando uma das análises de genisteína em amostra de farinha de soja após a EFS.

Comparando-se os voltamogramas das amostras de farinha de soja obtidas após a extração simples com metanol a 80% (**Figura 51 A**) e após a EFS (**Figura 54**), nota-se que os picos das isoflavonas glicosiladas (daidzina e genistina) e da daidzeína que se apresentam com E_p próximos (no intervalo entre $-1,39 \text{ V vs Ag/AgCl}$ e $-1,49 \text{ V vs Ag/AgCl}$) e com uma resposta de corrente elevada para a extração simples, diminuem significativamente quando submetidos a EFS. A diminuição deste efeito de matriz demonstra que a EFS é mais adequada para a quantificação de genisteína em farinha de soja e esta afirmação é comprovada pelos resultados de recuperação e determinação apresentados nas **Tabelas 13 e 14**.

De forma a representar a curva de recuperação de genisteína obtida em uma das análises, a **Figura 55 A** é apresentada. A recuperação foi calculada para cada análise realizada, conforme já detalhado anteriormente, obtendo os resultados expressos na **Tabela 13**. As porcentagens de recuperação média, obtidas para as cinco amostras, variaram entre 96,08 e 103,32%, com RSD menor que 3,1% e a exatidão avaliada em termos de erro relativo foi ótima, com um percentual menor que 0,5%.

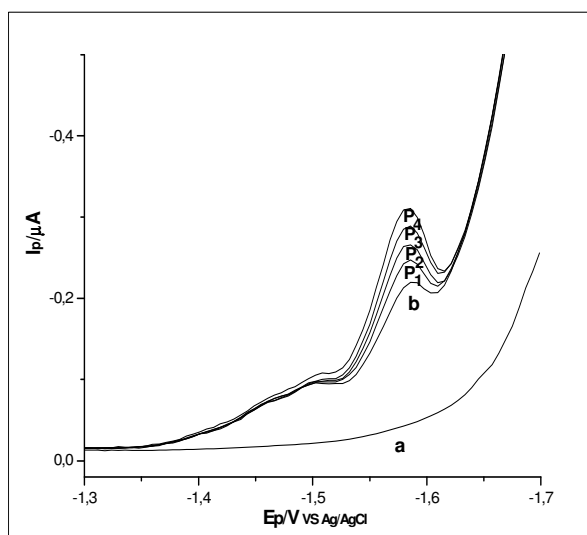


Figura 54: Voltamogramas de onda quadrada referente a análise de determinação de genisteína em farinha de soja utilizando extração em fase sólida (EFS); onde: (a) Branco: tampão fosfato:metanol (8:2, v/v) – pH 7,5 ($0,04 \text{ mol.L}^{-1}$), na presença de BrCTA ($2,21 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$).

⁴ mol.L⁻¹); (b) 50 µL do eluato com isoflavonas; (P₁ – P₄) adições de padrão de genisteína. Parâmetros: *t_{ac}*: 50 s, *E_{ac}*: 0 V; *f*: 100 Hz, *E_{sw}*: 30 mV, Δ*E_s*: 6 mV.

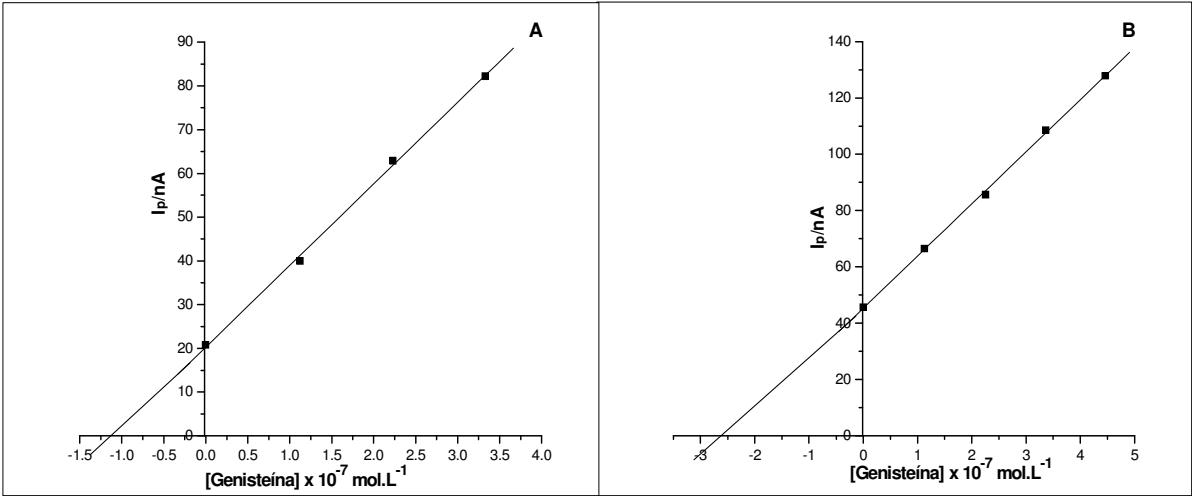


Figura 55: Dependência de *I_p* com a concentração de genisteína. (A) Curva de recuperação de uma das análises de genisteína em farinha de soja após EFS; (B) Curva de quantificação de uma das análises de genisteína em farinha de soja após EFS.

Tabela 13: Resultados do estudo de recuperação de genisteína em amostras de farinha de soja por EFS, através da técnica de VOQ.

Amostra	Adição/ mol.L ⁻¹	[Gen.]/ mol.L ⁻¹	R./ %	R _M / %	S	RSD/ %	[Gen.] _M / mol.L ⁻¹	E _r / %
Farinha de soja (por EFS)		1,087.10 ⁻⁷	96,08					
		1,169.10 ⁻⁷	103,32					
	1,132.10 ⁻⁷	1,116.10 ⁻⁷	98,56	99,65	3,072	3,082	1,128.10 ⁻⁷	0,353
		1,159.10 ⁻⁷	102,36					
		1,108.10 ⁻⁷	97,92					

Onde: [Gen.] = Concentração de genisteína encontrada pelo método.
R. = Recuperação do método.
R_M. = Média obtida pelas triplicatas da recuperação.
S = Desvio Padrão das recuperações.
RSD = Desvio Padrão Relativo das recuperações.
[Gen.]_M. = Média de concentrações de genisteína encontradas pelo método.
E_r = Erro Relativo entre o valor adicionado e o valor encontrado das concentrações de genisteína.

Para as determinações de genisteína foram construídas as curvas de I_p versus concentração (como representado pela **Figura 55 B**) e pela equação da reta obtida para cada análise, o conteúdo de genisteína das amostras foi quantificado.

As análises foram realizadas em triplicata para cada amostra preparada e as concentrações de genisteína, os valores de desvio padrão e desvio padrão relativo são apresentados na **Tabela 14**. Os resultados apresentaram uma boa precisão com valores de S igual a $\pm 0,003$ e RSD igual a 2,0%.

A média das concentrações de genisteína encontradas após a EFS em farinha de soja foi de $0,132 \text{ mg.g}^{-1}$. Este valor foi aproximadamente 2,2 vezes maior que a concentração média obtida por extração com metanol aquoso a 80% (igual a $0,0594 \text{ mg.g}^{-1}$, **Tabela 12**). Portanto, o uso da extração em fase sólida ocasiona uma diminuição dos interferentes, gerando uma resposta de I_p de genisteína mais elevada e, proporcionalmente, as concentrações encontradas são maiores.

Tabela 14: Determinação de genisteína em amostras de farinha de soja por EFS, através da técnica de VOQ.

Amostra	[Gen.]/ mg.g^{-1}	[Gen.] _M / mg.g^{-1}	S	RSD/ %
Farinha de soja (por EFS)	0,1304	0,132	0,0026	1,968
	0,1338			
	0,1290			
	0,1312			
	0,1354			

Onde: [Gen.] = Concentração de genisteína na amostra encontrada pelo método.

[Gen.]_M = Média das concentrações de genisteína.

S = Desvio Padrão das determinações.

RSD = Desvio Padrão Relativo das determinações.

3.5. Aplicação da metodologia eletroanalítica na determinação das isoflavonas agliconas em medicamentos fitoterápicos

A pesquisa em torno de medicamentos fitoterápicos vendidos deliberadamente levanta uma preocupação devido à grande variabilidade das matérias-primas utilizadas. No caso de medicamentos que possuem as isoflavonas como princípio ativo, esta ressalva torna-se ainda mais preocupante, pois na própria soja estão presentes 12 compostos pertencentes a esta classe (KUDOU *et al.*, 1991).

Estudos *in vitro* (WOBER *et al.*, 2002) e em modelos animais (BRANHAM *et al.*, 2002) demonstraram que as diversas isoflavonas de soja apresentam diferenças em relação à atividade biológica. A genisteína, por exemplo, é considerada a isoflavona com maior atividade estrogênica *in vivo*, sendo cerca de dez vezes mais ativa do que daidzeína (BRANHAM *et al.*, 2002). Apesar do extrato seco de soja ser padronizado em relação ao teor de isoflavonas totais, parece não haver preocupação em relação aos teores individuais das isoflavonas nas matérias-primas.

Por este fato, um controle de qualidade que permita a determinação individual das isoflavonas que apresentam uma maior bioatividade, principalmente em produtos vendidos com fins terapêuticos, é de extrema importância. Então, a metodologia foi aplicada em medicamentos fitoterápicos de diferentes marcas.

3.5.1. Determinação e recuperação de genisteína no medicamento fitoterápico A por extração simples e por extração em fase sólida

A aplicação da metodologia desenvolvida por VOQ para a quantificação das isoflavonas agliconas no medicamento fitoterápico A se deu como descrito para as amostras de farinha de soja, avaliando-se os processos de extração simples (item 2.3.1.) e EFS (item 2.3.2.). No entanto, como o solvente metanol a 80% apresentou uma maior eficiência no processo de extração simples em farinha de soja, ele já foi selecionado para a utilização nas demais amostras estudadas.

Tratando-se de medicamentos, as cápsulas contendo o extrato seco de gérmen de soja foram abertas e o conteúdo homogeneizado, dando seguimento aos processos de extração das isoflavonas. Os voltamogramas representativos das análises dos extratos do

medicamento fitoterápico A obtidos pelo processo de extração simples e de EFS são apresentados nas **Figuras 56 A e B**.

Como é possível notar através dos perfis voltamétricos dos extratos (**Figuras 56 A e B**, voltamogramas **b**), a determinação de daidzeína neste medicamento também não foi possível devido à presença de grandes quantidades de isoflavonas glicosiladas que se reduzem em potenciais próximos ou no mesmo E_p de redução da daidzeína, impedindo a sua definição de pico e a distinção entre estas isoflavonas. Porém, estes interferentes não impediram a quantificação de genisteína, que é a isoflavona alvo da maioria dos estudos por sua potencial atividade.

Cada amostra preparada (total de cinco amostras) foi analisada em triplicata pela técnica de VOQ e a viabilidade da aplicação desta metodologia se deu pelos estudos de recuperação e determinação de genisteína que forneceram a precisão e exatidão do método.

As recuperações na presença da matriz da amostra foram realizadas pelo método de adição de padrão (detalhadamente descrito na **seção 3.4.1.**). As curvas de recuperação de genisteína obtida para uma destas 15 análises realizadas para cada processo de extração (simples e em fase sólida) são apresentadas nas **Figuras 57 A e B**, e os resultados deste estudo podem ser visualizados na **Tabela 15**.

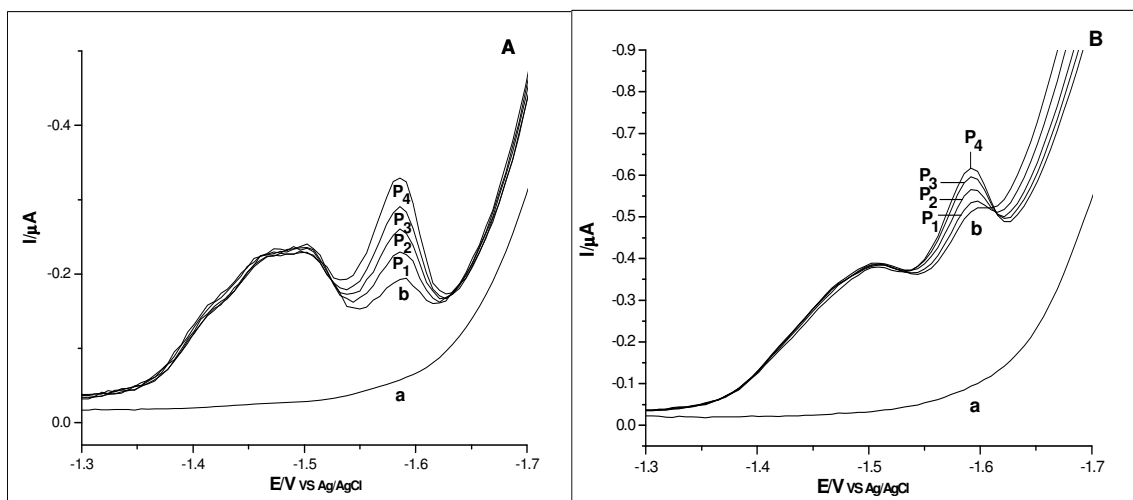


Figura 56: Voltamogramas de onda quadrada referente a análise de determinação de genisteína em medicamento fitoterápico A – (A) Após extração simples (conforme **item 2.3.1.**); (B) Após extração em fase sólida (conforme **item 2.3.2.**); onde: (a) Branco: tampão fosfato:metanol (8:2, v/v) – pH 7,5 (0,04 mol.L⁻¹), na presença de BrCTA (2,21.10⁻⁴ mol.L⁻¹); (b) 50 μL do extrato de medicamento fitoterápico A; (P₁ – P₄) adições do padrão de genisteína. Parâmetros: t_{ac} : 50 s, E_{ac} : 0 V; f : 100 Hz, E_{sw} : 30 mV, ΔE_s : 6 mV.

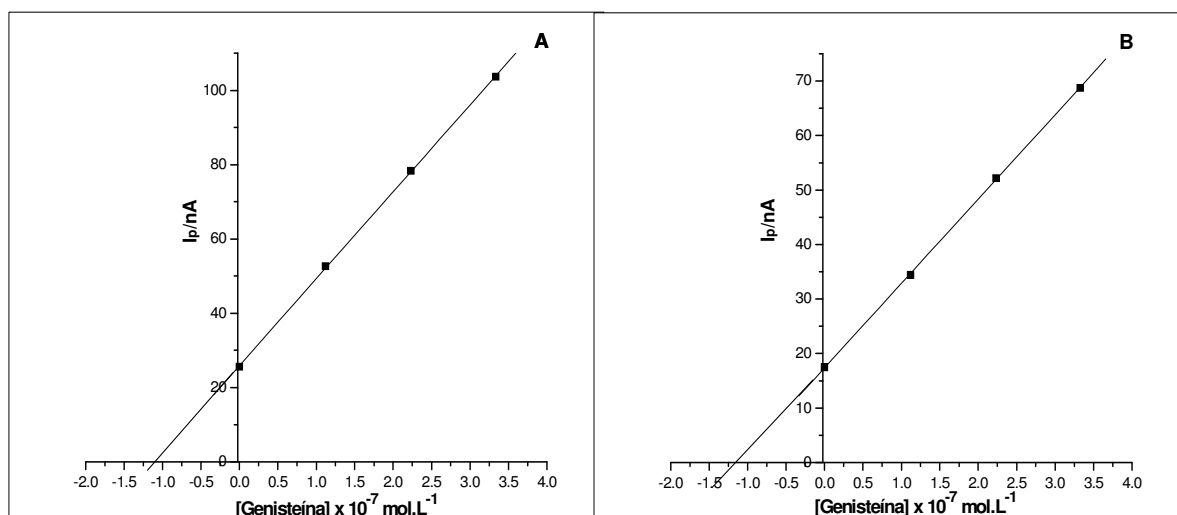


Figura 57: Curvas de recuperação de genisteína no medicamento fitoterápico A – (A) Após extração simples; (B) Após extração em fase sólida.

Tabela 15: Resultados do estudo de recuperação de genisteína no medicamento fitoterápico A por extração simples e por EFS, através da técnica de VOQ.

Amostra	Adição/ mol.L ⁻¹	[Gen.]/ mol.L ⁻¹	R./ %	R _M / %	S	RSD/ %	[Gen.] _M / mol.L ⁻¹	E _r / %
Medicamento A (por extração simples)	1,134.10 ⁻⁷	1,158.10 ⁻⁷	102,11					
		1,107.10 ⁻⁷	97,65					
		1,159.10 ⁻⁷	102,25	101,27	2,128	2,102	1,148.10 ⁻⁷	1,288
		1,149.10 ⁻⁷	101,23					
		1,169.10 ⁻⁷	103,10					
Medicamento A (por EFS)	1,132.10 ⁻⁷	1,170.10 ⁻⁷	103,40					
		1,153.10 ⁻⁷	101,90					
		1,124.10 ⁻⁷	99,30	100,90	2,494	2,472	1,142.10 ⁻⁷	0,903
		1,102.10 ⁻⁷	97,38					
		1,160.10 ⁻⁷	102,54					

Onde: [Gen.] = Concentração de genisteína encontrada pelo método.

R. = Recuperação do método.

R_M. = Média das recuperações obtidas.

S = Desvio Padrão das recuperações.

RSD = Desvio Padrão Relativo das recuperações.

[Gen.]_M. = Média das concentrações de genisteína encontradas pelo método.

E_r = Erro Relativo entre o valor adicionado e o valor encontrado das concentrações de genisteína.

As porcentagens de recuperação média variaram entre 97,65 e 103,10% para as amostras submetidas à extração simples e entre 97,38 e 103,40% para as amostras submetidas à EFS. O desvio padrão relativo foi menor que 2,5% e o erro relativo menor que 1,3% para ambos os processos de extração avaliados, demonstrando a excelente precisão e exatidão obtidas neste estudo de recuperação.

A quantidade de genisteína no medicamento foi então determinada mediante as curvas de I_p vs concentração construídas (como demonstrado nas **Figuras 58 A e B**) e através da equação da reta obtida em cada análise, o conteúdo de genisteína foi quantificado conforme é apresentado na **Tabela 16**.

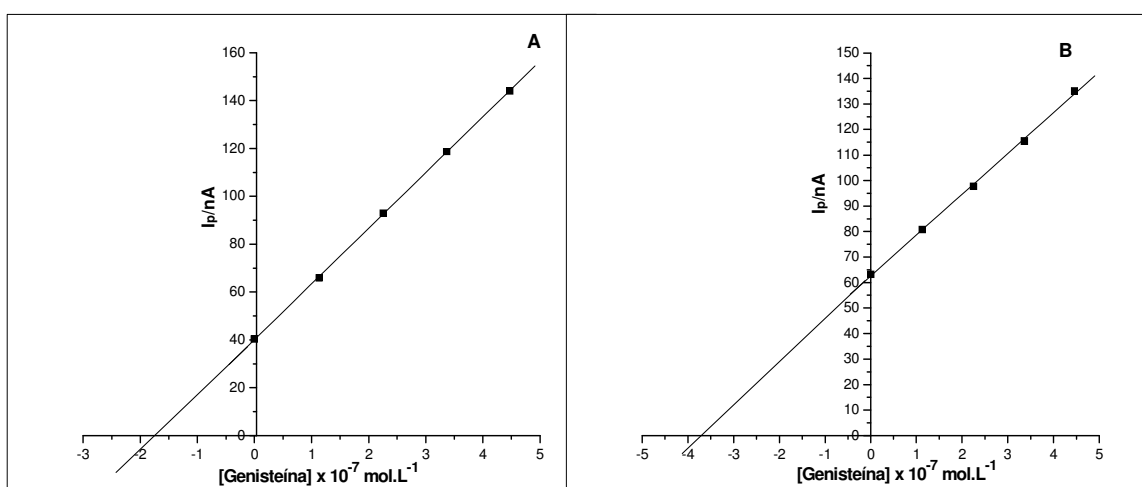


Figura 58: Dependência de I_p com a concentração de genisteína para sua quantificação no medicamento fitoterápico A – (A) Após extração simples; (B) Após extração em fase sólida.

Tabela 16: Determinação de genisteína no medicamento fitoterápico A por extração simples e por EFS, através da técnica de VOQ.

Amostra	[Gen.]/ mg.g ⁻¹	[Gen.] _M / mg.g ⁻¹	S	RSD/ %
Medicamento A (por extração simples)	1,7800			
	1,8267			
	1,8279	1,8420	0,0796	4,323
	1,7960			
	1,9797			
Medicamento A (por EFS)	1,0620			
	1,0823			
	0,9780	1,0918	0,0809	7,408
	1,1844			
	1,1523			

Onde: [Gen.] = Concentração de genisteína na amostra encontrada pelo método.

[Gen.]_M = Média das concentrações de genisteína.

S = Desvio Padrão das determinações.

RSD = Desvio Padrão Relativo das determinações.

De acordo com os dados fornecidos pela **Tabela 16**, nota-se uma diferença muito grande entre as concentrações médias obtidas pelos processos de extração simples (1,8420 mg.g⁻¹) e de EFS (1,0918 mg.g⁻¹).

Observando o perfil voltamétrico do extrato deste medicamento obtido após EFS (**Figura 56 B**), verifica-se uma elevação da corrente em relação ao processo de extração simples que prejudicou a definição do pico de genisteína devido à proximidade com a descarga do eletrólito suporte e talvez tenha também interferido na quantificação de genisteína. Ou ainda, essa diferença entre as concentrações possa ser justificada por perdas significativas de genisteína durante o processo de EFS, pois os extratos de medicamentos se constituem de um pó de fina granulometria e passam por mais etapas durante esta extração.

De qualquer modo, a extração simples é o processo mais adequado a ser utilizado antes da aplicação da metodologia desenvolvida nestes medicamentos.

3.5.2. Determinação e recuperação de daidzeína no medicamento fitoterápico B por extração simples e por extração em fase sólida

Um medicamento fitoterápico de outro fabricante foi selecionado para realizar as análises de genisteína e daidzeína a fim de verificar se existe realmente uma discrepância entre os teores individuais das isoflavonas contidas em medicamentos ou se há uma preocupação quanto à homogeneidade deste conteúdo.

O medicamento de marca B foi então adquirido e os extratos de gérmen de soja contidos nas cápsulas foram misturados para se realizar, em seguida, os processos de extração simples (**item 2.3.1.**) e de EFS (**item 2.3.2.**), como feito para o medicamento A.

A repetibilidade do método analítico proposto foi verificada mediante ao preparo de cinco amostras para o processo de extração simples e para o processo de EFS, analisando cada extrato três vezes pela metodologia de VOQ. Os voltamogramas de uma destas análises para cada processo de extração estão representados nas **Figuras 59 A e B**.

Ao observar os perfis voltamétricos dos extratos do medicamento fitoterápico B, nota-se algo um tanto inusitado. Nestes voltamogramas não é observado o pico de redução da genisteína, nem tão pouco os picos das isoflavonas glicosiladas, mas somente um pico que está relacionado com a redução da daidzeína.

Depois de feita a adição do padrão de daidzeína, observou-se que o pico de redução do extrato se apresentava exatamente no mesmo potencial de redução da daidzeína, então foi considerado que neste medicamento deve conter majoritariamente este composto isoflavônico como princípio ativo.

As análises de daidzeína no medicamento fitoterápico B foram realizadas conforme descrito para as amostras anteriores, pelas recuperações através do método de adição de padrão, seguida das determinações nas cinco amostras preparadas por extração simples e nas outras cinco amostras por EFS.

Nas **Figuras 60 A e B** estão representadas as curvas de recuperação de uma das análises do extrato obtido por extração simples, assim como, uma das análises do extrato obtido por EFS. As porcentagens de recuperação, S, RSD e E_r foram calculados e podem ser visualizados na **Tabela 17**.

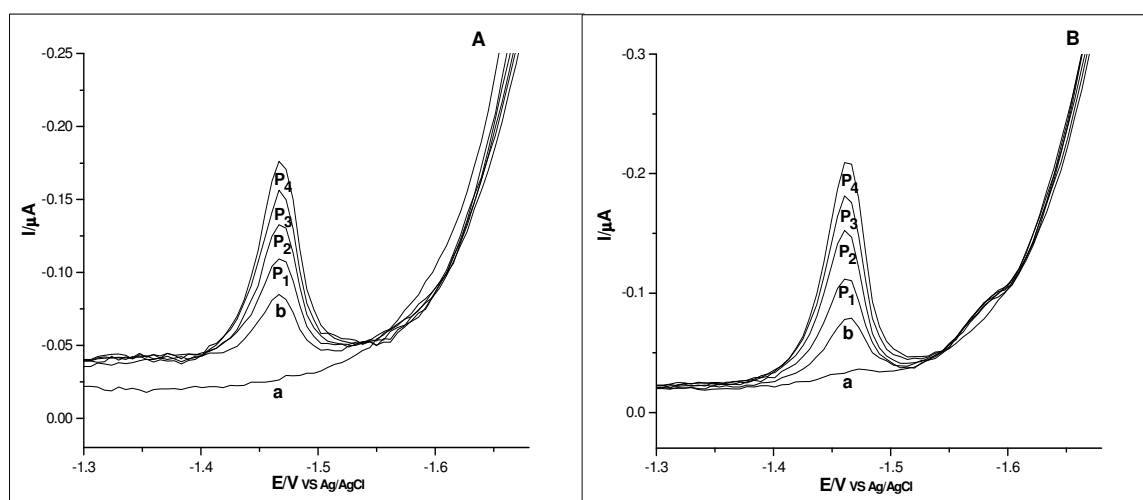


Figura 59: Voltamogramas de onda quadrada referente a análise de determinação de daidzeína no medicamento fitoterápico B – (A) Após extração simples (conforme item 2.3.1.); (B) Após extração em fase sólida (conforme item 2.3.2.); onde: (a) Branco: tampão fosfato:metanol (8:2, v/v) – pH 7,5 ($0,04 \text{ mol.L}^{-1}$), na presença de BrCTA ($2,21 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$); (b) 30 μL do extrato de medicamento fitoterápico B; (P₁ – P₄) adições do padrão de daidzeína. Parâmetros: t_{ac} : 50 s, E_{ac} : 0 V; f : 100 Hz, E_{sw} : 30 mV, ΔE_s : 6 mV.

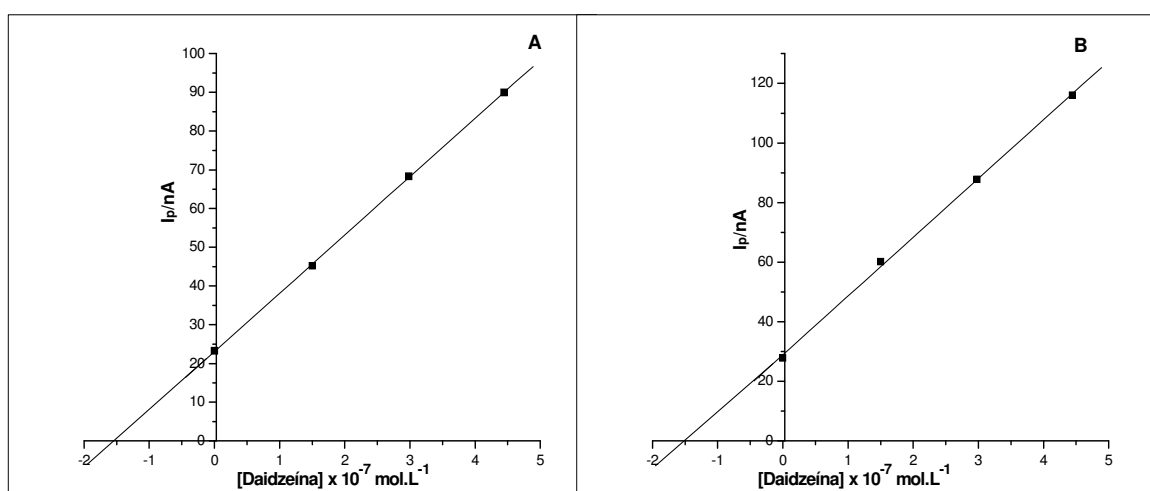


Figura 60: Curvas de recuperação de daidzeína no medicamento fitoterápico B – (A) Após extração simples; (B) Após extração em fase sólida.

Tabela 17: Resultados do estudo de recuperação de daidzeína no medicamento fitoterápico B por extração simples e por EFS, através da técnica de VOQ.

Amostra	Adição/ mol.L ⁻¹	[Daid.]/ mol.L ⁻¹	R./ %	R _M / %	S	RSD/ %	[Daid.] _M / mol.L ⁻¹	E _r / %
Medicamento B (por extração simples)	1,523.10 ⁻⁷	1,514.10 ⁻⁷	99,43					
		1,486.10 ⁻⁷	97,61					
		1,491.10 ⁻⁷	97,91	99,57	1,958	1,967	1,516.10 ⁻⁷	0,433
		1,530.10 ⁻⁷	100,51					
		1,559.10 ⁻⁷	102,37					
Medicamento B (por EFS)	1,523.10 ⁻⁷	1,503.10 ⁻⁷	98,69					
		1,489.10 ⁻⁷	97,79					
		1,524.10 ⁻⁷	100,08	98,23	1,374	1,399	1,496.10 ⁻⁷	1,769
		1,497.10 ⁻⁷	98,30					
		1,467.10 ⁻⁷	96,30					

Onde: [Daid.] = Concentração de daidzeína encontrada pelo método.

R. = Recuperação do método.

R_M. = Média das recuperações obtidas.

S = Desvio Padrão das recuperações.

RSD = Desvio Padrão Relativo das recuperações.

[Daid.]_M. = Média das concentrações de daidzeína encontradas pelo método.

E_r = Erro Relativo entre o valor adicionado e o valor encontrado das concentrações de daidzeína.

Bons valores de recuperação foram encontrados de acordo com os resultados da **Tabela 17**. Para a amostra do medicamento B extraída pelo processo de extração simples, estes valores variaram entre 97,61 e 102,37%; e para a amostra extraída pelo processo de EFS as recuperações variaram entre 96,30 e 100,08%.

Assim sendo, os resultados se apresentaram satisfatórios após as extrações pelos dois processos, com porcentagens de RSD e E_r inferior a 2% denotando uma boa precisão e exatidão. Através das curvas analíticas de quantificação de daidzeína após a extração simples e após a EFS (representadas pelas **Figuras 61 A e B**), a média das concentrações de cada amostra pôde ser determinada (**Tabela 18**).

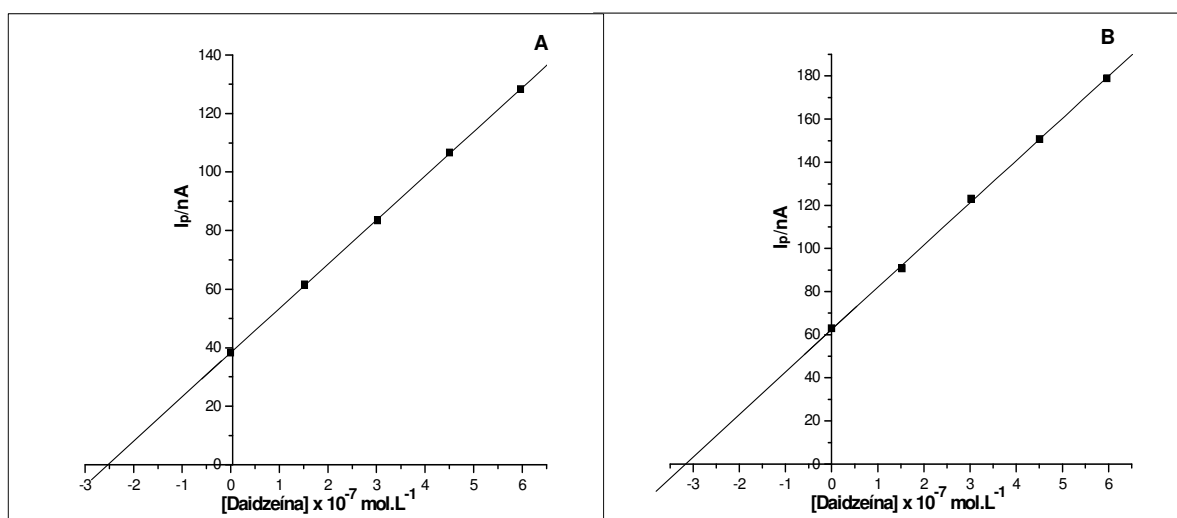


Figura 61: Dependência de I_p com a concentração de daidzeína para sua quantificação no medicamento fitoterápico B – (A) Após extração simples; (B) Após extração em fase sólida.

Os resultados apresentados para o medicamento fitoterápico B (**Tabela 18**) indicam que a extração simples foi mais eficiente, obtendo elevadas concentrações de daidzeína ($54,4214 \text{ mg.g}^{-1}$). Isto não aconteceu com o processo de EFS empregado, pois apesar de se obter uma alta concentração do analito nestes extratos ($37,8456 \text{ mg.g}^{-1}$), este valor é significativamente inferior ao encontrado por extração simples.

Como não foi observado nenhum aumento de corrente ou antecipação da descarga do eletrólito suporte devido a efeitos de matriz da amostra (**Figuras 59 A e B**), interpreta-se que as concentrações menores obtidas pelo uso da extração em fase sólida estão relacionadas a perdas das isoflavonas pelo aumento de etapas envolvidas (como mais processos de filtração, lavagem dos cartuchos para diminuição dos interferentes, secagem das amostras em capela, etc).

Então, tratando-se de medicamentos fitoterápicos parece haver uma concordância que a menor quantidade de etapas executadas pelo processo de extração simples parece otimizar a aplicação da metodologia.

Tabela 18: Determinação de daidzeína no medicamento fitoterápico B por extração simples e por EFS, através da técnica de VOQ.

Amostra	[Daid.]/ mg.g ⁻¹	[Daid.] _M / mg.g ⁻¹	S	RSD/ %
Medicamento B (por extração simples)	54,4353			
	53,3781			
	55,9627	54,4214	1,0894	2,002
	54,9243			
	53,4065			
Medicamento B (por EFS)	38,6739			
	35,9094			
	35,6766	37,8456	1,9503	5,153
	38,8902			
	40,0780			

Onde: [Daid.] = Concentração de daidzeína na amostra encontrada pelo método.

[Daid.]_M = Média das concentrações de daidzeína.

S = Desvio Padrão das determinações.

RSD = Desvio Padrão Relativo das determinações.

3.6. CLAE como metodologia comparativa

A cromatografia líquida de alta eficiência é a metodologia analítica mais utilizada para a quantificação de compostos isoflavônicos e encontra-se validada por laboratórios creditados segundo NBR ISO/IEC 17025, como por exemplo, o Herbarium Laboratório Botânico Ltda. que utiliza o método de CLAE-DAD para análise de isoflavonas em extratos e comprimidos de soja (*Glycine max* Merrill) (ANVISA, 2006).

Deste modo, esta técnica foi selecionada para a realização de estudos comparativos com os resultados obtidos pelo método de VOQ, seguindo as condições descritas por Song *et al.* (1998).

3.6.1. Curvas analíticas para daidzeína e genisteína

As curvas de calibração foram construídas para os dois analitos de interesse e a linearidade foi verificada dentro das faixas de concentrações de 13 a 120 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para daidzeína e de 14 a 125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para genisteína, procurando abranger o teor destas isoflavonas nas amostras.

Na **Figura 62** são apresentados os cromatogramas de cada concentração injetada do padrão de daidzeína. A curva analítica obtida forneceu a **Equação 3** ($r = 0,999$), que foi utilizada para determinação de daidzeína nas amostras dos produtos de soja.

$$\text{Área} = -126582,89088 + 32523,93622 \cdot [\text{Daidzeína}] \quad (\text{Equação 3})$$

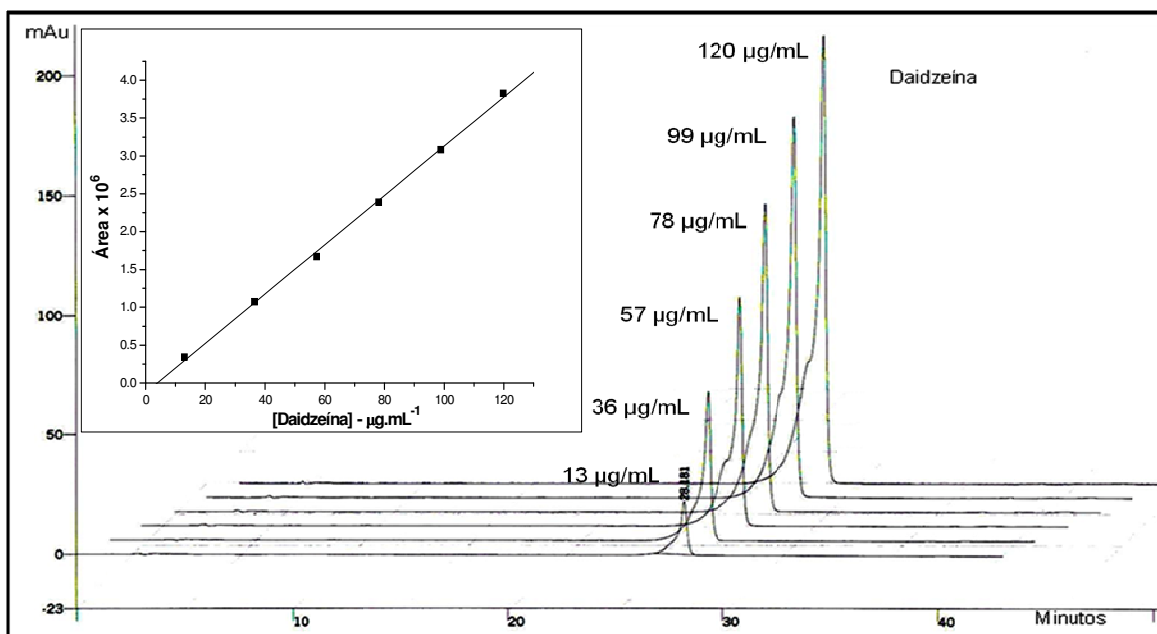


Figura 62: Perfil cromatográfico do padrão daidzeína nas concentrações injetadas entre 13 e 120 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ com t_R de 28,181 min. Inserção: Curva analítica obtida para daidzeína. Fase Móvel: gradiente de solvente A: 0,1% de ácido acético glacial em água e solvente B: 0,1% de ácido acético glacial em acetonitrila, coluna C18 OmniSpher, fluxo variado em 1,0 e 1,5 mL.min^{-1} , detecção em 260 nm.

Da mesma maneira, variadas concentrações de genisteína foram injetadas no cromatógrafo líquido, gerando os cromatogramas apresentados na **Figura 63**. A curva analítica obtida forneceu a **Equação 4** ($r = 0,998$), que neste caso foi utilizada para a determinação de genisteína nas amostras dos produtos de soja.

$$\text{Área} = -270248,24551 + 37747,99592 \cdot [\text{Genisteína}] \quad (\text{Equação 4})$$

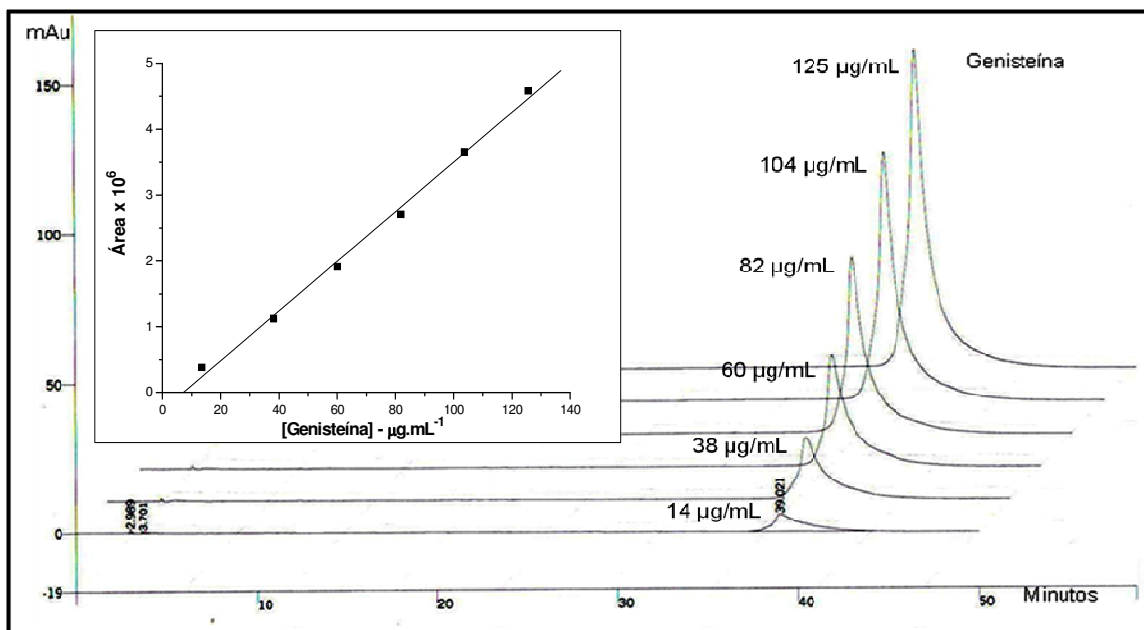


Figura 63: Perfil cromatográfico do padrão genisteína nas concentrações injetadas entre 14 e 125 µg.mL⁻¹ com t_R de 39,021 min. Inserção: Curva analítica obtida para genisteína. Fase Móvel: gradiente de solvente A: 0,1% de ácido acético glacial em água e solvente B: 0,1% de ácido acético glacial em acetonitrila, coluna C18 OmniSpher, fluxo variado em 1,0 e 1,5 mL.min⁻¹, detecção em 260 nm.

3.6.2. Análise de daidzeína e genisteína em produtos de soja por CLAE

Para a realização das análises por CLAE, uma amostra de cada produto de soja (farinha, medicamentos A e B) foi preparado por extração simples e por EFS. Estas amostras foram primeiramente analisadas em triplicata por VOQ e os mesmos extratos foram analisados em triplicata por CLAE com o intuito de diminuir os erros relacionados ao preparo das amostras ou a variabilidade da matéria-prima.

Na cromatografia, cada extrato foi novamente homogeneizado em banho ultrassônico e a solução foi injetada no cromatógrafo líquido. A análise foi realizada de acordo com as condições descritas no procedimento experimental (seção 2.5), obtendo assim o cromatograma com as áreas específicas para a daidzeína e genisteína.

Os cromatogramas que representam as análises em farinha de soja e nos medicamentos fitoterápicos A e B, comparando os processos de extração simples e EFS estão apresentados no **Apêndice (Figuras 64 a 69)**.

Observa-se que os picos das isoflavonas de interesse se apresentaram definidos e com uma boa separação entre os demais compostos presentes. Assim sendo, o conteúdo de daidzeína e genisteína pôde ser determinado nas amostras e os resultados destas quantificações são apresentados na **Tabela 19**.

Tabela 19: Conteúdo de genisteína e daidzeína encontrados nos produtos de soja por CLAE.

AMOSTRAS	DAIDZEÍNA			GENISTEÍNA		
	t_{RM} (min)	Área Média	[Daid.] _M (mg.g ⁻¹)	t_{RM} (min)	Área Média	[Gen.] _M (mg.g ⁻¹)
Farinha de Soja (por extração simples)	27,80	135528	0,06259	37,75	166367	0,07890
Farinha de Soja (por EFS)	29,02	130062	0,07741	39,37	205962	0,1238
Medicamento A (por extração simples)	27,39	667546	2,3574	38,09	464359	1,8789
Medicamento A (por EFS)	27,38	1202378	1,2287	37,36	1109376	1,0991
Medicamento B (por extração simples)	27,58	942109	53,6906	—	—	—
Medicamento B (por EFS)	27,39	854080	34,4595	—	—	—

Onde: [Daid.]_M = Concentração média de daidzeína.

[Gen.]_M = Concentração média de genisteína.

t_{RM} = Tempo de retenção médio

De acordo com os resultados apresentados, chama-se a atenção o fato de a genisteína não ter sido detectada pela técnica de CLAE nas amostras do medicamento fitoterápico B, estando em concordância com os resultados observados por VOQ nos quais não é notado o pico de redução da genisteína (**Figuras 59 A e B**). Com base nisto, pode-se concluir que a isoflavona da soja com maior bioatividade não está presente neste medicamento vendido com indicações de atuar na redução de colesterol e no alívio dos sintomas da menopausa.

Ao contrário, no medicamento fitoterápico A foi determinado um alto teor de genisteína de 1,8789 mg.g⁻¹ (extração simples) e 1,0991 mg.g⁻¹ (EFS), assim como, para a

farinha de soja que obteve concentrações de $0,07890 \text{ mg.g}^{-1}$ (extração simples) e $0,1238 \text{ mg.g}^{-1}$ (EFS). Com estes resultados as duas técnicas puderam ser comparadas, conforme apresentado na **Tabela 20**.

Uma diferença percentual maior entre os resultados (igual a 24,71%) é observada para os extratos de farinha de soja preparados por extração simples, demonstrando que as análises realizadas por VOQ nestas amostras foram afetadas de forma significativa pelo efeito de matriz, o que gerou a discordância entre os resultados obtidos por CLAE.

No entanto, a quantificação de genisteína em farinha de soja empregando o processo de EFS foi mais eficiente por ambos os métodos, demonstrando que independente da técnica empregada, a EFS deve ser o processo utilizado para a extração de isoflavonas em farinha de soja. Além disso, as concentrações médias de genisteína obtidas por VOQ e CLAE (por EFS) apresentaram-se com uma diferença percentual de apenas 7,61%, dando credibilidade a metodologia desenvolvida por VOQ.

Ainda, pela análise dos resultados apresentados na **Tabela 20**, verifica-se a grande proximidade das concentrações médias de genisteína obtidas por VOQ e CLAE para o medicamento fitoterápico A, tanto por extração simples (diferença de 1,7%) quanto por EFS (diferença de 1,2%). Como já observado durante a aplicação da metodologia desenvolvida por VOQ, a extração simples é a mais adequada à quantificação de isoflavonas neste tipo de amostra, isto se confirma pelo fato da CLAE fornecer resultados similares demonstrando que há perdas significativas das isoflavonas, daidzeína e genisteína, durante o processo de EFS. Além disso, a semelhança entre os resultados obtidos pelas duas técnicas permite descartar a hipótese de que as análises feitas por VOQ foram afetadas pelo efeito de matriz da amostra.

Uma vantagem fornecida pela CLAE em relação à VOQ é a determinação da daidzeína em farinha de soja e no medicamento fitoterápico A (rever **Tabela 19**), pois como justificado nos estudos anteriores, o alto conteúdo de isoflavonas glicosiladas nestas amostras interferiram nas análises de daidzeína por VOQ. Assim sendo, não haverá como comparar as concentrações médias de daidzeína obtidas por CLAE que foram de $0,06259$ e $0,07741 \text{ mg.g}^{-1}$ para a farinha de soja e de $2,3574$ e $1,2287 \text{ mg.g}^{-1}$ para o medicamento fitoterápico A, após os processos de extração simples e EFS, respectivamente.

O medicamento fitoterápico B tornou-se uma exceção devido à distribuição das formas isoflavônicas presentes e a quantidade exacerbada de daidzeína nos extratos analisados. As concentrações médias de daidzeína de $53,6906 \text{ mg.g}^{-1}$ (por extração

simples) e 34,4595 mg.g⁻¹ (por EFS) encontradas pelas análises cromatográficas se assemelham as obtidas pela técnica eletroanalítica (**Tabela 21**).

Estes resultados denotam a importância do estudo de processos de extrações e também confirmam a enorme variabilidade do conteúdo das isoflavonas agliconas nos produtos analisados, gerando dúvidas quanto a riscos e benefícios do consumo de alimentos à base de soja e tratamento ou prevenção pelo uso de medicamentos fitoterápicos.

Tabela 20: Comparação entre os resultados obtidos para quantificação de genisteína em farinha de soja e no medicamento fitoterápico A através das metodologias de VOQ e CLAE.

AMOSTRAS	VOQ			CLAE		
	[Gen.] _M /mg.g ⁻¹	S	RSD/%	[Gen.] _M /mg.g ⁻¹	S	RSD/%
Farinha de Soja (por extração simples)	0,05940	0,0007	1,282	0,07890	0,0013	1,743
Farinha de Soja (por EFS)	0,1332	0,0025	1,917	0,1238	0,0009	0,724
Medicamento A (por extração simples)	1,8470	0,0773	4,188	1,8789	0,0596	3,171
Medicamento A (por EFS)	1,0855	0,0650	5,993	1,0991	0,0586	5,332

Onde: [Gen.]_M = Concentração média de genisteína.

S = Desvio Padrão das determinações.

RSD = Desvio Padrão Relativo das determinações.

Tabela 21: Comparação entre os resultados obtidos para quantificação de daidzeína no medicamento fitoterápico B através das metodologias de VOQ e CLAE.

AMOSTRAS	VOQ			CLAE		
	[Daid.] _M /mg.g ⁻¹	S	RSD/%	[Daid.] _M /mg.g ⁻¹	S	RSD/%
Medicamento B (por extração simples)	55,0268	1,1897	2,162	53,6906	1,6956	3,158
Medicamento B (por EFS)	38,7204	1,6135	4,167	34,4595	1,3060	3,790

Onde: [Daid.]_M = Concentração média de daidzeína.

S = Desvio Padrão das determinações.

RSD = Desvio Padrão Relativo das determinações.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A redução da daidzeína e da genisteína em tampão BR:etanol (8:2, v/v - 0,04 mol.L⁻¹), em todo intervalo de pH estudado (2,5 a 11,0), mostrou-se bem pouco favorável, com picos pouco definidos ou, em muitos voltamogramas, praticamente imperceptíveis.

Buscando condições que proporcionassem o favorecimento das reduções de daidzeína e genisteína, estudou-se a influência de diferentes surfactantes neste processo. Os surfactantes catiônico brometo de cetiltrimetil amônio (BrCTA) e aniônico lauril-dodecil sulfato de sódio (DSS) contribuíram para redução das isoflavonas agliconas, proporcionando o deslocamento dos potenciais de pico para valores menos negativos, afastando da descarga do eletrólito e aumentando a definição e corrente de pico. Mas, somente o surfactante catiônico BrCTA permitiu a separação destas isoflavonas e possibilitou o desenvolvimento da metodologia de análise de daidzeína e genisteína.

De acordo com o comportamento observado através da técnica de VOQ foi possível concluir que o processo de redução das isoflavonas, daidzeína e genisteína, na presença do surfactante BrCTA é irreversível com características aparentemente adsorptivas, envolvendo uma reação de pré-protonação das espécies acoplada a transferência eletrônica. Estes resultados, assim como o mecanismo de redução destas isoflavonas na presença de surfactantes, já são encontrados na literatura confirmando essas evidências.

O desenvolvimento das metodologias para determinação de genisteína e daidzeína em produtos à base de soja se deu em dois eletrólitos suporte: tampão fosfato:etanol (8:2, v/v) e tampão fosfato:metanol (8:2, v/v). Porém, a metodologia otimizada em tampão fosfato:metanol (8:2, v/v) - pH 7,5 (0,04 mol.L⁻¹) forneceu uma melhor resposta de I_p de redução das isoflavonas e limites de quantificação mais baixos, o que foi de fundamental importância durante a aplicação nas amostras devido ao efeito de matriz destas que eleva os valores de corrente da linha de base e dificulta a definição dos picos de interesse.

A concentração de $2,21 \cdot 10^{-4}$ mol.L⁻¹ do surfactante BrCTA, assim como os parâmetros: com f de 100 Hz, E_{sw} de 30 mV e ΔE_s de 6 mV foram selecionados no desenvolvimento desta metodologia. Nestas condições, a daidzeína apresentou um pico de redução em -1,45 V vs Ag/AgCl e a genisteína em -1,56 V vs Ag/AgCl. Os LD e LQ obtidos foram, respectivamente, de $5,61 \cdot 10^{-8}$ e $1,87 \cdot 10^{-7}$ mol.L⁻¹ para daidzeína e de

$3,43.10^{-8}$ e $1,14.10^{-7}$ mol.L⁻¹ para genisteína, no intervalo de concentração de $1,5.10^{-7}$ a $1,1.10^{-6}$ mol.L⁻¹.

Sob as condições otimizadas, a metodologia eletroanalítica pôde ser aplicada com sensibilidade adequada à quantificação de genisteína em farinha de soja e no medicamento fitoterápico de marca A, assim como permitiu a análise de daidzeína no medicamento fitoterápico de marca B, no qual não foi encontrado genisteína em sua composição.

Os processos de extrações das isoflavonas foram também otimizados para as amostras estudadas, confirmando que há uma grande variabilidade dos resultados dependendo dos solventes e do tipo de extração. Ainda, a validação da metodologia se deu por comparação com a CLAE confirmando a viabilidade do método analítico proposto.

Pelas determinações feitas nas amostras, conclui-se certamente que a soja e seus produtos são importantes fontes de isoflavonas. Porém, a ação desses compostos depende do tecido alvo e da forma isomérica na qual se encontra, visto que estudos mostram que dependendo do composto isoflavônico a atividade biológica é diferenciada.

Portanto, as diferenças consideráveis nos teores de isoflavonas individuais entre as amostras de farinha e medicamentos analisados pressupõem que a atividade farmacológica, a eficácia terapêutica de um tratamento e a segurança de consumo, sejam suscetíveis a variações, dependendo da origem da matéria-prima e processamentos utilizados. Por isso, há necessidade de padronização e controle das concentrações de isoflavonas nos produtos de soja comercializados atualmente.

5. PERSPECTIVAS FUTURAS

O método eletroanalítico proposto para determinação de daidzeína e genisteína pode ter seus estudos complementados pela realização de hidrólise enzimática nas amostras, visando eliminar a interferência das isoflavonas glucosiladas pela quebra da ligação β -glucosídica. Ainda, sugere-se a continuidade deste trabalho pela realização de outros estudos como:

- Investigação do comportamento eletroquímico da daidzeína e genisteína e das interações com surfactantes em diferentes eletrodos, empregando técnicas voltamétricas e ensaios espectrofotométricos;
- Elucidação dos estudos mecanísticos destas isoflavonas por coulometria a potencial controlado para confirmar o número de elétrons envolvidos no processo de redução;
- Desenvolver metodologias eletroanalíticas em eletrodos de amálgama de prata, cobre ou zinco, comparando com o método aqui proposto.
- Investigação da complexação das isoflavonas com metais (Al, Cu, Zn, Fe, etc), em diferentes pHs e composições de eletrólito de suporte através de técnicas voltamétricas e por ensaios espectrofotométricos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOURI, A.; BOYE, J. I.; BELANGER, D. Soybean isoflavones: Efficacy of extraction conditions and effect of food type on extractability. *Food Research International*, **2005**, 38, 1199–1204;

AGOSTINHO, S. M. L.; VILLAMIL, R. F. V.; AGOSTINHO NETO, A.; ARANHA, H. O eletrólito suporte e suas múltiplas funções em processos de eletrodo. *Química Nova*, **2004**, 27, 813-817;

AGRAWAL, P. K.; SCHNEIDER, H. J. Deprotonation induced ¹³ C NMR shifts in phenols and flavonoids. *Tetrahedron Letters*, **1983**, 24, 177–180;

ALBULESCO, M.; POPOVICI, M. Isoflavones – Biochemistry, pharmacology and therapeutic use. *Revue Roumaine de Chimie*, **2007**, 52 (6), 537–550;

ALVES, D. L.; SILVA, C. R. *Fitohormônios: abordagem natural da terapia hormonal*. São Paulo: Atheneu, p. 105, **2002**;

ANVISA, **2002**. FAQ – Medicamentos Fitoterápicos: Isoflavonas. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/faqdinamica/index.asp?Secao=Usuario&usersecoes=36&userassunto=136>. Acesso em agosto de 2008;

ANVISA, **2006**. Normas para habilitação segundo NBR ISO/IEC 17025: Herbarium Laboratório Botânico Ltda. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/reblas/bio/anali/analitico_062.htm. Acesso em janeiro de 2010;

BARNES, S. Effect of genistein on in vitro and in vivo models of cancer. *The Journal of Nutrition*, **1995**, 125, 777S-783;

BRANHAM, W. S.; DIAL, S. L.; MOLAND, C. L. Phytoestrogens and mycoestrogens bind to the rat uterine estrogen receptor. *Journal of Nutrition*, **2002**, 132, 658-664;

BRANN, D. W.; HENDRY L. B.; MAHESH, V. B. Emerging diversities in the mechanism of action of steroid hormones. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **1995**, 52, 113-133;

CARDOSO, A. L.; OLIVEIRA, G. G. Alimentos Funcionais. *Nutri Jr. - Empresa Júnior de Consultoria em Nutrição*, Jornal Eletrônico nº5, **2008**. Disponível em: http://www.nutrijr.ufsc.br/jornal/jornal_eletronico_06-08.pdf. Acesso em janeiro de 2009;

CARERI, M.; CORRADINI, C.; ELVIRI, L.; MANGIA, A. Optimization of a rapid microwave assisted extraction method for the liquid chromatography–electrospray-tandem mass spectrometry determination of isoflavonoid aglycones in soybeans. *Journal of Chromatography A*, **2007**, 1152, 274–279;

CASSIDY, A.; BINGHAM, S.; SETCHELL, K.D. Biological effects of a diet of soy protein rich in isoflavones on the menstrual cycle of premenopausal women. *American Journal of Clinical Nutrition*, **1994**, 60, 333–340;

COWARD, L.; SMITH, M.; KIRK, M.; BARNES, S. Chemical modification of isoflavones in soyfoods during cooking and processing. *American Journal of Clinical Nutrition*, **1998**, 68, 1486S-1491S;

DE AGUIAR, C. L. *Transformações física e bioquímica de isoflavonas conjugadas de soja (Glycine max L.) e o efeito na atividade biológica in vitro*. **2004**. 285f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas: Campinas-SP;

DE ANGELIS, M.; STROSSI, F.; WAIBEL, M.; KATZENELLENGOBEN, B. S.; KATZENELLENGOBEN, J. A. Isocoumarins as estrogen receptor beta selective ligands: Isomers of isoflavone phytoestrogens and their metabolites. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2005**, 13 (23), 6529-6542;

DE BARROS, C. B. Validação de Métodos Analíticos. *CPTI – Tecnologia & Desenvolvimento*, **2002**, 64, 175-177;

DE MATOS, M. P.; CASTILHO, M. C.; CAMPOS, M. G.; RAMOS, F.; SILVEIRA, I. Quais os benefícios de uma alimentação rica em fitoestrogênios? *Medicina Interna: Artigos de Revisão*, **2005**, 12, 171-182;

DELMONTE, P.; PERRY, J.; RADER, J. I. Determination of isoflavones in dietary supplements containing soy, Red Clover and kudzu: Extraction followed by basic or acid hydrolysis. *Journal of Chromatography A*, **2006**, 1107, 59–69;

DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A. A.; CAPASSO, F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Science*, **1999**, 65 (4), 337-353;

DIEL, P.; GEIS, R. B.; CALDARELLI, A.; SCHMIDT, S.; LESCHOWSKY, U. L.; VOSS, A.; VOLLMER, G. The differential ability of the phytoestrogen genistein and of estradiol to induce uterine weight and proliferation in the rat is associated with a substance specific modulation of uterine gene expression. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **2004**, 221, 21-32;

DONG, S.; ZHENG, J.; GAO, H. Voltammetric behaviour of 4',7-dimethoxy-isoflavone sulfonic sodium and its enhancement determination in the presence of surfactant. *Analytical Biochemistry*, **2003**, 323, 151-155;

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*, **2007**, 19, 952-957;

FARMAKALIDIS, E.; MURPHY, P.A. Isolation of 6''-OAcetylgenistin and 6''-O-Acetyldaidzin from toasted defatted soyflakes. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **1985**, 33, 385-389;

- FERRARI, C.; KUSANO, B. Bioquímica dos Alimentos Funcionais, Nutrição e Saúde – *Revista Nutrição Profissional*, **2005**, 1, 21-25;
- FRANKE, A. A.; CUSTER, L. J. Daidzein and genistein concentrations in human milk after soy consumption. *Clinical Chemistry*, **1996**, 42, 955-964;
- GAO, G. Y.; LI, D. J.; KEUNG, W. M. Synthesis of potential antidipsotropic isoflavones: Inhibitors of the mitochondrial monoamine oxidase-aldehyde dehydrogenase pathway. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2001**, 44, 3320-3328;
- GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Determinação de isoflavonas em derivados de soja. *Ciência & Tecnologia de Alimentos*, **2001**, 21, 86-93;
- GÓES-FAVONI, S. P.; BELÉIA, A. D. P.; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; MANDARINO, J. M. G. Isoflavonas em produtos comerciais de soja. *Ciência & Tecnologia de Alimentos*, **2004**, 24, 582-586;
- GRACE, P. B; TAYLOR, J. I.; BOTTING, N. P.; FRYATT, T.; OLDFIELD, M. F.; BINGHAM, S. A. Quantification of isoflavones and lignans in urine using gas chromatography/mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, **2003**, 315, 114–121;
- GREEN, J.M. A practical guide to analytical method validation. *Analytical Chemistry*, **1996**, 68, 305A-309A;
- GRYNKIEWICZ, G.; KSYCIŃSKA, H.; RAMZA, J.; ZAGRODZKA, J. Chromatographic quantification of isoflavones (why and how). *ACTA Chromatographica*, **2005**, 15, 31-65;
- HARRIS, D. M.; BESSELINK, E.; HENNING, S. M.; GO, V. L. W.; HEBER, D. Phytoestrogens Induce Differential Estrogen Receptor Alpha- or Beta-Mediated Responses in Transfected Breast Cancer Cells. *Experimental Biology & Medicine*, **2005**, 230 (8): 558-568;
- HEIMLER, D.; VIGNOLINI, P.; GALARDI, C.; PINELLI, P.; ROMANI, A. Simple Extraction and Rapid Quantitative Analysis of Isoflavones in Soybean Seeds. *Chromatographia*, **2004**, 59, 361-365;
- HERRMANN, A. P.; WILLEMS, M; JANKE, H. D. Degradation of natural polyphenols by methanogenic consortia enriched from digested municipal sludge. *Water Research*, **2001**, 35 (11), 2575-2582;
- HEYROVSKÝ, M; VAVRICKA, S. On the pH-dependence of polarographic half-wave potentials. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **1972**, 36, 203-221;
- HORWITZ, W. Quality Assurance in the Analysis of Foods for Trace Constituents. *Journal Association Official Analytical Chemistry*, **1980**, 63, 1344-1354;

HSIEH, C. Y.; SANTELL, R. C.; HASLAM, S. Z.; HELFERICH, W. G. Estrogenic effects of genistein on the growth of estrogen receptor-positive human breast cancer (MCF-7) cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Research*, **1998**, 58, 3833-3838;

HU, J. LI, Q. Voltammetric behaviour of puerarin and its determination by single-sweep oscillopolarography. *Analyst*, **1995**, 120, 1073-1076;

HUTABARATA, L.S.; GREENFIELDA, H.; MULHOLLANDB, M. Quantitative determination of isoflavones and coumestrol in soybean by column liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, **2000**, 886, 55-63;

INMETRO DOQ-CGCRE-008, **2002**. Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos. Disponível em: http://www.farmacia.ufmg.br/lato/downloads/validacao_inmetro.pdf. Acesso em janeiro de 2009;

INMETRO, **2003**. Tópicos em Validação de Métodos – Escola Avançada de Metrologia em Química. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/noticias/eventos/MetQuim_palestras/Valida%E7%E3o%20de%20Metodos%20Anal%EDticos_Oscar%20Bahia.pdf. Acesso em julho de 2009;

IRVINE, C.H.G.; FITZPATRICK, M.G.; ALEXANDER, S.L. Phytoestrogens in Soy-Based Infant Foods: Concentrations, Daily Intake and Possible Biological Effects. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, **1998**, 217, 247-253;

KEY, P. E.; FINGLAS, P. M.; COLDHAM, N.; BOTTING, N.; OLDFIELD, M. F.; WOOD, R. An international quality assurance scheme for the quantitation of daidzein and genistein in food, urine and plasma. *Food Chemistry*, **2005**, 96, 261-272;

KIM, E. H.; KIM, A. H.; CHUNG, J. L.; CHI, H. Y.; KIM, J. A.; CHUNG, I. M. Analysis of phenolic compounds and isoflavones in soybean seeds (*Glycine max* (L.) Merrill) and sprouts grown under different conditions. *European Food Research and Technology*, **2006**, 222, 201-208;

KLEJDUS, B.; MIKELOVÁ, R.; PETRLOVÁ, J.; POTESIL, D.; ADAM, V.; STIBOROVÁ, M.; HODEK, P.; VACEK, J.; KIZEK, R.; KUBÁN, V. Determination of isoflavones in soy bits by fast column high-performance liquid chromatography coupled with UV-visible diode-array detection. *Journal of Chromatography B*, **2005**, 1084, 71-79;

KNIGHT, D. C.; EDEN, J. Á. Phytoestrogens – a short review. *Maturitas*, **1995**, 22, 167-175;

KRONES NEWS. Mercado dos Alimentos Funcionais, **2008**, 79. Disponível em: <http://www.krones.com.br/Boletim/Edicao79/materia6.htm>. Acesso em janeiro de 2009;

KUDOU, S.; FLEURY, Y.; WELTI, D.; MAGNOLATO, D.; UCHIDA, T.; KITAMURA, K.; OKUBO, K. Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds (*Glycine max* Merrill). *Agricultural and Biological Chemistry*, **1991**, 55, 2227-2233;

- KUHNLE, G. G. C.; DELL'AQUILA, C.; LOW, Y. L.; KUSSMAUL, M.; BINGHAM, S. A. Extraction and Quantification of Phytoestrogens in Foods Using Automated Solid Phase Extraction and LC/MS/MS. *Analytical Chemistry*, **2007**, 79, 9234-9239;
- KUIPER, G. G. J. M.; CARLSSON, B.; GRANDIEN, K.; ENMARK, E.; HAGGBLAD, J.; NILSSON, S.; GUSTAFSSON, J. A. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β . *Endocrinology*, **1997**, 138 (3), 863-870;
- KUO, H. W.; DING, W. H. Trace determination of bisphenol A and phytoestrogens in infant formula powders by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **2004**, 1027, 67-74;
- KY, C. L.; NOIROT, M.; HAMON, S. Comparison of Five Purification Methods for Chlorogenic Acids in Green Coffee Beans (*Coffea* sp.). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **1997**, 45, 786-790;
- LAMY, I.; SEYWERT, M.; CROMER, M.; SCHARFF, J. P. Simple and mixed ligand complexes of copper (II) with polyfunctional phenolic compounds as models of natural substances. *Analytica Chimica Acta*, **1985**, 176, 201-212;
- LEMAŃSKA, K.; SZYMUSIAK, H.; TYRAKOWSKA, B.; ZIELIŃSKI, R.; SOFFERS, A. E. M. F.; RIETJENS, I. M. C. M. The influence of pH on antioxidant properties and the mechanism of antioxidant action of hydroxyflavones. *Free Radical Biology & Medicine*, **2001**, 31, 869-881;
- LIANG, J.; TIAN, Y. X.; FU, L. M.; WANG, T. H.; LI, H. J.; WANG, P.; HAN, R. M.; ZHANG, J. P.; SKIBSTED, L. H. Daidzein as an antioxidant of lipid: Effects of the microenvironment in relation to chemical structure. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **2008**, 56, 10376-10383;
- LIGGINS, J.; BLUCK, L. J. C.; COWARD, W. A.; BINGHAM, S. A. Extraction and Quantification of Daidzein and Genistein in Food. *Analytical Biochemistry*, **1998**, 264, 1-7;
- LIGGINS, J.; MULLIGAN, A.; RUNSWICK, S.; BINGHAM, S. A. Daidzein and genistein content of cereals. *European Journal of Clinical Nutrition*, **2002**, 56, 961-966;
- LUND, H.; HAMMERICH, O. *Organic Electrochemistry*, 4th ed. New York: Marcel Dekker, **2001**;
- MALEŠEV, D.; KUNTIC, V. Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. *Journal of the Serbian Chemical Society*, **2007**, 72, 921-939;
- MANACH, C.; MORAND, C.; CRESPIY, V.; DEMINGNÉ, C.; TEXIER, O.; RÉGÉRAT, F.; RÉMÉSY, C. Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties. *FEBS Letters*, **1998**, 426 (3), 331-336;
- MANIASSO, N. Ambientes micelares em química analítica. *Química Nova*, **2001**, 24 (1), 87-93;

MESSINA, M. J. Legumes and soybeans: an overview of their nutritional profiles and health effects. *American Journal of Clinical Nutrition*, **1999**, 70, 439S-450S;

MEYER, G.; NADJO, L.; SAVEANT, J. M. Electrochemistry in micellar media. Effect of cationic surfactants on the stability of eletrogenerated anion radicals in water. *Journal of Eletroanalytical Chemistry*, **1981**, 119, 417-419;

MOON, Y. J.; SAGAWA, K.; FREDERICK, K.; ZHANG, S.; MORRIS, M. E. Pharmacokinetics and Bioavailability of the Isoflavone Biochanin A in Rats. *The AAPS Journal*, **2006**, 8, E433-E442;

MORTON, M; ARISAKA, O.; MIYAKE, A.; EVANS, B. Analysis of phytoestrogens by gas chromatography-mass spectrometry. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **1999**, 7, 221-225;

MÜLLNER, C.; SONTAG, G. Determination of some phytoestrogens in soybeans and their processed products with HPLC and coulometric electrode array detection. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, **1999**, 364, 261-265;

NAGASAWA, H. Nutrition and breast cancer: a survey of experimental and epidemiological evidence. *IRCS Journal of Medical Sciences*, **1980**, 8, 317-325;

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. *Química Nova*, **2002**, 25 (5), 772-776;

NURMI, T.; MAZUR, W.; HEINONEN, S.; KOKKONEN, J.; ADLERCREUTZ, H. Isoflavone content of the soy based supplements. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2002**, 28, 1-11;

PACHECO, M.T.B.; SGARBIERI, V.C. Alimentos Funcionais: conceituação e importância na saúde humana. In: Simpósio Brasileiro Sobre os Benefícios da Soja para a Saúde Humana, Londrina: Embrapa Soja, **2001**, 1;

PARK, Y. K.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; SCAMPARINI, A. R. P. Biotransformação de isoflavonas de soja. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, **2001**, 20, 12-14;

PAXTON, J. S. - Soy Protein: Your Key To Better Health , Phytoestrogens: The Biochemistry, Physiology, and Implications for Human Health of Soy Isoflavones – *American Journal of Clinical Nutrition*, **1998**, 68, 1333S-1346S;

PEDROSA, V. A.; CODOGNOTO, L.; AVACA, L. A. Determinação voltamétrica de 4-clorofenol sobre o eletrodo de diamante dopado com boro utilizando a voltametria de onda quadrada. *Química Nova*, **2003**, 26, 844-849;

PENG, Y. Y.; YE, J. N. Determination of isoflavones in red clover by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Fitoterapia*, **2006**, 77, 171-178;

PICHERIT, C.; COXAM, V.; BENNETAU-PELISSERO, C.; KATI-COULIBALY, S.; DAVICCO, M. J.; LEBECQUE, P.; BARLET, J. P. Daidzein is more efficient than genistein in preventing ovariectomy-induced bone loss in rats. *The Journal of Nutrition*, **2000**, 130, 1675-1681;

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, **2000**, 63, 1035-1102;

PISKULA, M. K.; TERAOKA, J. Accumulation of (-)-epicatechin metabolites in rat plasma after oral administration and distribution of conjugates enzymes in rat tissues. *Journal of Nutrition*, **1998**, 128 (7), 1172;

QUEIROZ, S. C. N.; NOGUEIRA, R. T.; SCRAMIN, S. Importância dos fitoestrógenos, presentes na soja, para a saúde humana. *Embrapa: Meio Ambiente*, **2006**. Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/recursos/Queiroz_Nogueira_Scramin_importanciaI D-5nX98pWTxk.pdf. Acesso em julho de 2008;

RICHELLE, M.; PRIDMORE-MERTEN, S.; BODENSTAB, S.; ENSLEN, M.; OFFORD, E. A. Hydrolysis of isoflavone glycosides to aglycones by β -glycosidase does not alter plasma and urine isoflavone pharmacokinetics in postmenopausal women. *Human Nutrition and Metabolism*, **2002**, 2587-2592;

RUSLING, J. F. Molecular aspects of electron transfer at electrodes in micellar solutions. *Colloids and Surfaces*, **1997**, 123, 81-88;

SALAGER, J. L. *Surfactants Types and Uses*. **2002**. 50 f. FIRP BOOKLET # E 300-A. Teaching aid in surfactant science & engineering – Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela;

SALGADO, J. M.; ALMEIDA, M. A. Mercado de alimentos funcionais – desafios e tendências. *SBAF*, **2008**. Disponível em: http://www.sba.org.br/_artigos/200806_Mercado_Alimentos_Funcionais_-_Desafios_Tendencias.pdf. Acesso em janeiro de 2009;

SANTELL, R. C.; KEWU, N.; HELFERICH, W. G. The effect of genistein upon estrogen receptor negative human breast cancer cell growth *in vitro* and *in vivo*. *FASEB Journal*, **1998**, 12 (5), A3807;

SBAF (Sociedade Brasileira de Alimentos Funcionais), **2007**. MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos Funcionais e Nutracêuticos: Definições, Legislação e Benefícios à Saúde. Disponível em: http://www.sba.org.br/artigos_cientificos.htm. Acesso em janeiro de 2009;

SETCHELL, K. D. R. Phytoestrogens: The biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. *American Journal Clinical of Nutrition*, **1998**, 134, 1333S-1343S;

SETCHELL, K. D. R.; CASSIDY, A. dietary isoflavones: Biological effects and relevance to human health. *Journal of Nutrition*, **1999**, 129, 758S-767S;

SLABBERT, N. P. Ionisation of some flavanols and dihydroflavonols. *Tetrahedron*, **1977**, 33, 821-824;

SONG, T.; BARUA, K.; BUSEMAN, G.; MURPHY, P. A. Soy isoflavones analysis: quality control and a new internal standard. *American Journal Clinical of Nutrition*, **1998**, 68, 1474S-1479S;

SONG, T.; HENDRICH, S.; MURPHY, P. A. Estrogenic activity of glycitein, a soy isoflavone. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **1999**, 47, 1607-1610;

SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S. Estudo eletroanalítico do herbicida Paraquat em soluções aquosas por voltametria de onda quadrada utilizando ultramicroeletrodos. *Química Nova*, **2003**, 26, 644-647;

SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de Onda Quadrada. Primeira parte: Aspectos Teóricos. *Química Nova*, **2003**, 26, 81-89;

SOUZA, G.; VALLE, J. L. E.; MORENO, I. Efeitos dos componentes da soja e seus derivados na alimentação humana. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, **2000**, 34, 61-69;

TAPIERO, H.; BA, G. N.; TEW, K. D. Estrogen and environmental estrogens. *Biomedicine & Phamacotherapy*, **2002**, 56, 36-44;

TOVAR, G. R.; ACOSTA, A. R. Amenorrea secundaria a ingestión de lecitina de soya. *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología*, **2004**, 30;

TSUKAMOTO, C.; KUDOU, S.; KIKUCHI, A.; CARRÃO-PANIZZI, M.C.; ONO, T.; KITAMURA, K.; OKUBO, K. Isoflavones in soybean products: composition, concentration and physiological effects. In: Simpósio Brasileiro Sobre os Benefícios da Soja Para a Saúde Humana, Londrina: Embrapa Soja, **2001**, 1, 9-14;

TSUNODA, N.; POMEROY, S.; NESTEL, P. Absorption in Humans of Isoflavones from Soy and Red Clover Is Similar. *The Journal of Nutrition*, **2002**, 132, 2199-2201;

VAZ, C. M. P.; CRESTANA, S.; MACHADO, S. A. S.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A. Electroanalytical determination of the herbicide atrazine in natural waters. *International Journal of Environmental and Analytical Chemistry*, **1996**, 62, 65-76;

VITTAL, R.; H. GOMATHI, H.; KIM, K.-J. Beneficial role of surfactants in electrochemistry and in the modification of electrodes. *Advances in Colloid and Interface Science*, **2006**, 119, 55-68;

WANG, C.; KURZER, M. S. Phytoestrogen concentration determines effects on DNA synthesis in human breast cancer cells. *Nutrition and Cancer*, **1997**, 28 (3), 236-247;

WANG, G.; KUAN, S. S.; FRANCIS, O. J.; WARE, G. M.; CARMAN, A. S. A Simplified HPLC Method for the Determination of Phytoestrogens in Soybean and Its Processed Products. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **1990**, 38, 185-190;

WANG, H.; MURPHY, P.A. Isoflavone Content in Commercial Soybean Foods. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **1994**, 42, 1666-1673;

WANG, T. T. Y.; SATHYAMOORTHY, N.; PHANG, J. M. Molecular effects of genistein on estrogen receptor mediated pathways. *Carcinogenesis*, **1996**, 17, 271-275;

WEI, H.; BOWEN, R.; CAI, Q.; BARNES, S.; WANG, Y. Antioxidant and antipromotional effects of the soybean isoflavone genistein. *Proceedings of the Society for Experimental Biology & Medicine*, **1995**, 208, 124-130;

WILKINSON, A.P.; WÄHÄLÄ, K.; WILLIAMSON, G. Identification and quantification of polyphenol phytoestrogens in foods and human biological fluids. *Journal of Chromatography B*, **2002**, 777, 93-109;

WOBER, J.; WEISSWANGE, I.; VOLLMER, G. Stimulation of alkaline phosphatase activity in Ishikawa cells induced by various phytoestrogens and synthetic estrogens. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **2002**, 83, 227-233;

WU, L.; LAUGHLIN, J. B.; DEWALD, H. D. Voltammetry and LCEC of isoflavones. *Electroanalysis*, **2005**, 9, 796-799;

XI, J.; GUO, R. Interactions of puerarin with micelles: pK_a shifts and thermodynamics. *Journal of Solution Chemistry*, **2008**, 37, 107-118;

XIE, L.; HETTIARACHCHY, N. S.; CAI, R.; TSURUHAMI, K.; KOIKEDA, S. Conversion of isoflavone glycosides to aglycones in soy life and soy meal using β -glucosidase. *Journal of Food Science*, **2003**, 68 (2), 427-430;

XU, Z.; WU, Q.; GODBER, S. J. Stabilities of daidzin, glycitin, genistin and generation of derivatives during heating. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **2002**, 50, 7402-7406;

YANG, S.; WANG, L.; YAN, Q.; JIANG, Z.; LI, L. Hydrolysis of soybean isoflavone glycosides by a thermostable β -glucosidase from *Paecilomyces thermophila*. *Food Chemistry*, **2009**, 115, 1247-1252;

ZHANG, X.; ZHENG, J.; GAO, H. Electrochemical behavior of genistein and its polarographic determination in soybeans. *Analytical Letters*, **2001**, 34, 1901-1912;

ZHU, D.; HETTIARACHCHY, N. S.; HORAX, R.; CHEN, P. Isoflavone contents in germinated soybean seeds. *Plant Foods for Human Nutrition*, **2005**, 60, 147-151;

ZIELONKA, J.; GEBICKI, J.; GRYNKIEWICZ, G. Radical scavenging properties of genistein. *Free Radical Biology & Medicine*, **2003**, 35 (8), 958-965;

ZUMAN, P. *Progress in Polarography*. Vol 3, p. 73, New York: Wiley, **1972**.

7. APÊNDICE

7.1. Cromatogramas dos produtos de soja analisados

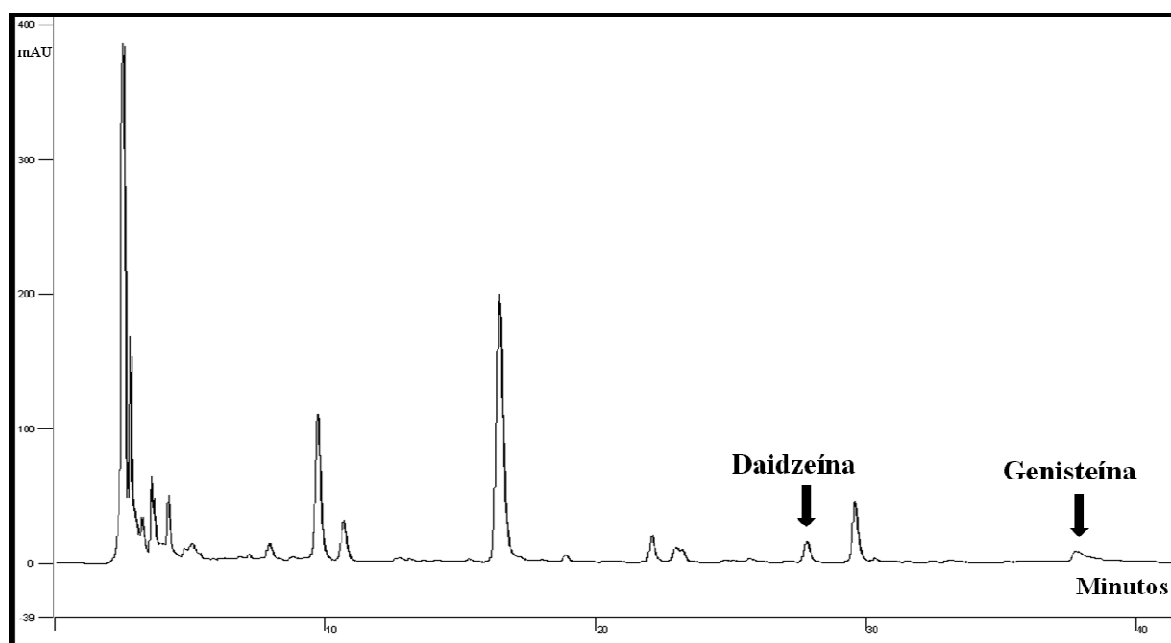


Figura 64: Cromatograma do extrato de farinha de soja obtido após extração simples.

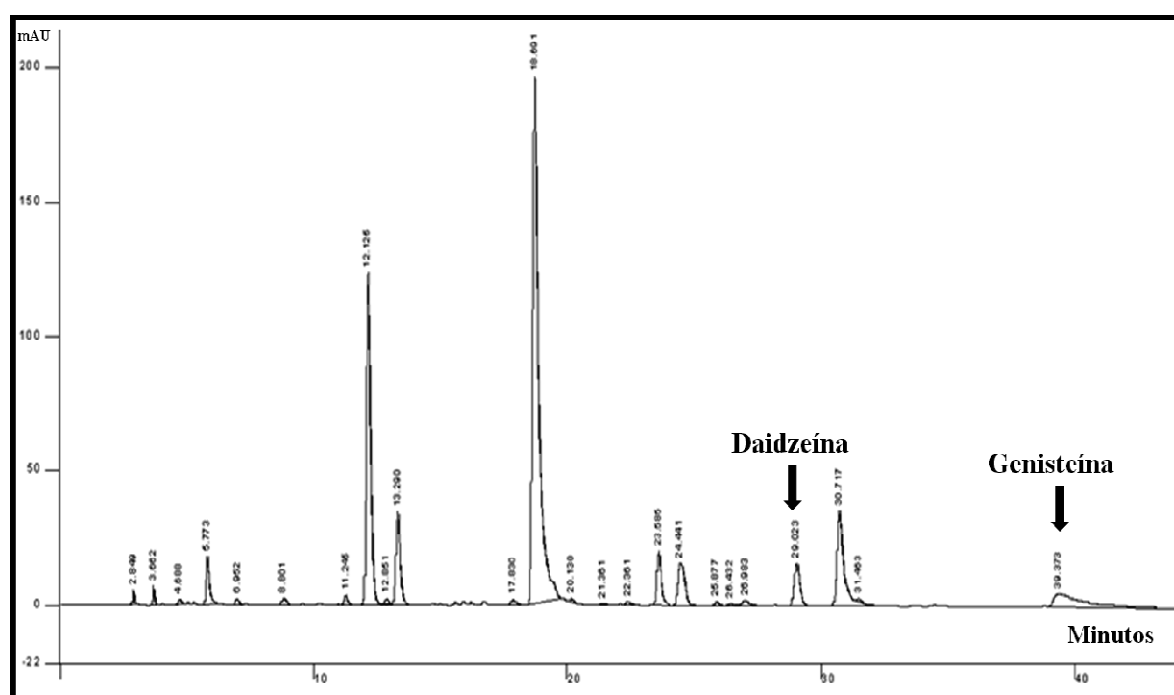


Figura 65: Cromatograma do extrato de farinha de soja obtido após EFS.

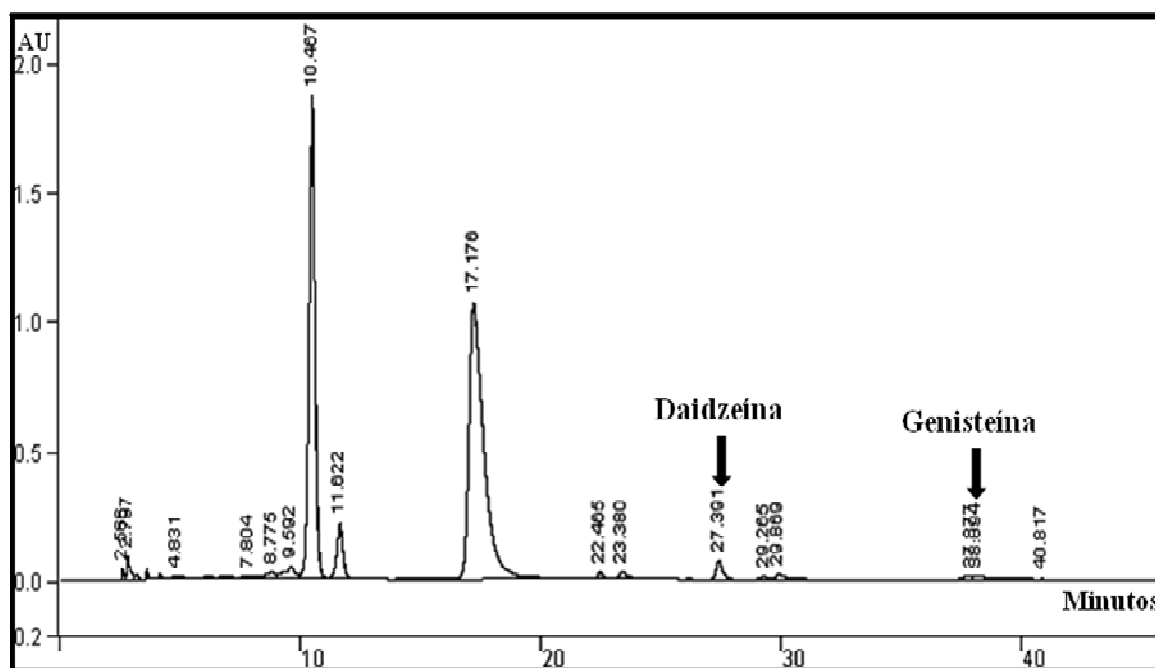


Figura 66: Cromatograma do extrato do medicamento fitoterápico A após extração simples.

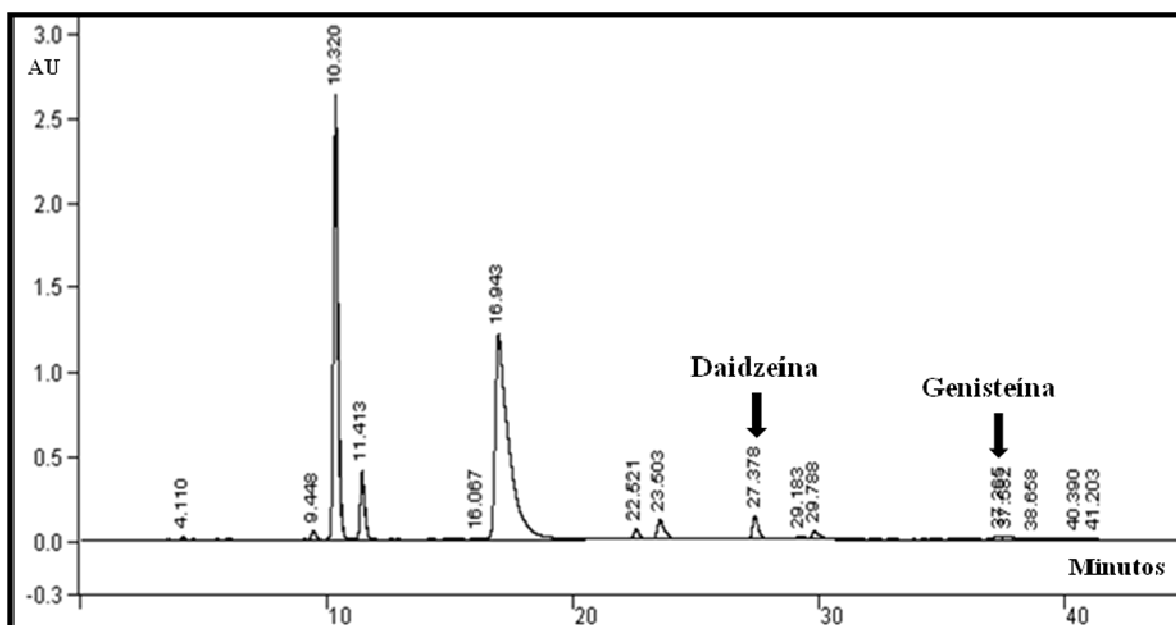


Figura 67: Cromatograma do extrato do medicamento fitoterápico A após EFS.

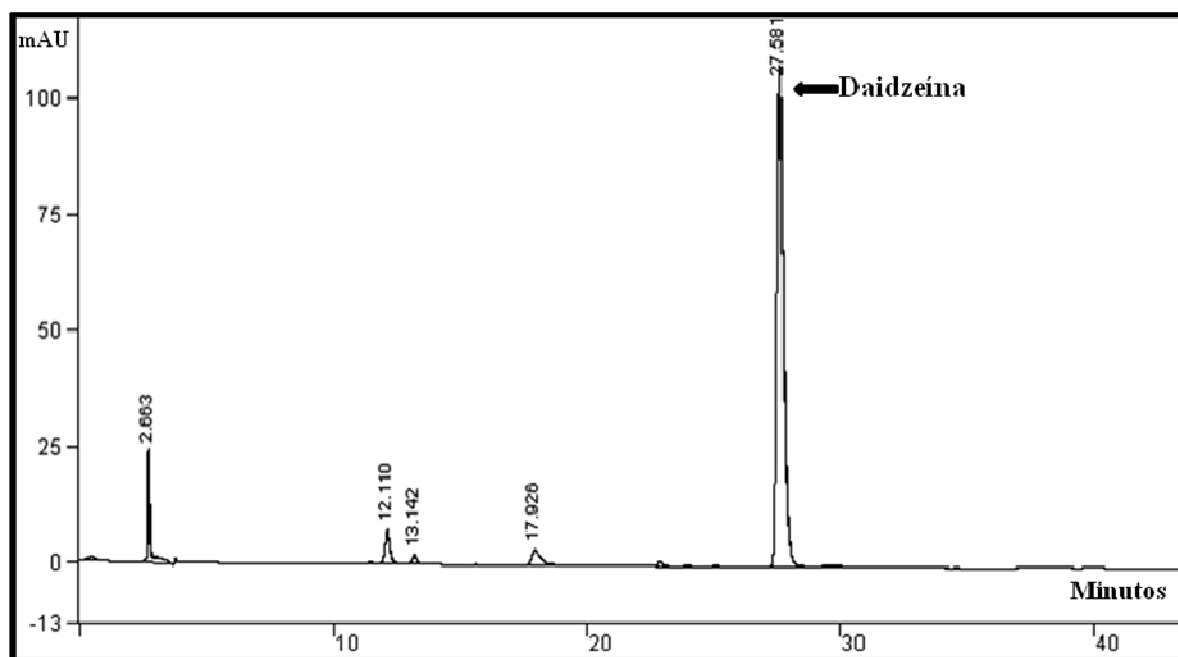


Figura 68: Cromatograma do extrato do medicamento fitoterápico B após extração simples.

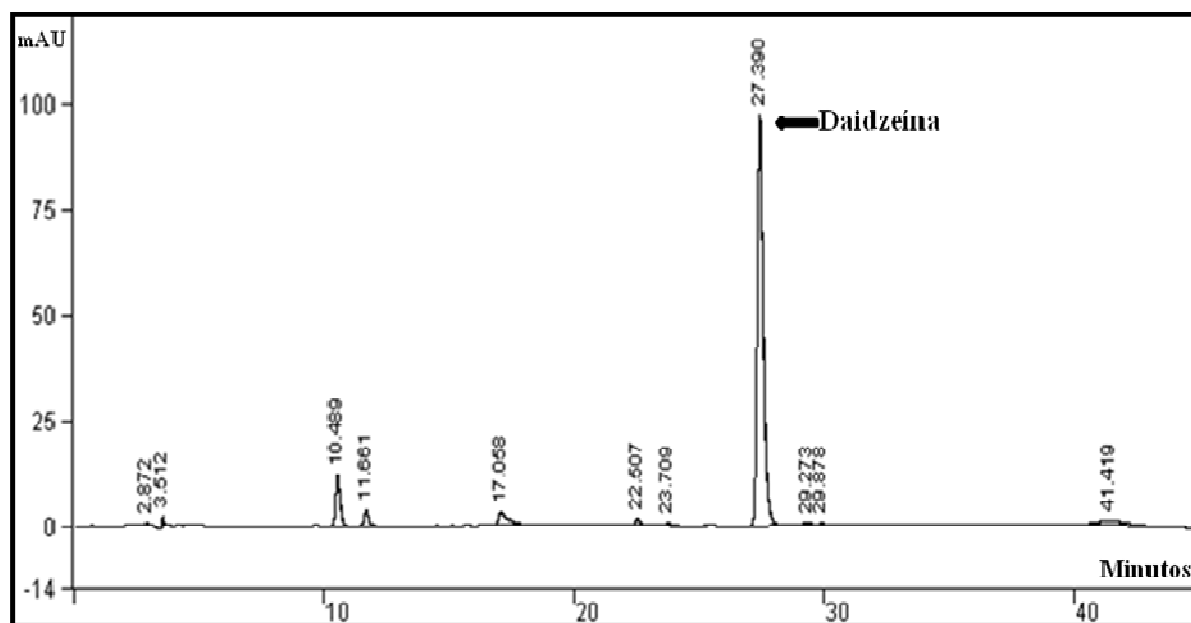


Figura 69: Cromatograma do extrato do medicamento fitoterápico B após EFS.