CAPÍTULO 2

Isoflavonas em Soja

Isoflavonas em Soja

OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO NA DETERMINAÇÃO DE ISOFLAVONAS EM CÁPSULAS DE SOJA

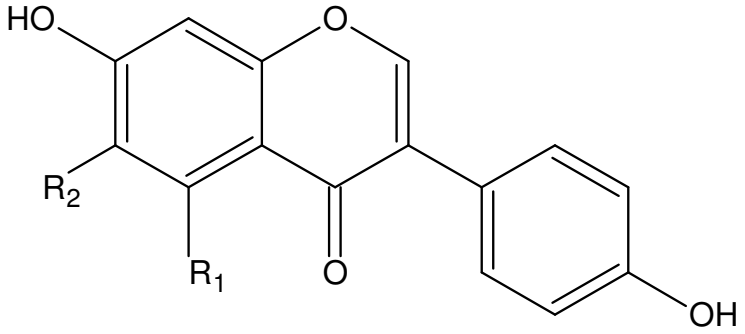
2.1 – A SOJA

A soja é originária da China há milhares de anos, sendo que as primeiras citações apareceram no período de 2883 e 2838 a.C. e introduzida na Europa no final do século XV.[1] Os asiáticos consomem sementes de soja de várias formas, incluindo leite de soja, tofu, produtos fermentados como o missô (pasta de semente de soja), molho de soja, natto (semente fermentada que contém predominantemente agliconas) e tempeh.[2]

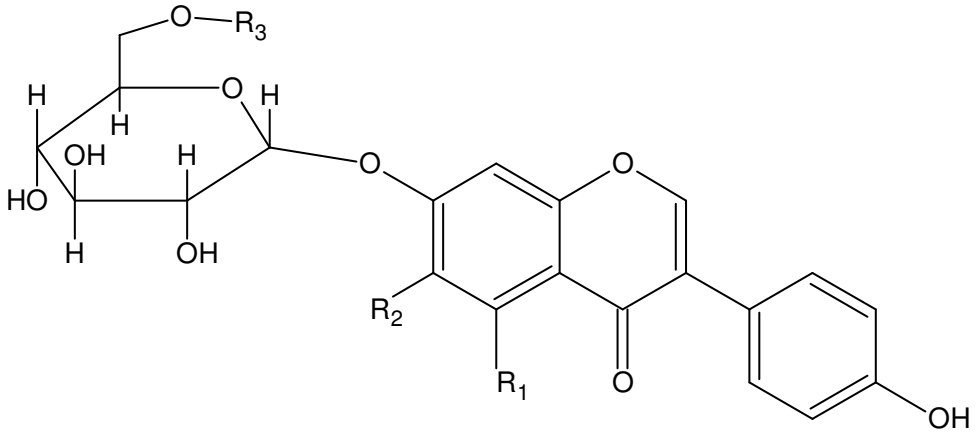
De acordo com a literatura, doze isoflavonas foram isoladas da soja, incluindo: três agliconas (daidzeina, gliciteina e genisteina), três glicosídeos: 6-O-glicosídeo (daidzina, glicitina e genistina), três 6”- O-acetil glicosídeo (6”-O-acetil glicosídeo daidzina, 6”- O-acetil glicosídeo glicitina, 6”- O-acetil glicosídeo genistina) e três 6”-O-malonil glicosídeo (6”-O-malonil glicosídeo daidzina, 6”-O-malonil glicosídeo glicitina, 6”-O-malonil glicosídeo genistina). Na Figura 9 são apresentadas as estruturas das 12 isoflavonas mencionadas.

As formas predominantes de isoflavonas na semente de soja e produtos não fermentados são os glicosídeos, enquanto os produtos fermentados contêm principalmente as agliconas. Após o consumo, os glicosídeos sofrem metabolismo enzimático no intestino para liberar as agliconas, a qual é a forma bio-disponível; também tem sido reportado que a saliva humana é capaz de converter os glicosídeos em agliconas.[2]

De acordo com Fukutake e colaboradores a quantidade de genisteina em produtos fermentados da semente de soja foi maior que em sementes de soja e produtos não fermentados tais como leite de soja e tofu, entretanto, produtos fermentados como missô e natto apresentaram quantidades significativas de genisteina. No molho de soja foram encontrados genisteina e genistina, mas em níveis menores do que no missô e natto.[3]



Composto	Abreviatura	R_1	R_2
Daidzeina	De	H	H
Gliciteina	Gli	H	OCH_3
Genisteina	Ge	OH	H



Composto	Abreviatura	R1	R2	R3
Daidzina	Din	H	H	H
Glicitina	Glin	H	OCH_3	H
Genistina	Gin	OH	H	H
6-O-Malonildaidzina	Mdin	H	H	$COCH_2COOH$
6-O-Malonilglicitina	Mglin	H	OCH_3	$COCH_2COOH$
6-O-Malonilgenistina	Mgin	OH	H	$COCH_2COOH$
6-O-Acetildaidzina	Adin	H	H	$COCH_3$
6-O-Acetilglicitina	Aglin	H	OCH_3	$COCH_3$
6-O-Acetilgenistina	Agin	OH	H	$COCH_3$

Figura 9 – Estruturas das isoflavonas da soja.

2.1.1 - Benefícios da Soja

Isoflavonas são substâncias fitoquímicas, do subgrupo dos flavonóides, encontradas em uma variedade de plantas, principalmente na semente da soja (*Glycine max*), podendo contribuir para uma série de efeitos para a saúde. Os benefícios dos produtos da soja são intensamente investigados e, tem-se mostrado que o seu consumo pode prevenir certos tipos de câncer,[4,5] reduzir o risco à osteoporose,[6,7,8] diminuir o risco de doenças coronárias, colesterol,[9] sintomas da menopausa,[10,11] etc. Isoflavonas são referidas como fitoestrógenos devido a sua habilidade em interagir com receptores estrogênicos nas células. Elas possuem estrutura química semelhante à dos estrógenos, tais como o 17-β-estradiol.[12]

Para saber a importância da isoflavona genisteina a revista científica *Phytochemistry,* considerada de alto impacto,[13] publicou um artigo intitulado GENISTEIN - Molecules of Interest, sendo que seus benefícios são mostrados na Figura 10.

Genisteina é uma isoflavona da soja com diversas atividades biológicas. É um potente antioxidante, apresenta efeitos terapêuticos para os cânceres da mama e da próstata, osteoporose, doenças cardiovasculares, inibe a carcinogênese da pele, entre outros.[14]

De acordo com Mebrahtu e colaboradores, genisteina e daidzeina são os dois importantes componentes das isoflavonas, conhecidas pelas suas propriedades antioxidantes que contribuem para os benefícios da saúde.[15]

As isoflavonas do gérmen de soja exercem efeitos favoráveis no sistema vasomotor e perfil lipídico, mostrando ser uma alternativa interessante para mulheres na menopausa com contra-indicação na terapia de reposição hormonal convencional.[16] Gérmen de soja representa a matriz da soja contendo concentrações de isoflavonas de 6 a 10 vezes superiores daqueles encontrados em outros alimentos da soja.

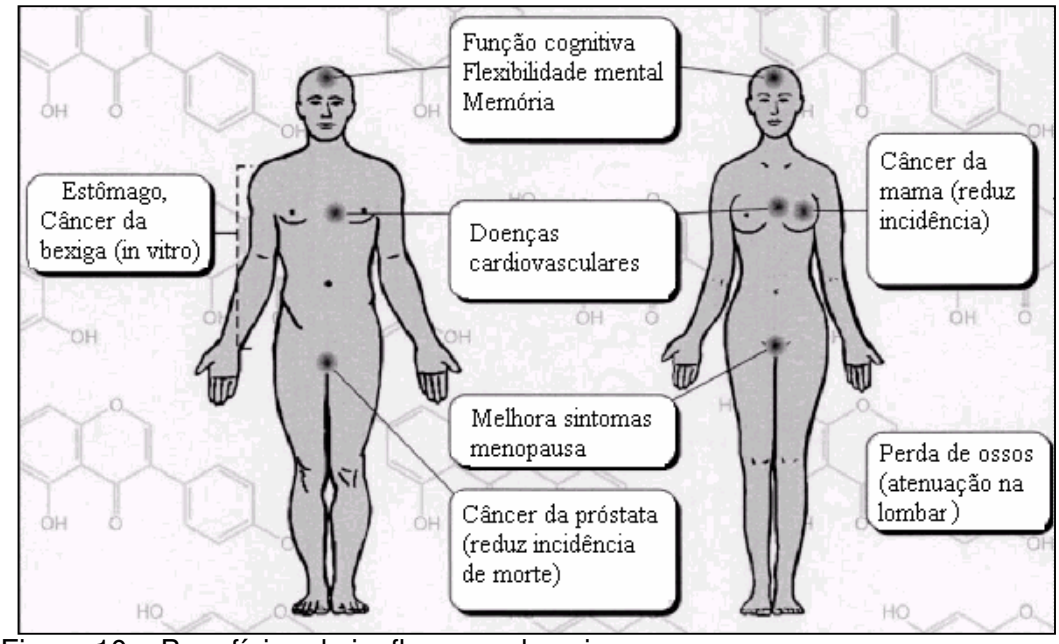


Figura 10 – Benefícios da isoflavonas de soja.

2.1.2 - Índices Econômicos

O Brasil é o segundo maior produtor de grãos de soja,[35] produziu 50 milhões de toneladas no ano de 2003, sendo um dos principais produtos de exportação. Em 2002, o Brasil exportou aproximadamente 15,6 milhões de tonelada em grão, 12,5 milhões de farelo de soja e 1,7 milhão de óleo bruto. Os principais compradores do grão são a Holanda seguida de China, Alemanha e Espanha. O maior estado produtor é o Mato Grosso, seguido de Paraná e Rio Grande do Sul. Até a década de 80 a produção concentrava-se no Sul do Brasil, a partir da década de 90 o Centro-Oeste tornou-se a principal região produtora, sendo responsável por cerca de 40% do total da produção brasileira.[17]

2.1.3 - Técnicas Usadas para Determinação de Isoflavonas

A determinação de isoflavonas em alimentos e materiais biológicos tem sido realizada por cromatografia gasosa (CG),[18] cromatografia gasosa acoplada a massas (CG-MS),[19] cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC),[20,21,22,23] cromatografia líquida acoplada a massas (LC-MS)[24] e eletroforese capilar (CE).[25,26,27]

Duas revisões foram reportadas para a apresentação de métodos analíticos na determinação de fitoestrógenos entre os anos de 2002 a 2004 [28, 29] e uma revisão é apresentada para a identificação e quantificação de fitoestrógenos em alimentos e fluídos biológicos.[30]

2.1.4 - Extração de Isoflavonas

Para a extração de daidzeina e genisteina dos alimentos, a extração líquido-líquido, extração sólido-líquido, cromatografia contra-corrente e extração em fase sólida têm sido usadas. Mitani *et al.* determinaram estas isoflavonas por microextração em fase sólida acoplada a HPLC.[31]

De acordo com Fukutake e colaboradores o pré-tratamento freqüentemente aplicado para isoflavonas em soja é a extração líquido-líquido. Os solventes mais comumente usados para a extração de isoflavonas na soja são os álcoois aquosos, como metanol e etanol, acetonitrila acidificada ou não.[3]

Genovese e Lajolo verificaram que o melhor solvente para extração de isoflavonas é metanol (MeOH) 80%, não havendo diferenças significativas das extrações realizadas por ultra turrax ou com agitação, estes autores utilizaram como técnica a HPLC, na qual utilizando ACN como meio extrator verificaram picos distorcidos, havendo melhoras com a acidificação deste meio. Em produtos alimentícios, a fim de concentrar a amostra e devido a presença de interferentes, as amostras foram eluídas em cartuchos de extração em fase sólida (SPE).[12]

De acordo com Murphy e colaboradores a extração por acetonitrila é superior a acetona, etanol e metanol na extração das isoflavonas encontradas em alimentos.[32]

Coward e colaboradores verificaram que a extração a 80° C causa conversão extensiva de 6-O-malonil glicosídeo a β-glicosídeo mas não a 6-O-acetil glicosídeo ou aglicona, 6-O-malonil glicosídeos foram instáveis quando expostos ao calor. A extração a temperatura ambiente também leva a perda de 6-O-malonil glicosídeo, mas a menor velocidade. Verificou-se também que triturar a soja para produzir farinha, seguido de extração por hexano, para remover gorduras, não altera a quantidade de glicosídeos. Segundo os autores, a extração a quente para produzir tofu e leite de soja

resulta na formação de glicosídeos e a fermentação para produzir missô, natto e tempeh, causam perdas de glicosídeos para formar agliconas.[33] Outros autores têm sugerido que as formas malonil convertem diretamente a acetil e então para β-glicosídeos durante o processamento por aquecimento dos alimentos.[32]

De acordo com Eisen e colaboradores a diminuição de malonildaidzina e malonilgenistina ocorre após maceração e cozimento na produção de leite de soja e tofu, concomitantemente e 6-O-acetildaidzina e 6-O-acetilgenistina são gerados durante o processamento térmico.[34]

De acordo com Park *et al.*, as formas malonil e glicosil isoflavonas são transformadas em glicosil isoflavona e acetil durante o processamento da soja para extração do óleo de soja.[35]

Segundo Coward, os isoflavonóides na forma malonil são instáveis e sensíveis ao aquecimento, decompondo com facilidade para a forma glicosilada.[36]

2.2 - OBJETIVO

Neste trabalho foi realizada a otimização da extração das isoflavonas em cápsulas de gérmen de soja, variando-se o tipo de solvente e o tempo de extração; foi também avaliada a composição do solvente utilizado para diluir os extratos obtidos, variando-se a relação metanol:água, a concentração de micelas e de tetraborato de sódio, visando a obtenção de picos simétricos, com alta eficiência por eletroforese capilar. Por fim, foi realizada uma tentativa de identificação das isoflavonas que contém o grupo malonil, a partir dos espectros UV, mobilidade eletroforética e por hidrólise da amostra, após limpeza do extrato por SPE.

2.3 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

2.3.1 - Instrumentação

Todos os experimentos foram realizados em um equipamento de eletroforese capilar (modelo $HP^{3D}CE$, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, E.U.A.), equipado com um detector de arranjo de diodo, sendo que o comprimento de onda utilizado foi de 269 nm, com controlador de

temperatura, mantida a 20° C, e com programa de aquisição e tratamento de dados (HP ChemStation, rev A.06.01).

As soluções foram injetadas hidrodinamicamente a 40 mbar durante 3 s e o equipamento foi operado em polaridade normal com tensão constante de 25 kV. Foi usado um capilar de sílica fundida (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, E.U.A.) com dimensões de 58,5 cm de comprimento total, 50,0 cm comprimento efetivo e 75 μm de diâmetro interno (d.i.), 375 μm de diâmetro externo (d.e.). No início de cada dia o capilar foi condicionado com NaOH 1 mol L^{-1} (5 min), seguido por 5 min de água desionizada e eletrólito (30 min). Entre as corridas o capilar foi lavado com eletrólito por 3 min. O eletrólito foi constituído de tetraborato de sódio, SDS e MeOH.

O método indireto para a determinação do acetato foi realizado em um equipamento de eletroforese capilar da Beckman Coulter utilizando o seguinte eletrólito: 10 mmol L^{-1} de ácido 3,5 dinitrobenzóico, 0,5 mmol L^{-1} brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), pH 3,55 monitorado em 254 nm, a 25° C. O extrato foi injetado hidrodinamicamente por 35 mbar durante 3 s sendo o sistema operado sob polaridade invertida e tensão de 20 kV. Um capilar de sílica fundida (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, E.U.A.) foi usado com dimensões 58,5 cm de comprimento total, 50,0 cm comprimento efetivo e 75 μm de d.i., 375 μm de d.e..

2.3.2 – Reagentes, Padrões e Soluções

Foram utilizados reagentes de grau analítico, solventes de grau cromatográfico e água purificada por desionização (Milli-Q system, Millipore, Bedford, MA, E.U.A.). Soluções estoque de padrões de 6 isoflavonas (Daidzeina, Daidzina, Genisteina, Genistina, Gliciteina e Glicitina) da ChromaDex foram preparadas na concentração de 200 mg L^{-1}, cada uma, em metanol, estocadas a 4° C e usadas após adequada dissolução.

2.3.3 – Amostra e Seu Preparo

Cápsulas de gérmen de soja foram compradas em farmácias locais de 4 diferentes marcas. As cápsulas continham extratos secos de soja

(Laboratório A) ou extratos secos de soja dispersos em excipientes (dióxido de silício, estereato de magnésio ou silicato e celulose microcristalina (Laboratório B e C) ou suspendida em óleo de soja (Laboratório D). As amostras, de cada cápsula, foram analisadas em triplicata sendo o conteúdo de 10 cápsulas misturadas para diminuir o efeito de variação de uma única cápsula.

Para a planta do Laboratório A foram realizadas extrações utilizando metanol, acetonitrila e etanol nas proporções de 40, 60, 80 e 100%, de cada um, na proporção planta/solvente de 1/10 (m/v). O tempo de extração também foi avaliado de 10 a 240 min para o melhor solvente. Após o período de extração, os extratos foram centrifugados por 5 minutos em uma centrífuga da marca Quimis modelo 222T28. O sobrenadante foi retirado, sendo diluído apropriadamente. Avaliou-se o efeito da composição da matriz da amostra na separação, sendo que os extratos foram dissolvidos no próprio solvente (metanol puro), em 10 mmol L^{-1} de TBS contendo 10 % de MeOH e soluções contendo 20-35 mmol L^{-1} de SDS, com e sem TBS.

O mesmo procedimento de extração foi realizado para as cápsulas dos Laboratórios B, C e D, sendo as isoflavonas extraídas com 2 mL de metanol 80% (v/v) sob vórtex a temperatura ambiente por 2 h. Os extratos foram centrifugados e o sobrenadante foi diluído em 10 mmol L^{-1} TBS contendo 10% de metanol, injetado no sistema de eletroforese capilar.

SPE: O cartucho C-18, da marca Strata C-18E (50 µm, 70 ângstrons, 1000 mg/6 mL) foi condicionado com 6 mL de metanol seguido de água. Foram introduzidos no cartucho 1,6 mL do extrato de gérmen de soja (extraído em 80% metanol por 2 horas). A eluição foi feita com 3 mL de água, sendo esta fração descartada, seguido de 1,2 mL de metanol, fração recolhida. Esta fração foi dissolvida em 10 mmolL^{-1} de TBS contendo 10% de MeOH, sendo dividida em duas frações.

A primeira fração analisada pelos métodos de detecção direto e indireto, citados acima.

A segunda fração foi aquecida em banho-maria por 30 minutos a 100° C e injetada pelos métodos de detecção direto e indireto, citados acima. O aquecimento da amostra visa obter a hidrólise das isoflavonas que apresentam o grupo malonil em sua estrutura.

2.3.4 - Validação:

2.3.4.1 - Linearidade: Para a obtenção da curva analítica, seis concentrações dos padrões de isoflavonas foram preparadas na faixa de 1,6 a 50 μg mL^{-1}, sendo que foram realizadas análises em triplicata para cada ponto.

2.3.4.2 - Precisão: A precisão foi avaliada pela repetibilidade no próprio dia (intra-dia) e precisão intermediária, entre dias (inter-dia). A repetibilidade foi avaliada a partir dos resultados da área do pico de cada isoflavona, sendo que as amostras foram injetadas 6 vezes. A precisão intermediária foi realizada em 3 dias diferentes, sendo que todo o método foi testado desde a extração. O extrato foi preparado a cada dia, sendo injetado 3 vezes.

2.3.4.3 - Exatidão: A exatidão foi expressa como porcentagem de recuperação. A recuperação foi realizada com adição de padrão das isoflavonas de concentração conhecida na amostra de gérmen de soja sendo extraída em metanol 80% por duas horas em temperatura ambiente. Os extratos foram dissolvidos em 10 $mmolL^{-1}$ de TBS contendo 10% de MeOH.

2.4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4.1 - Otimização da Separação

A otimização da separação foi alcançada utilizando-se a metodologia de superfície de resposta 3^2 onde foram variadas as concentrações de metanol (0-10%) e SDS (20 a 70 mmol L^{-1}) mantendo-se 10 mmol L^{-1} de tetraborato constante, dados apresentados na tese de doutorado de um integrante do grupo LACE.[37,38]

2.4.2 - Otimização do Solvente Utilizado para Dissolver os Analitos

Na Figura 11 são apresentados os eletroferogramas de uma mistura dos padrões dissolvidos em metanol e em 10% de metanol com 10 mmol L^{-1} de TBS. Foram também testadas soluções contendo SDS de 20-35 mmol L^{-1} com e sem TBS (dados não mostrados). O valor ótimo obtido foi

apresentado na Figura 11 B. Esse valor foi atribuído como ótimo levando-se em conta a largura dos picos e a separação dos mesmos. Nota-se na Figura 11 A uma total perda de simetria de três destes picos. Esse resultado é atribuído a uma impossibilidade da presença de micelas no plug de amostra contendo apenas metanol.

Os três primeiros analitos apresentados no eletroferograma não apresentam esse perfil, pois provavelmente estes compostos estão ionizados tanto no plug de amostra como fora dele, assim eles sofrem stacking e migram mais rapidamente para fora do plug de amostra passando a interagir com as micelas.

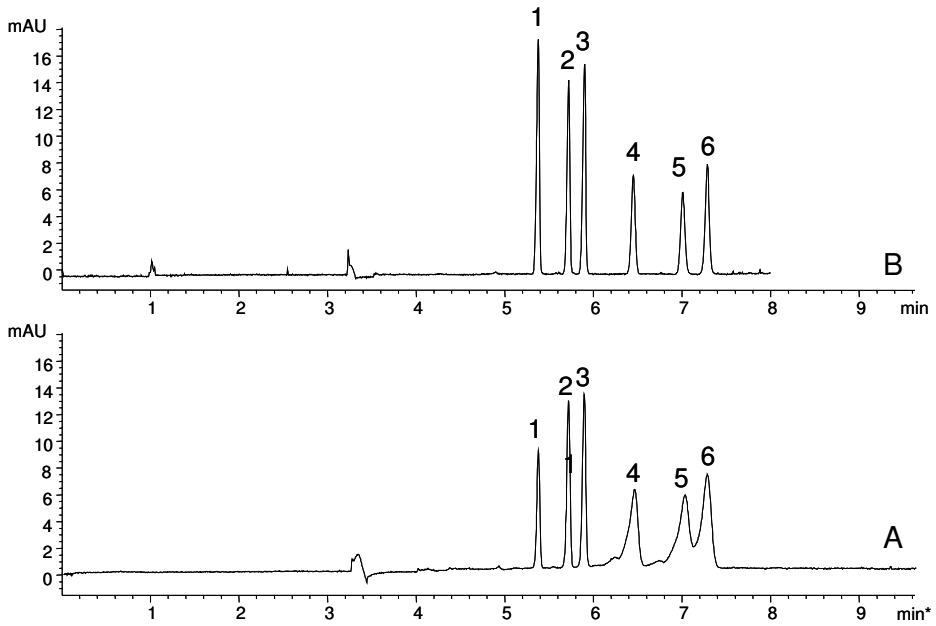


Figura 11 - Meio de dissolução dos padrões de isoflavonas (A) em metanol (B) em 10 mmol L^{-1} TBS e contendo 10% MeOH. Condições de separação: capilar 58,5 cm x 75 µm, 20° C, injeção 40 mbar, 3 s, 25 kV, eletrólito: TBS 10 mmol L^{-1}, SDS 40 mmol L^{-1}, 1% MeOH, 269 nm. Numeração das isoflavonas: 1 – Gli, 2 – De, 3 – Ge, 4 – Din, 5 – Glin, 6 – Gin.

2.4.3 - Otimização da Extração

Na Figura 12 são apresentadas quantidades totais de isoflavonas extraídas variando-se as concentrações de solvente de 40-100% bem como os tipos de solvente: metanol, etanol e acetonitrila. Pode-se observar que os máximos de extração foram obtidos utilizando-se 60% e 80% de ACN e

MeOH, respectivamente. Alguns autores têm reportado a melhor extração em 80% MeOH,[39] outros com 80% ACN,[40] alguns autores acidificam para obtenção de uma melhor recuperação.[41]

No trabalho apresentado foi analisado o extrato obtido com MeOH 80%. O solvente de escolha foi o metanol devido a presença do mesmo no eletrólito de corrida. A utilização de concentrações elevadas de solvente utilizado na extração é interessante, pois minimiza a extração concomitante de proteínas, o que poderia interferir na análise das isoflavonas, uma vez que as proteínas adsorvem no capilar alterando o fluxo eletrosmótico.[42]

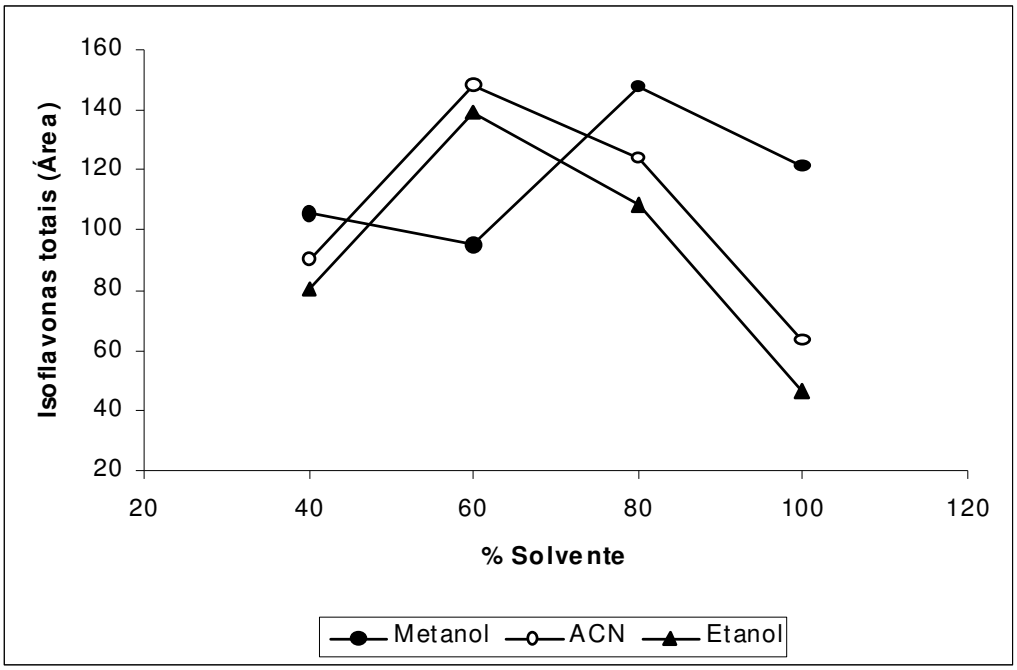


Figura 12 - Extração de isoflavonas em três tipos de solventes e em diferentes concentrações. Condições de separação: capilar 58,5 cm x 75 µm, 20° C, injeção 40 mbar, 3 s, 25 kV, eletrólito: TBS 10 mmol L^{-1}, SDS 40 mmol L^{-1}, 1% MeOH, 269 nm.

O estudo do tempo de extração é apresentado na Figura 13. Pode-se observar que na variação de duas para quatro horas não ocorre mudança significativa na quantidade de isoflavonas extraídas, desta forma, o tempo de duas horas foi escolhido para extração.

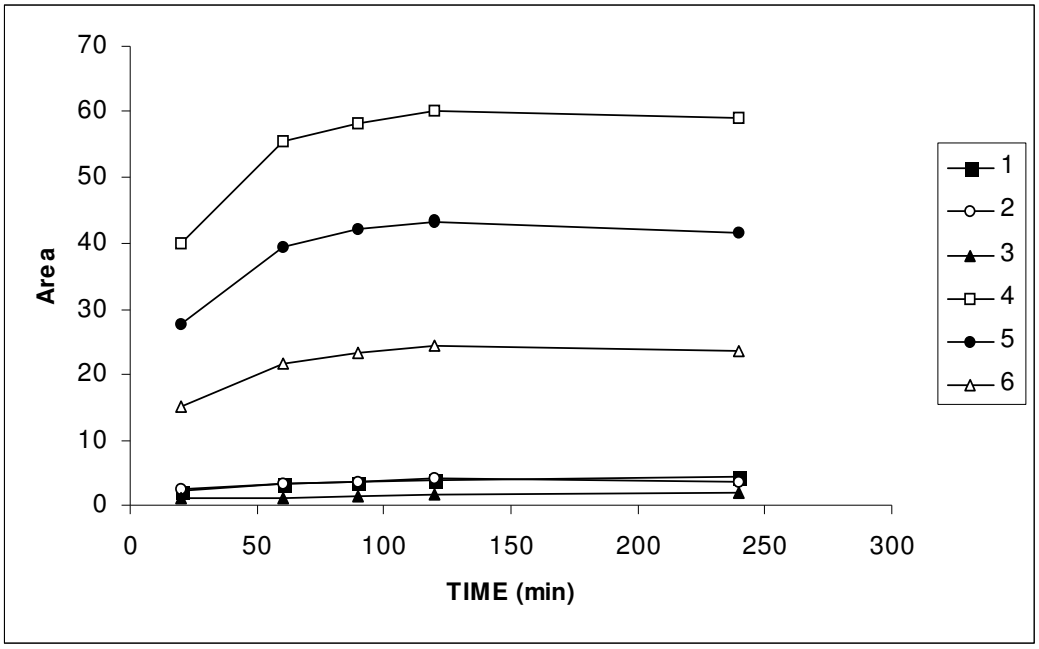


Figura 13 - Estudo do tempo de extração das isoflavonas no gérmen de soja. Condições de separação: capilar 58,5 cm x 75 µm d.i., 20° C, injeção 40 mbar, 3 s, 25 kV, eletrólito: TBS 10 mmol L^{-1}, SDS 40 mmol L^{-1}, 1% MeOH, 269 nm. Numeração das isoflavonas: 1 – Gli, 2 – De, 3 – Ge, 4 – Din, 5 – Glin, 6 – Gin.

2.4.4 – Tentativa de Identificação dos Compostos com Base no Espectro de UV, Comportamento Eletroforético e Hidrólise.

Das 12 diferentes isoflavonas existentes na soja espera-se que as isoflavonas que apresentam o grupo malonil tenham um maior tempo de migração, pois as mesmas apresentam carga negativa maior que as isoflavonas que não apresentam malonil na sua estrutura. Na Figura 14 B é apresentado o eletroferograma do extrato de gérmen de soja obtido sob condições otimizadas. Na Figura 14 A é apresentado o eletroferograma dos padrões de isoflavona apresentando os respectivos espectros de UV/Vis. Os picos marcados com o sinal de asterisco (*) foram identificados tentativamente como sendo do grupo malonil com base no perfil eletroforético e com base no espectro de UV para estes compostos. Outra evidência de que estes compostos são os derivados malonil é que segundo Carrão-Panizzi, M.C. *et al.*[43] os derivados malonil são facilmente convertidos em glicosídeos em altas temperaturas (maior que 80° C).

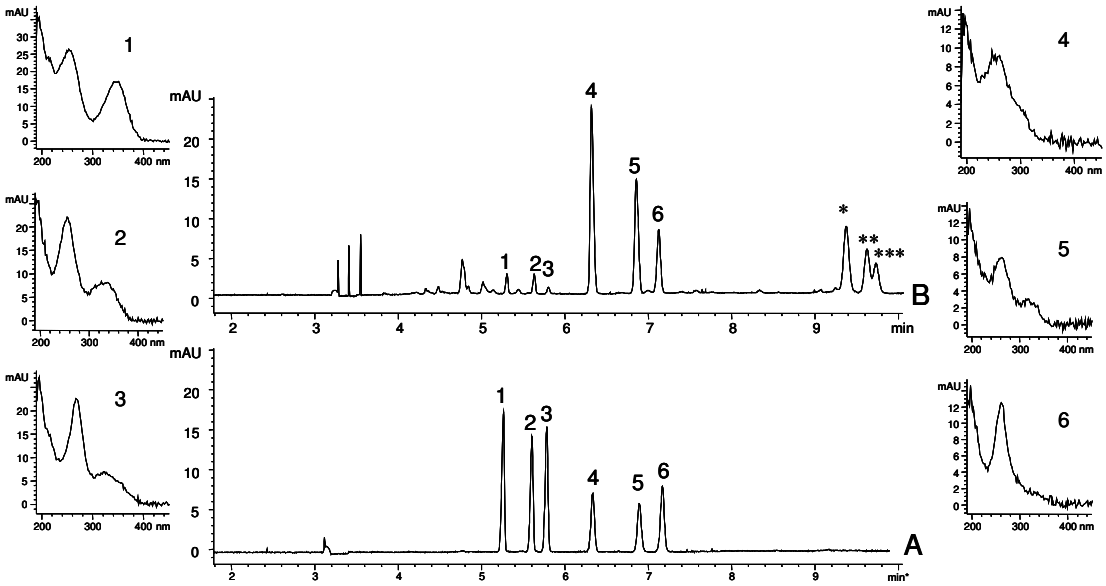


Figura 14 – Eletroferogramas dos padrões de isoflavonas (A) e do extrato de gérmen de soja (B). Condições de separação: capilar 58,5 cm x 75 µm, 20° C, injeção 40 mbar, 3 s, 25 kV, eletrólito: TBS 10 mmol L^{-1}, SDS 40 mmol L^{-1}, 1% MeOH, 269 nm. Numeração das isoflavonas: 1 – Gli, 2 – De, 3 – Ge, 4 – Din, 5 – Glin, 6 – Gin. Os picos marcados em asterisco referem-se aos grupos malonil.

Na Figura 15 A é apresentado um eletroferograma obtido aquecendo o extrato de gérmen de soja a 100 ^{o}C por 30 minutos. Pode-se observar que os últimos picos desaparecem, enquanto que os picos dos glicosídeos aumentam.

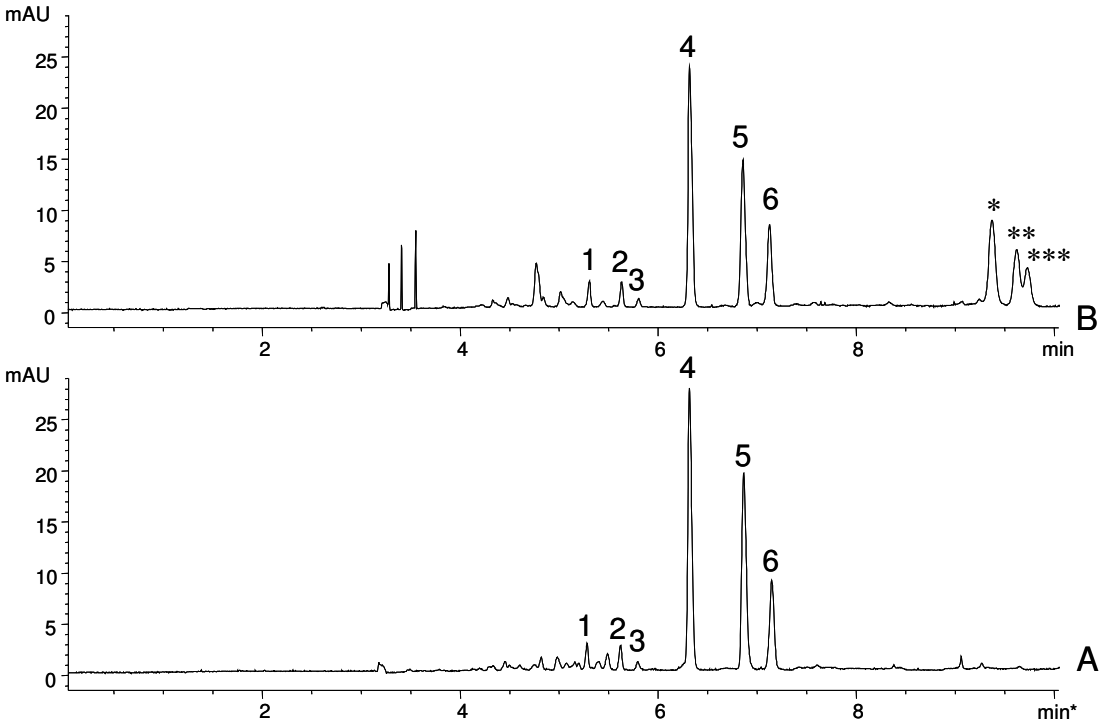


Figura 15 – Eletroferograma do extrato de gérmen de soja. (A) após hidrólise (B) sem hidrolisar. Condições de separação: capilar 58,5 cm x 75 µm, 20 ^{o}C, injeção 40 mbar, 3 s, 25 kV, eletrólito: tetraborato de sódio 10 mmol L^{-1}, SDS 40 mmol L^{-1}, 1% MeOH, 269 nm. Numeração das isoflavonas: 1 – Gli, 2 – De, 3 – Ge, 4 – Din, 5 – Glin, 6 – Gin.

2.4.4.1 - Produto Obtido Após Hidrólise dos Derivados Malonil

A hidrólise dos derivados malonil pode gerar derivados acetil e também glicosídeos. Quando os glicosídeos são formados não espera-se encontrar o ácido malônico livre mas sim o ácido acético, pois a instabilidade do ácido malônico frente ao aquecimento faz com que o mesmo sofra descarboxilização gerando CO_2 e ácido acético,[44] conforme Figura 16.

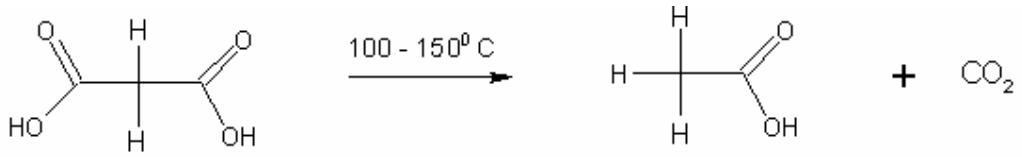


Figura 16 – Conversão do ácido malônico a ácido acético.

Nas Figuras 17 e 18 são apresentados os eletroferogramas referentes à análise do extrato de gérmen de soja submetido a SPE com e sem aquecimento (a temperatura da hidrólise foi de 100° C) segundo procedimento experimental. A utilização de SPE visa retirar o ácido acético natural da planta.

Na Figura 17 A e B são apresentados os eletroferogramas referentes a análise do acetato, pelo método indireto, antes e depois da hidrólise, verificando-se a presença do acetato.

Na Figura 18 A e B são apresentados os eletroferogramas referentes a análise direta das isoflavonas, antes e depois da hidrólise. As condições de separação para a obtenção destes eletroferogramas diferem das condições apresentadas anteriormente de modo a se conseguir uma maior resolução dos picos atribuídos tentativamente aos derivados malonil.

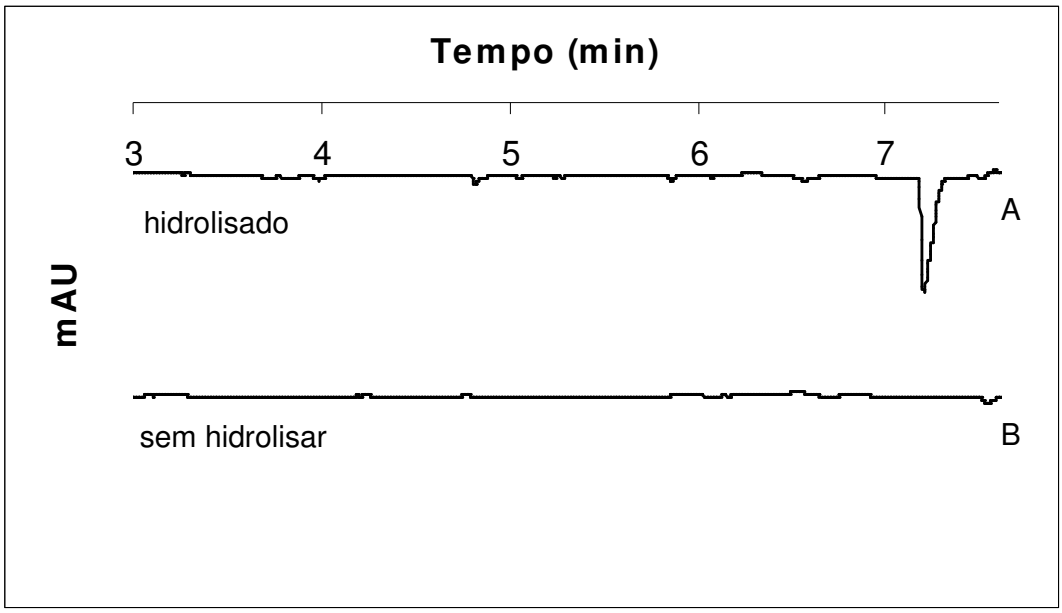


Figura 17 - Análise do extrato de gérmen de soja a partir do método de detecção indireta. (A) aquecido (B) sem aquecer. Condições de separação: eletrólito: 10 mmol L^{-1} de ácido 3,5 dinitrobenzóico, 0,5 mmol L^{-1} brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), pH 3,55 em 254 nm, a 25 ^{o}C, injeção 35 mbar / 3 s, tensão de 20 kV, capilar de sílica fundida 58,5 cm de comprimento total, 50,0 cm comprimento efetivo.

Também são apresentados na Figura 18 os espectros UV/Vis para os compostos Din, Glin e Gin, respectivamente. A partir das semelhanças espectrais atribuiu-se tentativamente a identificação para os três últimos picos como sendo Mdi, Mglin e Mgin, respectivamente.

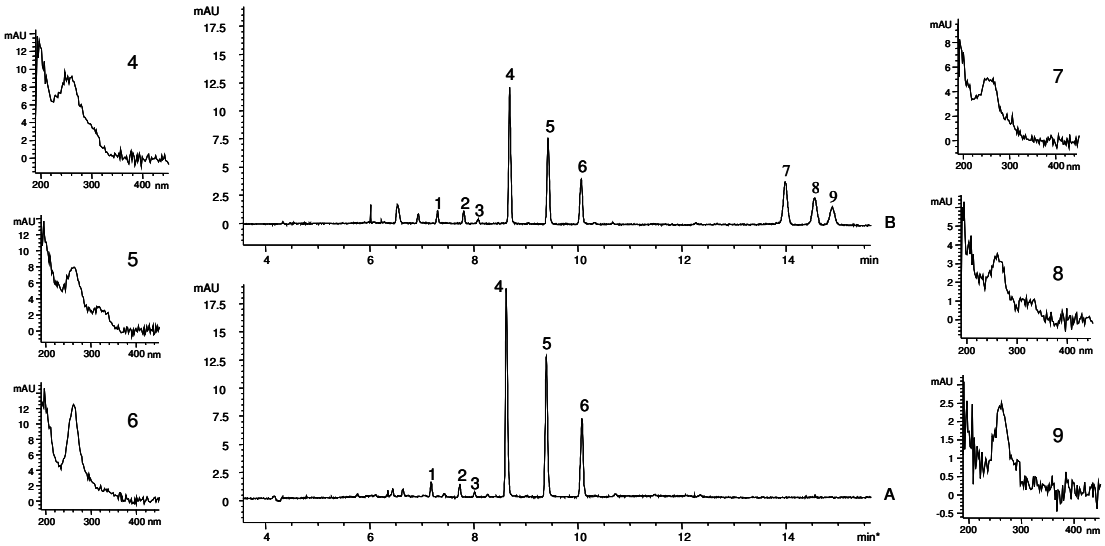


Figura 18 – Eletroferogramas dos extratos de gérmen de soja após limpeza em cartucho SPE (A) aquecido (B) sem aquecer. Condições de separação: capilar 58,5 cm x 75 µm, 20 ^{o}C, injeção 40 mbar, 3 s, 25 kV, eletrólito TBS 10 mmol L^{-1}, SDS 50 mmol L^{-1}, 10% MeOH, 269 nm. Numeração das isoflavonas: 1 – Gli, 2 – De, 3 – Ge, 4 – Din, 5 – Glin, 6 – Gin.

2.4.5 - Validação

Para avaliar a metodologia proposta para a análise de isoflavonas em cápsulas de gérmen de soja foram determinados os seguintes parâmetros de validação: linearidade, limite de detecção, de quantificação, precisão e exatidão.

A relação foi linear pela variação da área em função da concentração das isoflavonas, trabalhando-se nas faixas de concentrações de 1,6 µg mL^{-1} a 50 µg mL^{-1}. A curva analítica, o limite de quantificação (LOQ) e de detecção (LOD) são apresentados na Tabela 2. Todos os coeficientes de correlação foram maiores que 0,99999. O LOD das isoflavonas variou na faixa de 0,23 a 0,40 µg mL^{-1} e LOQ de 0,67 a 1,19 µg mL^{-1}. O limite de

quantificação foi obtido da curva analítica (LOQ = 10. SE/s, em que SE é o erro estimado da curva e s é a inclinação da curva).

Tabela 2 - Valores da curva analítica, coeficiente de correlação, LOD, LOQ das isoflavonas. 1 – Gli, 2 – De, 3 – Ge, 4 – Din, 5 – Glin, 6 – Gin.

Composto	Equação	r^2	LOD (µg mL^{-1})*	LOQ (µg mL^{-1})
1	y= 1,544x+0,0854	0,99999	0,23	0,69
2	y= 1,351x+0,1292	0,99999	0,23	0,68
3	y= 1,496x+0,1021	0,99999	0,23	0,69
4	y= 0,8768x-0,0381	0,99998	0,36	1,07
5	y= 0,8017x+0,0165	0,99997	0,40	1,19
6	y= 1,082x-0,1075	0,99999	0,22	0,67

Intervalo de 1,6 - 50 µg mL^{-1}

A repetibilidade do tempo de migração e da área do pico foi determinada para 6 consecutivas injeções de uma mistura contendo as 6 isoflavonas, de concentração 25 µg mL^{-1} cada. Os resultados são mostrados na Tabela 3. O coeficiente de variação dos tempos de migração e das áreas foi menor que 0,29 e 1,7%, respectivamente. Os resultados da precisão intermediária de 2 extratos preparados em dias diferentes (Laboratório A), análise em triplicata, mostraram valores de CV entre 3,4 e 6,2%, conforme Tabela 4. Todos os valores de CV indicaram boa precisão intra-dia e entre-dias.

Tabela 3 - Determinação da precisão intra-dia para análise das isoflavonas pelo método proposto. 1 – Gli 2 – De 3 – Ge 4 – Din 5 – Glin 6 - Gin. n = 6

Composto	CV do tempo de migração (%)	CV da área (%)
1	0,20	1,6
2	0,18	1,4
3	0,21	1,2
4	0,23	1,7
5	0,25	1,7
6	0,29	1,6

Tabela 4 - Determinação da precisão entre-dias para análise das isoflavonas pelo método proposto.

1 – Gli 2 – De 3 – Ge 4 – Din 5 – Glin 6 - Gin

Composto	CV (%)
1	5,4
2	5,3
3	6,2
4	3,9
5	3,5
6	3,4

n = 18 (3 dias, 2 preparações e injeção em triplicata para cada dia).

A exatidão do método foi expresso como porcentagem de recuperação dos extratos a partir de concentrações conhecidas das isoflavonas, sendo que os resultados obtidos ficaram na faixa de 99,1 a 103,6%, como apresentado na Tabela 5.

Tabela 5 - Recuperação das análises das isoflavonas em gérmen de soja.

1 – Gli 2 – De 3 – Ge 4 – Din 5 – Glin 6 – Gin

Composto	Concentração inicial ($\mu g\ mL^{-1}$)	Adicionado ($\mu g\ mL^{-1}$)	Encontrado ($\mu g\ mL^{-1}$)	Recuperação (%)
1	20,4	20	40,4	99,8
2	24,7	20	45,2	102,6
3	9,10	20	28,9	99,1
4	514	50	566	103,6
5	416	50	467	102,4
6	159	50	210	101,1

2.4.6 – Determinação das Amostras

Os resultados da quantificação de cápsulas farmacêuticas de diferentes laboratórios são mostrados na Tabela 6.

A amostra do Laboratório A foi analisada antes e após a hidrólise, indicando que somente as quantidades de isoflavonas 4, 5 e 6 aumentaram após a hidrólise. Também na Tabela 6, a soma de todas as isoflavonas após hidrólise é mostrada juntamente com a quantidade declarada pelos fabricantes, indicando boa concordâncias dos resultados.

Tabela 6 – Análise de isoflavonas totais em formulações comerciais.

2.5 - CONCLUSÕES

A extração das isoflavonas em gérmen de soja com 80% de metanol é eficaz em um tempo de 2 horas, seu custo é baixo, sem a necessidade de aquecimento. O meio de extração avaliado foi de importância para a simetria dos picos referentes às isoflavonas.

Após a hidrólise foi possível identificar as isoflavonas na forma malonil, mesmo sem possuir os devidos padrões, confirmando a presença destes pelos espectros obtidos e pelo tempo de migração das espécies.

A performance do método analítico mostrou ser de fácil implementação para a análise de isoflavonas em formulações farmacêuticas.

2.6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 - www.cnpso.embrapa.br, acessado em novembro de 2005.

2 - HUI, E.; HENNING, M.; PARK N.; HEBER, D.; GO, V.L.W., *J. Food Compos. Anal.,* v.14, p.199-206, 2001.

3 - FUKUTAKE, M.; TAKAHASHI, M.; ISHIDA K.; KAWAMURA, H.; SUGIMURA T.; WAKABAYASHI, K., *Fd Chem. Toxic.,* v.34, p.457-461, 1996.

4 - SARKAR F.H.; LI Y.W., *Cancer Invest.*, v.21 ,n.5, p.744-757, 2003.

5 - ADLERCREUTZ, H.; *The Lancet Oncol.*, v.3, p.364-373, 2002.

6 - HO, S.C.; WOO, J.; LAM, S.; CHEN, Y.; SHAM, A.; LAU, J., *Osteoporosis Int.,* v.14, n.10, p.835-842, 2003.

7 - ARJMANDI, B.H.; SMITH, B.J., *J. Nutr. Biochem.*, v.13, p.130-137, 2002.

8 - BROUNS, F., *Food Res. Int.,* v.35, p.187-193, 2002.

9 - SAGARA M.; KANDA T.; NJELEKERA M.; TERAMOTO T.; ARMITAGE L.; BIRT N.; BIRT C.; YAMORI Y., *J. Am. Coll. Nutr.*, v.23, n.1, p.85-91, 2004.

10 - HAN, K.K.; SOARES J.M.S.; HAIDAR, M.A.; DE LIMA, G.R.; BARACAT, E.C., *Obstet.Gynecol.*, v.99, n.3, p.389-394, 2002.

11 - WATANABE, S.; UESUGI, S.; KIKUCHI, Y., *Biomed. Pharmacother.*, v.56, p.302-312, 2002.

12 - GENOVESE M.I.; LAJOLO, F.M., *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v.21, n.1, p.86-93, 2001.

13 - DIXON, R.A.; FERREIRA, D., *Phytochemistry*, v.60, p.205-211, 2002.

14 - WEI, H.C.; SALADI, R.; LU, Y.H.; WANG, Y.; PALEP, S.R.; MOORE, J.; PHELPS, R.; SHYONG, E.; LEBWOHL, M.G., *J. Nutr.*, v.133, n.11, p.3811S-3819-S, 2003.

15 - MEBRAHTU, T.; MOHAMED, A.; WANG, X.Y.; ANDEBRHAN, T., *Plant Foods for Human Nutrition*, v.58, p.55-61, 2004.

16 - NAHAS, E.P.; NETO, J.N.; LUCA L.; TRAIMAN, P.; PONTES, A.; DALBEN, I., *Maturitas,* v.48, p.372-380, 2004.

17 - www.embrapa.br, acessado em novembro de 2005.

18 - BLUCK, L.J.C.; JONES, K.S.; THOMAS, J.; LIGGINS, J.; HARDING, M.; BINGHAM, S.A.; COWARD, W.A., *Rapid Commun. Mass Sp.,* v.16, n.24, p.2249-2254, 2002.

19 - HEINONEN, S.M.; HOIKKALA, A.; WAHALA, K.; ADLERCREUTZ, H., *J. Nutr.,* v.132 n.3, p.579s-579s, 2002.

20 - PENALVO, J.L.; NURMI, T.; ADLERCREUTZ, H., *Food Chem.*, v.87, p.297-305, 2004.

21 - NURMI, T.; MAZUR, W.; HEINONEN, S.; KOKKONEN, J.; ADLERCREUTZ, H., *J. Pharm. Biom. Anal.*, v.28, p.1-11, 2002.

22 - APERS, S.; NAESSENS, T.; STEEN, K.V.D.; CUYCKENS, F.; CLAEYS, M.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A., *J. Chromatogr. A*, v.1038, p.107-112, 2004.

23 - MELLENTHIN, O.; GALENSA, R.J., *J. Agric. Food Chem.*, v.47, p.594-602, 1999.

24 - ANTONELLI, M.L.; FABERI, A.; PASTORINI, E.; SAMPERI, R.; LAGANÀ, A., *Talanta*, v.66, n.4, p. 1025-1033, 2005.

25 - STARKEY, J.A.; MECHREF, Y.; BYUN, C.K.; STEINMETZ, R.; FUQUA, J.S.; PESCOVITZ, O.H.; NOVOTNY, M., *Anal. Chem.*, v.74, n.23, p.5998-6005, 2002.

26 - PENG, Y.; CHU, Q.; LIU, F.; YE, J., *Food Chem.* v.87, p. 135-139, 2004.

27 - SHIHABI, Z.K.; KUTE, T.; GARCIA, L.L.; HINSDALE, M., *J. Chromatogr. A*, v.680, p.181-185, 1994.

28 - WANG, C-C.; PRASAIN, J.K.; BARNES, S., *J. Chromatogr. B*, v.777, p.3-28, 2002.

29 - WU, Q.; WANG, M.; SIMON, J.E., *J. Chromatogr. B,* v.812, p.325-355, 2004.

30 - WILKINSON, A.P.; WAHALA, K.; WILLIAMSON, G., *J. Chromatogr. B* v.777, p.93-109, 2002.

31 - MITANI, K.; NARIMATSU, S.; KATAOKA, H., *J. Chromatogr. A*, v.986, p.169-177, 2003.

32 - MURPHY, P.A.; BARUA, K.; HAUCK, C.C., *J. Chromatogr. B*, v.777, p.129-138, 2002.

33 - COWARD, L.; SMITH, M.; KIRK, M.; BARNES, S., *Am. J. Clin. Nutr.*, v.68, p.1486S-1491S, 1998.

34 - EISEN, B.; UNGAR, Y.; SHIMONI, E., *J. Agric. Food Chem.*, v.51, p.2212-2215, 2003.

35 - PARK, Y.K.; AGUIAR, C.L.; ALENCAR, S.M.; MASCARENHAS, H.A.A.; SCAMPARINI, A.R.P., *Ciênc. Tecnol. Aliment.,* v.3, n.3, p.156-160, 2001.

36 - COWARD, L., BARNES, N.C., SETCHELL, K.D.R., BARNES, S., *J. Agric. Food Chem.*, v.41, n.11, p.1961-1967, 1993.

37 - MICKE, G.A., São Paulo, 2004, Tese de doutorado, Instituto de Química de São Paulo – Universidade de São Paulo.

38 - MICKE, G.A., FUJIYA, N.M., TONIN, F.G., COSTA, A.C.O., *J. Pharm. Biom. Anal.,* 2006 (no prelo).

39 - ELDRIDGE, A.C., *J. Agric., Food Chem.*, v.30, p.353, 1982.

40 - FARMAKALIDIS, E.; MURPHY, P.A., *J. Agric. Food Chem.*, v.33, p.385, 1985.

41 - GRIFFITH, A.P.; COLLISON, M.W., *J. Chromatogr. A,* v.913, p.397, 2001.

42 - SCHWARTZ, H.E.; PALMIERI, R.H.; NOLAN, J.A., *Introduction to Capillary Electrophoresis of Protein and Peptides*, Beckman Instruments Omc, U.S.A., 1993.

43 - CARRÃO-PANIZZI, M.C.; BELÉIA, A.D.P.; Prudêncio-Ferreira, S.H.; Oliveira, M.C.N.; Kitamura, K., *Pesq. Agrop. Bras.*, v.34, n.6, p.1045, 1999.

44 - SOLOMONS, T. W., *Organic Chemistry*, 7.ed., New York, Wiley, 2000.