CAPÍTULO 3

EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS E NUTRIENTES DA FOLHA DA SOJA

3.1 – FOLHA DA SOJA

Nesta parte do trabalho foi realizado um estudo da extração de metabólitos secundários e nutrientes da folha de soja. A escolha foi feita pela atividade farmacológica e/ou importância no metabolismo da planta e a disponibilidade dos padrões em laboratório. A folha da soja foi escolhida uma vez que é a parte da planta que é utilizada como parte de adubo após decomposição da matéria orgânica, sendo portanto, considerada como resíduo sem valor.

Foram avaliados os flavonóides, cátions, ânions, ácidos graxos, açúcares, ácidos orgânicos.

3.1.1 - Flavonóides

Flavonóides são os grupos fenólicos mais comuns e largamente distribuídos nas plantas. Mais de 5000 diferentes flavonóides têm sido descritos, sendo classificados em 10 grupos químicos, a saber: flavona, flavonol, flavanol, flavanona, antocianina, catequina, chalcona, flavana, aurona e isoflavona. Os flavonóides são distribuídos em plantas que são ingeridas pelo homem e, portanto são importantes constituintes da dieta humana. O interesse destes metabólitos é devido aos efeitos benéficos na saúde humana.

Flavona, flavonol, flavanol, flavanona, antocianina e isoflavona são comuns na dieta. Flavonóis são os mais abundantes flavonóides em alimentos, como quercetina, kaempferol e miricetina. Flavanonas são principalmente encontradas em frutas cítricas e flavona em aipo. Catequinas estão presentes em grandes quantidades de chá verde e preto, enquanto que antocianinas são encontradas em frutas vermelhas (framboesa, amora, etc). Isoflavonas são quase exclusivamente encontradas em alimentos contendo soja. Muitos estudos têm mostrado um efeito protetor destes alimentos contra o tumor mamário. Nos vegetais ocorre a predominância da quercetina glicosilada, mas glicosídeos de kaempferol, luteolina e apigenina também estão presentes. Em frutas o predomínio é da quercetina glicosilada.

Polifenóis são os maiores compostos das plantas com atividade antioxidante. Os antioxidantes são necessários para prevenir a deterioração

de produtos cosméticos, farmacêuticos e plásticos. Além disso, propriedades biológicas como anti-carcinogênico, anti-mutagênico, anti-alergênico e atividade anti-idade têm sido reportadas pelos antioxidantes naturais e sintéticos, especial atenção é focalizada na extração de fontes econômicas ou resíduos das indústrias e da agricultura.[1]

Compostos fenólicos incluem uma grande diversidade de estruturas, possuindo, no mínimo, um anel aromático. Eles podem ser classificados de acordo com o tipo de esqueleto principal, como por exemplo, a classe de compostos constituída de C6 - C1 (C6 corresponde ao anel benzênico) são os ácidos fenólicos, exemplo, os flavonóides possuem esqueleto básico de C6 - C3 - C6.

A maioria dos representantes dos flavonóides possui 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, constituído de duas fenilas ligadas por uma cadeia de 3 carbonos entre elas. Nos compostos tricíclicos, as unidades são chamadas A, B e C e os átomos de carbono recebem numeração com números ordinários para os núcleos A e C e os mesmos números seguidos de uma linha (‘) para o núcleo B, Figura 19. Um grande número de flavonóides está ligado a açúcares, conhecidos como heterosídeos. São denominados de *O*-heterosídeos quando a ligação ocorre por intermédio de uma hidroxila e de *C*-heterosídeo quando a ligação ocorre com um átomo de carbono. Sem a presença de açúcar o metabólito é denominado aglicona ou genina.

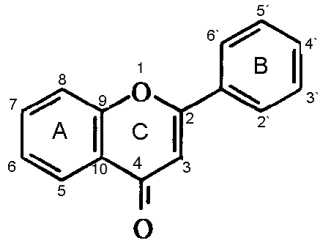

Figura 19 – Esqueleto básico de um flavonóide.

A Figura 20 apresenta algumas das sub-classes dos flavonóides.

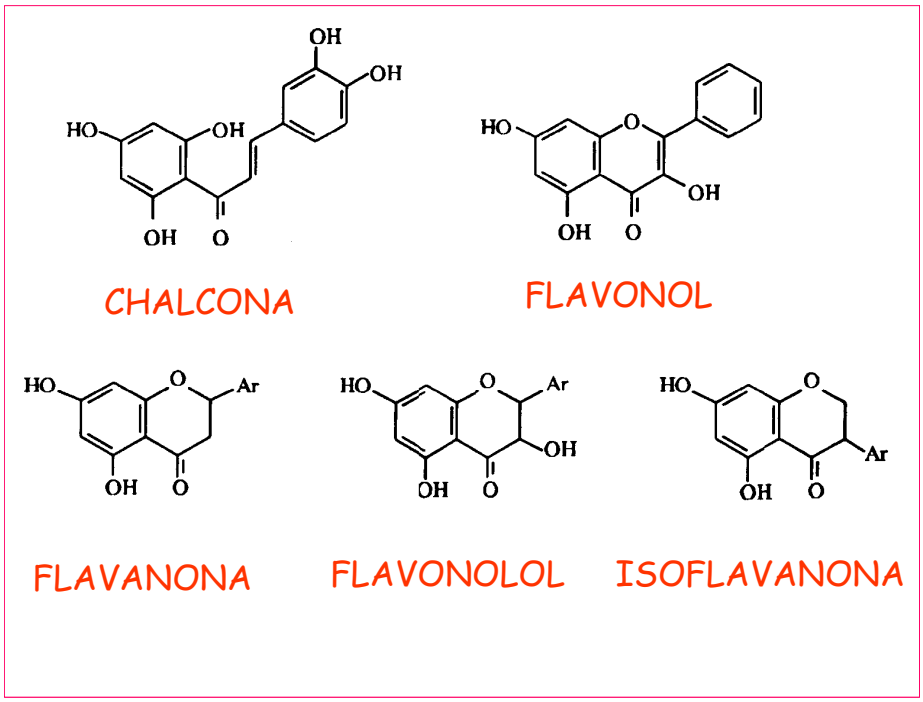

Figura 20 - Sub-classe de flavonóides.

Segundo Ho, *et al.*[2] a folha da soja é constituída principalmente de 6 tipos de flavonóides kaempferol glicosilados ausentes na semente de soja. Os seis compostos isolados e identificados foram: kaempferol-3-O-rutinosídeo, kaempferol-3-O-α-L-ramnopiranosil(1,2)-β-D-glicopiranosil (1,6)-β-D-galactopiranosídeo, kaempferol-3-O-(2,6-di-O-α-ramnopiranosil)-β-galactopiranosídeo, kaempferol-3-O-digalactopiranosídeo; kaempferol-3-O-diglicopiranosídeo, kaempferol-3-O-α-L-ramnopiranosil (1,6)-β-D-galactopiranosídeo e quantidades traços de malonil genistina e genistina.

Romani *et al.* investigaram o conteúdo polifenólico em diferentes partes da soja, entre elas, na folha da soja. Kampferol e quercetina glicosilados nas folhas da soja ocorreram como maiores compostos; foram identificados 2 quercetinas triglicosiladas, 6 quercetinas diglicosiladas, uma metil quercetina triglicosilada, 3 metil quercetina diglicosilada, 2 kaempferol triglicosilados, 4 kaempferol diglicosilados, 1 kaempferol monoglicosilado e 1 kaempferol aglicona. Nas folhas foram encontrados derivativos de genisteina

(malonil, acetil, genisteina). Os dois kaempferol triglicosilados são os mesmos encontrados por Ho e colaboradores.[3]

A Figura 21 apresenta os padrões de flavonóides da folha de soja disponíveis em laboratório, kaempferol-O-glucosídeo foi adicionado pois possui estrutura similar do kaempferol-O-rutinosídeo.

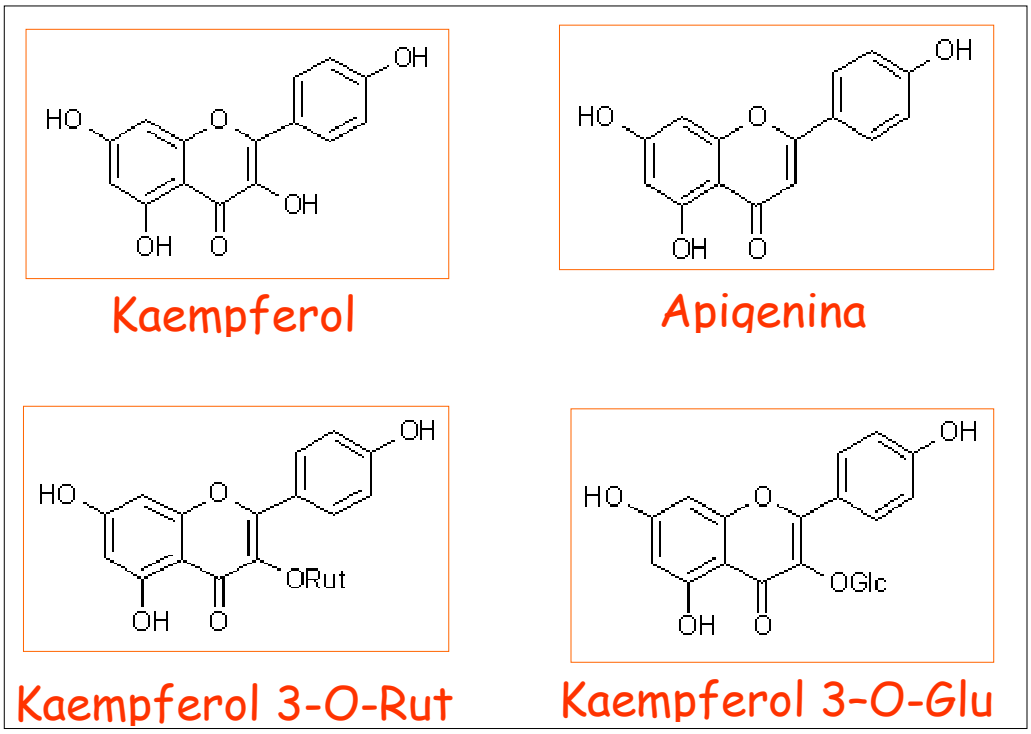

Figura 21 – Padrões de flavonóides componentes da folha da soja disponíveis em laboratório.

3.1.1.1 - Extração e Análise de Flavonóides

De acordo com Tura e colaboradores não é tarefa fácil encontrar um simples método de extração e hidrólise para análise de diversos grupos fenólicos devido a diferenças nas estruturas químicas dos compostos.[4] Devido a falta de padrões para muitos flavonóides glicosilados e seu grande número, é prática aceitável hidrolisar os glicosídeos a agliconas com HCl antes da análise.[5]

Flavonóides são comumente extraídos com metanol, etanol, água ou suas combinações, em alguns casos estes solventes são acidificados, tratados com HCl para a hidrólise dos flavonóides glicosilados em agliconas. O ensaio Folin-Denis é o mais usado para a quantificação de fenólicos totais

de plantas. O ensaio de Folin-Ciocalteu é também usado para a determinação total de fenólicos nas plantas, no entanto, este ensaio não é específico para determinar grupos fenólicos encontrados em extratos; outra desvantagem é a interferência de substâncias redutoras tais como ácido ascórbico.[6]

Keinanen[7] testou vários solventes (acetona, etanol e metanol) para extração de flavonóides em *Betula pendula* Roth e verificou que o solvente mais eficiente foi o metanol, ainda, de acordo com o mesmo, metanol sob refluxo é o solvente mais eficiente para a extração de flavonóides.

De acordo com Hertog *et al.*,[8] maior quantidade de kaempferol foi obtida com 1,6 mol L^{-1} HCl por 4 h para a cebola, alface, alho poró, aipo; de acordo com os autores, a extração utilizando HCl é mais eficiente que H_2SO_4. Skerget, *et al.*[9] citaram que 4 h foram necessárias para a obtenção de kaempferol livre nos extratos de oliveira (*Olea europaea*) e folhas de louro (*Lauris nobilis*). Hertog e colaboradores não observaram a degradação de padrões de flavonóides glicosilados tratados em condições idênticas às das plantas, portanto, a presença de alguns compostos na matriz acelerava a degradação dos flavonóides, possivelmente a composição da matriz é um fator importante para determinar a velocidade de hidrólise. De acordo com Justesen e colaboradores não foi possível realizar uma hidrólise completa para produzir agliconas, mesmo usando aquecimento por 4 h com 2 mol L^{-1} HCl para *Anethum graveolens* e cebolinha (*Allium schoenoprasun*).[10]

Simón *et al.* avaliaram o efeito da temperatura e pH na separação de flavonóides, em uma mistura contendo kaempferol-3-rutinosídeo, 4 quercetinas glicosiladas e 3 agliconas (isorhamnetina, kaempferol e quercetina) por CE. A melhor separação da mistura ocorreu em pH 9,5-9,6, de acordo com Pietta e colaboradores neste intervalo de pH o comportamento eletroforético é influenciado principalmente pelo tipo de ligação do açúcar com a aglicona.[11] A temperatura não influenciou na separação, portanto foi utilizada temperatura de 25° C.[12]

Uma revisão mais recente da análise de flavonóides por CE e CEC foi apresentado em 2005.[13]

3.1.2 – Ácidos Orgânicos

Os ácidos orgânicos são constituintes naturais de muitas plantas. Ácido cítrico, málico, succínico e oxálico são partes do ciclo de Krebs, sendo também intermediários dos carboidratos, lipídeos e proteínas. Muitos ácidos orgânicos são importantes no transporte de cátions e nutrientes.[14]

A importância dos ácidos orgânicos é, em algumas plantas, decisiva para a atividade farmacocinética e fisiológica sobre o organismo humano, é o caso do ácido salicílico, existente em grande quantidade na ulmária, no salgueiro e sabugueiro, que faz destes vegetais de eleição em estados febris e em situações reumáticas e dolorosas diversas, sintetizado em laboratório. Alguns ácidos orgânicos são utilizados na indústria de alimentos e bebidas, como adjuvantes e conservantes, sendo obtidos, por questões de rentabilidade, por meio da química orgânica industrial ou através da biotecnologia de fermentação. Os ácidos cítrico, benzóico, tartárico e sórbico são bons exemplos.[15]

3.1.2.1 – Extração e Análise dos Ácidos Orgânicos

Galli e Barbas[16] extraíram ácidos orgânicos de café de diferentes origens com água purificada sob agitação.

Wang *et al.* extraíram ácidos orgânicos da planta *Var splendens* com água a 50° C, por 30 min, sob agitação. [14]

Soga e Ross determinaram simultaneamente anions inorgânicos, ácidos orgânicos, aminoácidos e carboidratos por CE, meio altamente alcalino foi usado para assegurar a ionização iônica de todos os compostos e promover a migração ao ânodo. Em pH maior que 12 todos os carboidratos são carregados negativamente, assim como aminoácidos que possuem ponto isoelétrico de 2,98 a 10,76. Ácido piridinodicarboxílico (PDC) foi escolhido pois exibe mobilidade mediana, portanto desejável para análises de ânions de alta mobilidade assim como de baixa mobilidade como os açúcares.[17]

3.1.3 – Cátions

As plantas são capazes de assimilar certos micro e macro-nutrientes do solo, sendo que alguns sais inorgânicos são essenciais à membrana

celular e são envolvidos em variados processos metabólicos, enquanto que outros regulam a permeabilidade da membrana e intervém no processo osmótico, contribuindo para o balanço de água e meio apropriado para os processos bioquímicos.[18]

3.1.3.1 – Extração e Análise dos Cátions

Anions e cátions de *Eucalyptus globulus, E. cladocalyx, E. nitens* e *Pinus radiata* foram extraídos em água quente a 80° C, sob agitação por 30 min e analisados por CE. Nenhuma limpeza da amostra foi feita, em contraste com outras técnicas cromatográficas, onde a purificação por SPE para remoção de impurezas é necessária. No caso de CE há a possibilidade de que proteínas presentes em baixas concentrações afetem a separação com a diminuição da resolução. Este não é um problema visto que há caminhos de obter extratos livres de proteínas; extração com metanol-clorofórmio-água é uma alternativa à extração com água quente. No caso de extratos obtidos em água é possível obter extratos livres de proteínas por ultra-filtração com membranas seletivas ou por precipitação de proteínas com solventes orgânicos. Potássio foi o cátion dominante em todas as espécies, consistente com estudos anteriores, mostrando K^+ como o mais abundante cátion univalente nas células das plantas.[20]

De acordo com o trabalho de Cataldi e colaboradores, as amostras de folhas de pepino (*Cucumis sativus*), folhas de melancia (*Citrullus lanantus*) e folhas de oliveira (*Olea europaea*) foram extraídas com água, agitada por 15 min, sendo posteriormente centrifugadas. Para melhorar a dissolução do grupo II (Mg^{2+} e Ca^{2+}), que pode estar sujeito a efeitos quelantes da matriz orgânica do material da planta, ácido clorídrico (5 mmol L^{-1}) foi adicionado ao solvente; a análise foi feita por cromatografia iônica.[18]

Filgueiras e colaboradores[19] compararam a extração de Mg^{2+}, Mn^{2+} e Zn^{2+} por ultrassom e microondas em determinadas plantas (canela, noz moscada, páprica doce, páprica quente e chá preto), sendo a análise feita por espectrometria de absorção atômica. As plantas foram secas por 24 h a 70° C.

Para a extração de cátions e ânions Warren e Adams[20] utilizaram amostra seca e pulverizada de espécies de eucaliptos, sendo extraídos com água aquecida a 80° C, sendo transferida para água a 95° C, sem a necessidade de limpeza de amostra.

3.1.4 – Nitrato, Nitrito

Nitrogênio é um dos nutrientes necessário pelas plantas. As plantas obtêm nitrogênio do solo na forma de nitrato ou amônio. A partir da decomposição da matéria orgânica o nitrogênio é liberado como amônio, o qual é oxidado a nitrato por bactérias quimiossintetizantes dos gêneros *Nitrossomonas* e *Nitrobacter*. O nitrato não é apenas fonte de nitrogênio e sim um sinalizador de processos celulares.[21] O metabolismo de carboidratos é relacionado com o nitrato, alterando a relação dos processos de amido e sacarose. O crescimento de plantas é dependente do adequado suprimento de nitrogênio para formar aminoácidos, proteínas, ácidos □arrega□s e outros constituintes celulares necessários para o seu desenvolvimento.[22]

Mantovani e colaboradores[23] quantificaram o nitrato em alface a partir de extrato obtido em meio aquoso.

3.1.5 – Açúcares

Os carboidratos são os constituintes orgânicos mais abundantes das plantas, sendo distribuídos em uma grande variedade de tecidos, incluindo animais e microorganismos.[24]

3.1.5.1 – Extração e Análise de Açúcares

A determinação quantitativa de açúcares é baseada na extração de amostras em etanol ou água quente;[25,26] etanol a 80% v/v tem provado ser um bom extrator para os monossacarídeos, no caso, proteínas, polissacarídeos e oligossacarídeos são insolúveis e os monossacarídeos são estáveis nesse meio.[26] Kerepesi[25] extraiu açúcares de trigo (*Triticum aestivum* L) investigando diferentes métodos de extrações; a extração foi realizada em uma mistura contendo água e etanol 80%, nesta ordem de adição, depois invertendo a ordem dos solventes e, por último, extração dos açúcares somente em meio aquoso.

Açúcares têm sido analisados por HPLC, com detectores de índice de refração e detecção amperométrica, neste caso, este tipo de análise possui certos inconvenientes, como longos tempos de análises.

Métodos de análises eletroforéticas utilizando a detecção indireta têm sido realizados para análises de compostos que possuem baixa absorbância. No caso dos açúcares, altos valores de pHs são usados como forma de arrega-los negativamente, sem a necessidade de derivatização. Carboidrato carece de carga e de um cromóforo, e por isso, métodos para análise de carboidratos não derivatizados têm sido desenvolvidos. Estes métodos incluem o uso de eletrólito alcalino para ionizar os carboidratos.[27] O método de detecção indireta, utilizado neste trabalho, oferece uma alternativa de análise, sem a necessidade de derivatização dos açúcares. Como os açúcares possuem pK_a´s maiores que 12 ($pK_{a\ sacarose}$ = 12,51, $pK_{a\ galactose}$ = 12,35, $pK_{a\ glicose}$ = 12,35, $pK_{a\ frutose}$ = 12,03)[24], o eletrólito deverá estar acima deste pH para a ionização dos compostos, em pH´s acima deste valor os carboidratos estarão negativamente carregados.

3.1.6 - Ácidos Graxos

Os ácidos graxos podem ser definidos como ácidos carboxílicos, geralmente monocarboxílicos, alifáticos, não ramificados, saturados ou insaturados.[28]

Os átomos de carbono de um ácido graxo são numerados a partir do grupo hidroxila ou a partir do carbono mais distante da carboxila, por exemplo, para o ácido olêico é 9-18:1. O número 18:1 significa que o ácido graxo possui 18 carbonos com uma dupla ligação. O número 9 indica a posição da dupla ligação em relação ao terminal carboxila, isto é, a dupla ligação está entre os carbonos 9 e 10. Na Tabela 7 é apresentada a nomenclatura comum e oficial de alguns ácidos graxos.

Tabela 7 - Nomenclatura comum e oficial de alguns ácidos graxos.

Nome comum	Nome oficial	nº de átomos de carbono	Duplas ligações	Posições das duplas ligações
Palmítico	Hexadecanóico	16	0	0
Olêico	Octadecenóico	18	1	9
Linolêico	Octadecadiênóico	18	2	9,12
Linolênico	Octadecatrienóico	18	3	9, 12, 15

De acordo com Sangwan e colaboradores a composição do óleo de soja tem sido reportada, sendo constituída dos seguintes ácidos graxos: palmítico (9,3 a 17,4%), esteárico (2,2 a 7%), olêico (15,2 a 29,6%), linolêico (33,8 a 59,6%) e linolênico (4,3 a 15%).[29]

De acordo com Cossignani o óleo de soja é constituído de 11% de ácido palmítico, 4% de esteárico, 23% de olêico, 54% de linolêico e 8% de linolênico. Com esta composição o óleo de soja tem um bom perfil nutricional por causa da alta proporção de ácidos graxos insaturados.[30]

3.1.6.1 - Extração e Análise de Ácidos Graxos

Os ácidos graxos com cadeia menores que 16 são solubilizados com misturas hidroorgânicas contendo 40% metanol ou maior. A presença de 5 mmol L^{-1} de Brij-35 (CMC = 0,1 mmol L^{-1}) solubiliza ácidos graxos com cadeia acima de 24 carbonos. A presença de ACN melhora a solubilidade dos ácidos graxos diminuindo o fluxo eletrosmótico, resultando na melhor resolução para C-14 a C-20.[31]

3.2 – OBJETIVO

Um estudo da composição de diferentes metabólitos e nutrientes da folha da soja, a saber, flavonóides, ácidos orgânicos, açúcares, cátions, ânions e ácidos graxos livres foi conduzido por extrações seletivas na folha de soja (*Glycine max* L. Merr), utilizando como técnica instrumental a eletroforese capilar, bem como a validação completa para cada um, exceto ácidos graxos.

3.3 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.3.1 - Amostra da Folha de Soja

A folha de soja foi obtida de uma fazenda localizada na cidade de Rosário do Sul, no Rio Grande do Sul. Amostras foram coletadas em janeiro/2004 no final do período da colheita das sementes de soja. As folhas já estavam secas durante a colheita e foram colhidas aleatoriamente e moídas.

3.3.2 - Flavonóides

3.3.2.1 - Instrumentação

As análises foram realizadas 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 diodos, operando em 337 nm e um controlador de temperatura mantido a 20 °C. As dimensões do capilar foram: 75 μm de diâmetro interno (d.i.), 375 μm de diâmetro externo (d.e) e 58,0 cm de comprimento total (50,0 cm até o detector). A injeção foi feita hidrodinamicamente, aplicando 40 mbar de pressão por 3 s no reservatório contendo a amostra. A tensão aplicada durante a aquisição de dados foi de +20 kV. Entre as corridas, o capilar foi condicionado apenas com o eletrólito por 2 min. No início de cada dia, o capilar foi condicionado com NaOH 1 mol L^{-1} (5 min), seguido de água desionizada (5 min) e eletrólito (20 min).

3.3.2.2 - Reagentes, Padrões e Soluções

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico, os solventes de grau cromatográfico e a água utilizada no preparo das soluções foi desionizada pelo sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, E.U.A.). Padrões de flavonóides (kaempferol, apigenina, kaempferol-3-O-rutinosídeo e kaempferol-3-glucosídeo) foram obtidos da marca Chromadex e dissolvidos em etanol na concentração de 1000 μg mL^{-1} cada, perfazendo as soluções estoque. O eletrólito para quantificação consistiu de uma solução de tetraborato de sódio a 40 mmol L^{-1} contendo 20 mmol L^{-1} de dodecilssulfato de sódio (SDS) e 20% de metanol, em pH 9,3.

3.3.3.3 - Amostras e Seu Preparo

3.3.3.3.1 - Escolha da Porcentagem de Metanol para Extração de Flavonóides

Os extratos foram obtidos na proporção de 1:30 (planta/solvente, m/v). O extrato obtido por Soxhlet foi refluxado durante o período de 10 h em metanol puro. Concentrações de 50 a 100% de metanol foram avaliadas utilizando processador Ultra Turrax modelo 252-21 da Quimis Aparelhos Científicos Ltda., durante 1 hora, processado a cada 10 minutos, a 11.000 rotações por minuto (rpm).

O extrato obtido por Soxhlet proporcionou melhor recuperação dos flavonóides (conforme comparação de área total dos flavonóides). O extrato foi posteriormente hidrolisado. Este extrato foi analisado para a quantificação do kaempferol e apigenina livres.

3.3.3.3.2 - Hidrólise Ácida

A partir do extrato obtido por Soxhlet, foi avaliada a hidrólise dos flavonóides glicosilados na folha de soja.

Cinco concentrações de ácido clorídrico de 0,6; 1,2; 2,4; 3,0; 4,2 mol L^{-1} foram avaliadas e o tempo de reação de 5 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h e 4 h. A temperatura foi variada de 80 a 90 ºC. De acordo com Hertog *et al.*, a extração de flavonóides é mais eficiente com 50 % MeOH, portanto, todas as análises foram realizadas nesta concentração de solvente.

Uma etapa de limpeza de amostra para retirada do ácido clorídrico foi realizada por extração em fase sólida, utilizando o cartucho Strata C18-E (50 µm, 70 ângstrons) 1000 mg/6 mL, da Phenomenex. O cartucho foi condicionado com 10 mL de MeOH, seguido de 5 mL de água, 8 mL do extrato foi inserido no cartucho, seguido de eluição de 3 mL de água para retirada do ácido e seguido de 4 mL de MeOH ara eluição dos flavonóides. As amostras foram dissolvidas em 20 mmol L^{-1} TBS, a análise foi feita por eletroforese capilar.

3.3.3 - Cátions

3.3.3.1 - Instrumentação

As análises de cátions foram realizadas 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 diodos, operando em 214 nm, detecção indireta e um controlador de temperatura mantido a 29 °C. As dimensões do capilar foram: 75 µm de diâmetro interno, 375 µm de diâmetro externo e 48 cm de comprimento total (40 cm até o detector). A injeção foi feita hidrodinamicamente, aplicando 40 mbar de pressão por 3 s no reservatório contendo a amostra. A separação foi conduzida sob polaridade normal e tensão constante de +20 kV. Entre as corridas, o capilar foi condicionado apenas com o eletrólito por 2 min. No início de cada dia, o capilar foi condicionado com NaOH 1 mol L^{-1} (5 min), seguido de água desionizada (5 min) e eletrólito (20 min).

3.3.3.2 - Reagentes, Padrões e Soluções

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico, os solventes de grau cromatográfico e a água utilizada no preparo das soluções foi desionizada pelo sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, E.U.A.). Padrões de cátions (KCl, $CaCl_2$, $NaNO_3$, $MgSO_4$, $(NH_4)_2CO_3$), éter coroa, ácido hidroxibutírico (HIBA), imidazol, HCl (37%) foram obtidos da Merck (Darmstadt – Alemanha). Os padrões foram preparados a partir de seus sais dissolvidos em água na concentração de 1000 µg mL^{-1}, perfazendo as soluções estoque.

O eletrólito para quantificação consistiu de uma solução de 15 mmol L^{-1} imidazol, HIBA 5 mmol L^{-1} , éter coroa 2 mmol L^{-1} (pH 4,5, ajustado com HCl 6 mol L^{-1}).

3.3.3.3 - Amostra e Seu Preparo

As amostras foram preparadas a partir do pó da folha de soja. Exatamente 17,8 mg foram pesados e dissolvidos em 1 mL de água. A amostra foi deixada sob agitação por 15 min, sendo posteriormente

centrifugada por 5 min em 10.000 rpm, com a centrífuga da IEC International Equipment Company, modelo Micromax.

3.3.4 - Açúcares

3.3.4.1 - Instrumentação

As análises de açúcares foram realizadas 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 diodos, operando em 254 nm, detecção indireta e um controlador de temperatura mantido a 25 °C. As dimensões do capilar foram: 75 µm de diâmetro interno, 375 µm de diâmetro externo e 58,0 cm de comprimento total (50,0 cm até o detector). A injeção foi feita hidrodinamicamente, aplicando 40 mbar de pressão por 3 s no reservatório contendo a amostra. A separação foi conduzida sob polaridade invertida e tensão constante de –20 kV. Entre as corridas, o capilar foi condicionado apenas com o eletrólito por 2 min. No início de cada dia, o capilar foi condicionado com NaOH 1 mol L^{-1} (5 min), seguido de água desionizada (5 min) e eletrólito (20 min).

3.3.4.2 - Reagentes, Padrões e Soluções

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico, os solventes de grau cromatográfico e a água utilizada no preparo das soluções foi desionizada pelo sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, E.U.A.). Padrões de açúcares (frutose, glicose, galactose e sacarose) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, E.U.A.) e dissolvidos em água na concentração de 1000 µg mL^{-1}, perfazendo as soluções estoque. Brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) foi adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, E.U.A.), ácido aminopiridino dicarboxílico (PDC) foi adquirido da Fluka e metanol grau cromatográfico da Merck (Darmstadt – Alemanha).

O eletrólito para quantificação consistiu de uma solução de 10 mmol L^{-1} de PDC e 0,5 mmol L^{-1} de CTAB (pH 12, ajustado com NaOH 1 molL^{-1}).

3.3.4.3 - Amostra e Seu Preparo

As amostras foram preparadas a partir do pó da folha de soja de duas formas distintas:

1 – 30,6 g foram pesados e dissolvidos em 2 mL de água a 95 ºC, sob agitação por 35 min, sendo posteriormente centrifugado por 5 min em 10.000 rpm.

2 - 30,6 g foram pesados e dissolvidos em 1 mL de água a 95º C, sob agitação por 20 min, sendo posteriormente centrifugado por 5 min em 10.000 rpm. O sobrenandante foi retirado e a mesma amostra da folha de soja foi colocada novamente sob agitação por 15 min a 95 ºC em solução de 80% MeOH, sendo novamente centrifugado por 5 min em 10.000 rpm. As duas alíquotas foram misturadas e analisadas.

3.3.5 - Nitrato, Nitrito

3.3.5.1 - Instrumentação

As análises de nitrito e nitrato foram realizadas 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 diodos, operando em 210 nm, detecção direta e um controlador de temperatura mantido a 20 °C. As dimensões do capilar foram: 75 µm de diâmetro interno, 375 µm de diâmetro externo e 48 cm de comprimento total (40 cm até o detector). A injeção foi feita hidrodinamicamente, aplicando 40 mbar de pressão por 3 s no reservatório contendo a amostra. A separação foi conduzida sob polaridade normal e tensão constante de +20 kV. Entre as corridas, o capilar foi condicionado apenas com o eletrólito por 2 min. No início de cada dia, o capilar foi condicionado com NaOH 1 mol L^{-1} (5 min), seguido de água desionizada (5 min) e eletrólito (20 min).

3.3.5.2 - Reagentes, Padrões e Soluções

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico, os solventes de grau cromatográfico e a água utilizada no preparo das soluções foi desionizada pelo sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, E.U.A.). Padrões de nitrito e nitrato adquiridos a partir de seus sais (nitrito e nitrato de sódio) e

ácido sulfúrico foram obtidos da Merck (Darmstadt – Alemanha), sendo que os padrões foram dissolvidos em água na concentração de 1000 μg mL^{-1}, perfazendo as soluções estoque. β-alanina e brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, E.U.A.).

O eletrólito para quantificação consistiu de uma solução de 30 mmol L^{-1} β-alanina, 0,2 mmol L^{-1} CTAB (pH 4, ajustado com H_2SO_4 100 mmol L^{-1}).

3.3.5.3 - Amostra e Seu Preparo

As amostras foram preparadas a partir do pó da folha de soja. Exatamente 61,4 mg foram pesadas e dissolvidas em 1 mL de água, a amostra foi deixada sob agitação por 30 min, sendo posteriormente centrifugada por 5 min em 10.000 rpm.

3.3.6 - Ácidos Orgânicos

3.3.6.1 - Instrumentação

As análises de ácidos orgânicos foram realizadas em um equipamento de eletroforese capilar (modelo P/ACE System 5010, Beckman Coulter, Inc, Fullerton, CA, E.U.A.), equipado com um carrossel de filtros posicionado em filtro de um comprimento de onda de 254 nm, detecção indireta e temperatura controlada de 30 °C e aquisição e tratamento de dados System Gold® Software. Capilar de sílica fundida de 57 cm de comprimento total e 50 de comprimento efetivo, 75 μm diâmetro interno e 375 μm diâmetro externo foi usada. As amostras foram injetadas hidrodinamicamente a 35 mbar durante 3 s. A separação foi conduzida sob polaridade invertida e tensão constante de 20 kV. No início do dia o capilar foi lavado com 1 mol L^{-1} NaOH (5 min), água desionizada (5 min) e eletrólito (10 min). Entre as corridas o capilar foi recondicionado com eletrólito por 2 min.

3.3.6.2 – Reagentes, padrões e soluções

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e água foi purificada por deionização (Milli-Q system, Millipore, Bedford, MA, E.U.A.)

Soluções estoques de aproximadamente 1000 mg L^{-1} dos padrões (ácido malêico, ácido glicólico, ácido d-aspártico, ácido cítrico, ácido oxálico, ácido D,L-tartárico, ácido succínico, ácido L-glutâmico, ácido D,L- málico e ácido malônico), lactato de sódio e brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, E.U.A.). Ácido 3,5-dinitrobenzóico (3,5-DNB) e hidrogenofosfato de sódio dihidratado foram adquiridos da Merck (Darmstadt – Alemanha). Acetato de sódio anidro foi obtido da Carlo Erba (Rodano, Itália), Tris-hidroximetilaminometano (TRIS) foi obtido da Fluka (Neu-Ulm, Alemanha).

O eletrólito foi constituído de 10 mmol L^{-1} 3,5-DNB, 8,5 mmol L^{-1} TRIS e 0,10 mmol L^{-1} CTAB (pH 3,65), sendo preparados diariamente pela pesagem dos reagentes. Soluções estoques dos ácidos carboxílicos e os sais foram preparados na concentração de 20 mmol L^{-1}, cada um, dissolvendo quantidade apropriada em água desionizada e estocada a 4 ^{o}C até a análise.

3.3.6.3 - Amostra e Seu Preparo

As amostras foram preparadas a partir do pó da folha de soja por 2 modos distintos:

1 - 37 mg foram pesados e dissolvidos em 2 mL de água, a amostra foi deixada sob agitação por 30 min, sendo posteriormente centrifugado por 5 min em 10.000 rpm.

2 - 37 mg foram pesados e dissolvidos em 2 mL de água, a amostra foi deixada em ultrassom (40 kHz) da marca Thornton Inpec Eletrônica S.A., modelo T7 C/T, por 30 min, sendo posteriormente centrifugada por 5 min em 10.000 rpm.

3.3.7 - Ácidos Graxos

3.3.7.1 - Instrumentação

As análises de ácidos graxos livres foram realizadas em um equipamento de eletroforese capilar (modelo P/ACE System 5010, Beckman Coulter, Inc, Fullerton, CA, E.U.A.), equipado com filtros, sendo um deles posicionado em um comprimento de onda de 200 nm, detecção direta e

temperatura controlada de 20 ^{o}C e aquisição e tratamento de dados System Gold® Software. Capilar de sílica fundida de 47 cm de comprimento total e 40 de comprimento efetivo, 75 μm de diâmetro interno e 375 μm diâmetro externo foi usada. Amostras foram injetadas hidrodinamicamente a 35 mbar, durante 3 s. A separação foi conduzida sob polaridade normal e tensão constante de +20 kV. No início do dia o capilar foi lavado com 1 mol L^{-1} NaOH (5 min), água desionizada (5 min) e eletrólito (10 min). Entre as corridas o capilar foi recondicionado com eletrólito por 2 min.

3.3.7.2 - Reagentes e Soluções

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e água foi purificada por desionização (Milli-Q system, Millipore, Bedford, MA, E.U.A.). O reagente tetraborato de sódio (TBS), Brij-35 e acetonitrila (grau cromatográfico) foram adquiridos da Merck (Darmstadt – Alemanha). Acetato de sódio anidro foi obtido da Carlo Erba (Rodano, Itália).

Eletrólito constituído de 10 mmol L^{-1} TBS, 10 mmol L^{-1} Brij-35 e 45% ACN (pH 9,3) foi preparado diariamente pela pesagem dos reagentes.

3.3.7.3 - Preparação da Amostra

As amostras foram preparadas a partir do pó da folha de soja por 2 modos distintos:

1 - 501 mg foram pesados e dissolvidos em 5 mL de hexano, a amostra foi deixada em ultrassom (40 kHz) por 25 min, sendo posteriormente centrifugada por 5 min em 10.000 rpm.

2 - 501 mg foram pesados e dissolvidos em 5 mL de hexano, a amostra foi deixada sob agitação por 25 min a 65 ºC, sendo posteriormente centrifugada por 5 min em 10.000 rpm.

Os dois extratos hexânicos obtidos foram saponificados, separadamente, da seguinte forma: 3 mL do extrato hexânico foram colocados em um balão de fundo redondo sendo adicionado 500 μL de hidróxido de sódio 0,5 mol L^{-1} dissolvido em metanol. Cada balão permaneceu, sob refluxo, em banho-maria, a 70 ºC por 25 min. A seguir, o

conteúdo foi transferido para um balão volumétrico sendo ajustado para o volume de 10 mL. A amostra foi injetada diretamente.

3.4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

A eletroforese capilar tem sido uma boa técnica de escolha para análises de metabólitos secundários em matrizes complexas com alta eficiência e mínimo tratamento de amostra.

Abaixo estão apresentados os resultados obtidos dos vários metabólitos e nutrientes da folha de soja.

3.4.1 - Flavonóides

3.4.1.1 - Otimização do Procedimento de Extração

Devido às características fracamente ácidas do grupo hidroxil (pKa de aproximadamente 9), os compostos fenólicos dissociam em eletrólitos tais como tampão tetraborato movendo-se como ânions num sistema eletroforético. Quando o pH diminui os flavonóides se tornam neutros e cessam de migrar sendo arrastados pelo fluxo. Em pH intermediário, os ácidos fenólicos possuem carga negativa devido a dissociação do grupo carboxila (pK_a = 5), podendo ser melhor visualizados quando presentes conjuntamente com flavonóides na amostra.

As análises iniciais da soja foram feitas em extratos obtidos por diferentes metodologias (Soxhlet em metanol puro, ultra turrax em metanol puro, 80% e 50% de metanol) utilizando eletroforese capilar em solução livre. As primeiras análises foram feitas em eletrólito constituído de 20 mmol L^{-1} de TBS incorporando 20% MeOH. Observou-se que o extrato obtido por Soxhlet apresentou maior recuperação (comparação por área total, apresentado na Figura 22), portanto as análises subseqüentes foram realizadas com este extrato.

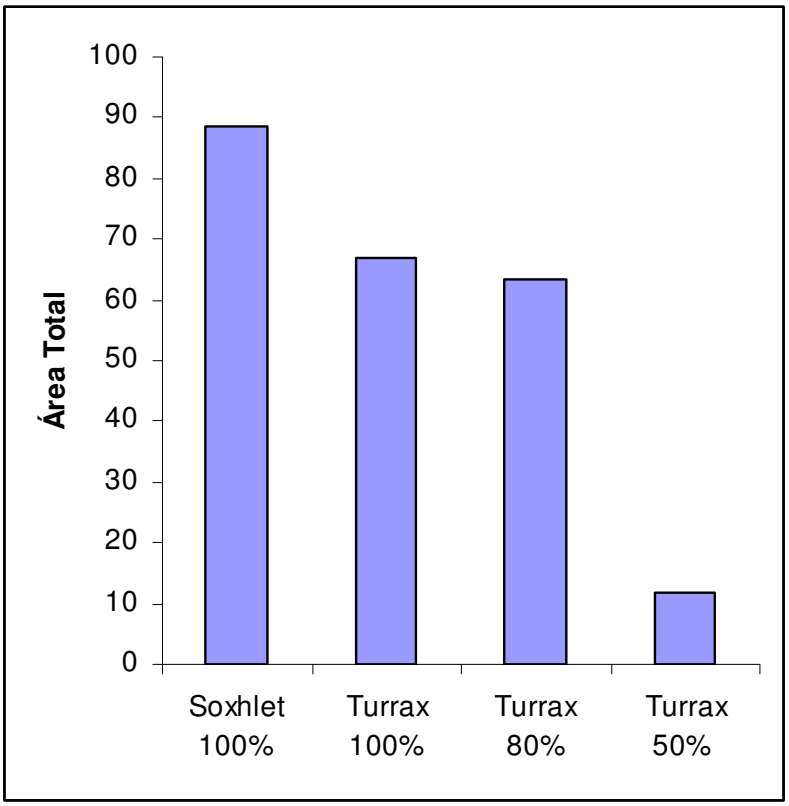

Figura 22 - Resultados obtidos dos extratos metanólico da folha da soja. Capilar 48,5 cm x 75 µm, 20 ^{o}C, injeção 40 mbar, 3 s, 20 kV, eletrólito TBS 40 mmol L^{-1}, SDS 20 mmol L^{-1}, 20% MeOH, 337 nm.

Para melhorar a resolução dos componentes da amostra a concentração de TBS foi variada de 20-50 mmol L^{-1}, de metanol de 20-30% e a tensão de 15-30 kV.

Como a separação dos componentes não foi satisfatória optou-se por outros eletrólitos em meio micelar, variando-se a concentração de SDS de 20-60 mmol L^{-1}, de metanol de 1-10%, de TBS de 10-30 mmol L^{-1} e tensão de 15-20 kV. A amostra foi dissolvida em diferentes soluções e proporções de água, metanol e SDS (Figura 27 otimizada).

A melhor resolução dos componentes do extrato foi obtida usando como eletrólito: 40 mmol L^{-1} SDS, 20 mmol L^{-1} TBS e 20% MeOH, pH 9, a 15º C e tensão de 15 kV.

Na folha de soja obtida a partir de Soxhlet (extrato metanólico) foi observada a presença de kaempferol e apigenina na forma livre e Kaempferol-O-rutinosídeo, confirmados por adição padrão, pelos espectros e

pelos tempos de migração de padrões (Figura 27B), sendo que esses dados confirmam os resultados da literatura.[2]

Análises foram feitas em dois comprimentos de onda de 337 nm, para flavonóides e 269 nm, para isoflavonas. De acordo com a literatura[32] e com dados apresentados no capítulo anterior, o melhor solvente para extração de isoflavonas é realizado em 80% de metanol. Nas análises em extratos obtidos por 80% MeOH em turrax e em Soxhlet 100% MeOH, verificou-se picos com espectros referentes de flavonóides, não observando espectros relacionados às isoflavonas.

Ao empregar o tampão fosfato como eletrólito, o eletroferograma da folha de soja mostra um pico em aproximadamente 5 min, juntamente com o fluxo eletrosmótico, o qual representa a co-eluição de todos os compostos neutros na amostra, incluindo os flavonóides. Os outros picos são ácidos fenólicos carregados negativamente neste eletrólito, como apresentado na Figura 23.

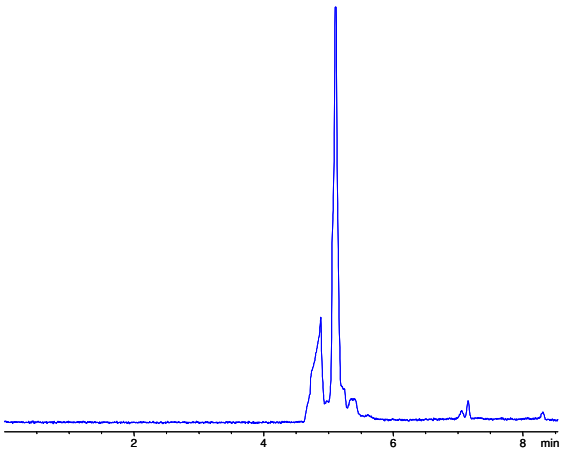

Figura 23 – Eletroferograma da folha de soja em pH 7,0 do extrato da folha da soja obtido por Soxhlet. Condições de análise: eletrólito: 20 mmol L^{-1} fosfato de sódio, pH 7,0, tensão 18 kV, 25 ºC, 337 nm. Injeção a 40 mbar por 3 s.

3.4.1.2 - Hidrólise Ácida de Flavonóides

A partir de dados da literatura a maior eficiência de hidrólise de flavonóides ocorre utilizando-se 50% MeOH.[8] Os flavonóides glicosilados foram, portanto, hidrolisados a agliconas com HCl em 50% MeOH. De

acordo com Hertog[8] a matriz da amostra é um importante fator para a condução da hidrólise.

Foram realizadas hidrólises variando o tempo de 5 min a 4 h, a temperatura de 80 e 90 ^{o}C e a concentração de ácido clorídrico de 0,6 a 4 mmol L^{-1}.

Em relação ao tempo de hidrólise verificou-se que em tempos maiores que 1 h a área total começou a diminuir e isto ocorreu devido a possível degradação dos compostos, o mesmo ocorrendo com concentrações de HCl acima de 1,2 mol L^{-1}. A combinação mais efetiva por hidrolisar a amostra recuperando-se maior quantidade dos componentes da amostra foi usando 1,2 mol L^{-1} de HCl, em tempo de 1 h, com temperatura de hidrólise de 78-80º C, conforme Figuras 24 e 25. A hidrólise ácida foi eficiente para a transformação dos kampferóis glicosilados em sua respectiva forma livre.

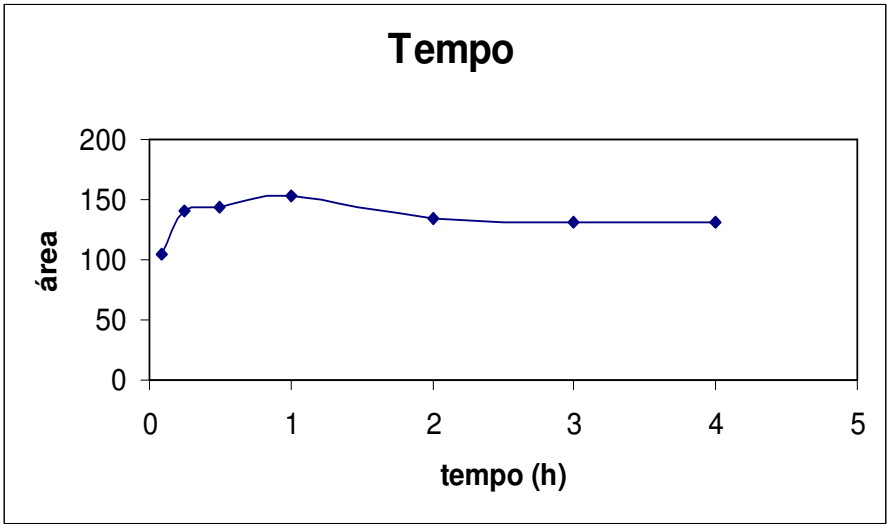

Figura 24 – Otimização do tempo de hidrólise.

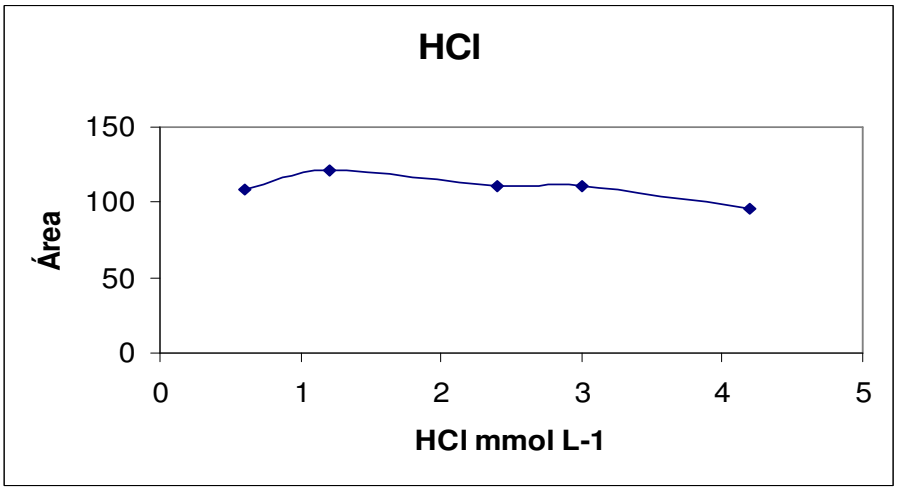

Figura 25 – Otimização da concentração de HCl.

A Figura 26 apresenta os eletroferogramas dos padrões de flavonóides e seus espectros, do extrato obtido por Soxhlet e do extrato após hidrólise sob condições otimizadas.

Os componentes de interesse da folha da soja foram identificados comparando o tempo de migração, os espectros de UV com os padrões e também por adição padrão, observando-se a presença de Kaempferol 3-O-rutinosídeo, kampferol e apigenina.

Kaempferol e apigenina foram analisados na forma livre após extração por Soxhlet e após hidrólise dos correspondentes kaempferóis glicosilados da folha da soja.

Análise quantitativa dos flavonóides livres foi conduzida usando 5 diferentes concentrações dos padrões, cada ponto correspondendo à análise em triplicata de cada padrão. A relação linear foi obtida pela variação da área em função da concentração, trabalhando nas faixas de concentrações de 25 a 400 $\mu g\ mL^{-1}$. Boa relação linear foi obtida para os flavonóides (maior que 0,99). Os valores de limite de detecção e quantificação são apresentados na Tabela 8 e foram calculados para a concentração que fornece relação sinal / ruído igual a três e dez, respectivamente.

A repetibilidade foi determinada quanto ao desvio para 5 consecutivas injeções dos padrões de flavonóides. Os resultados estão apresentados na Tabela 9.

A quantificação dos flavonóides foi realizada na forma livre e após hidrólise, sendo os resultados apresentados nas Tabelas 10 e 11, respectivamente. Os resultados da Tabela 11 são de dois extratos obtidos de acordo com o mesmo procedimento em dias diferentes (resultados inter dias).

A exatidão foi calculada como recuperação pela adição de concentrações conhecidas dos padrões, sendo que os valores obtidos ficaram em torno de 99%, conforme Tabela 12.

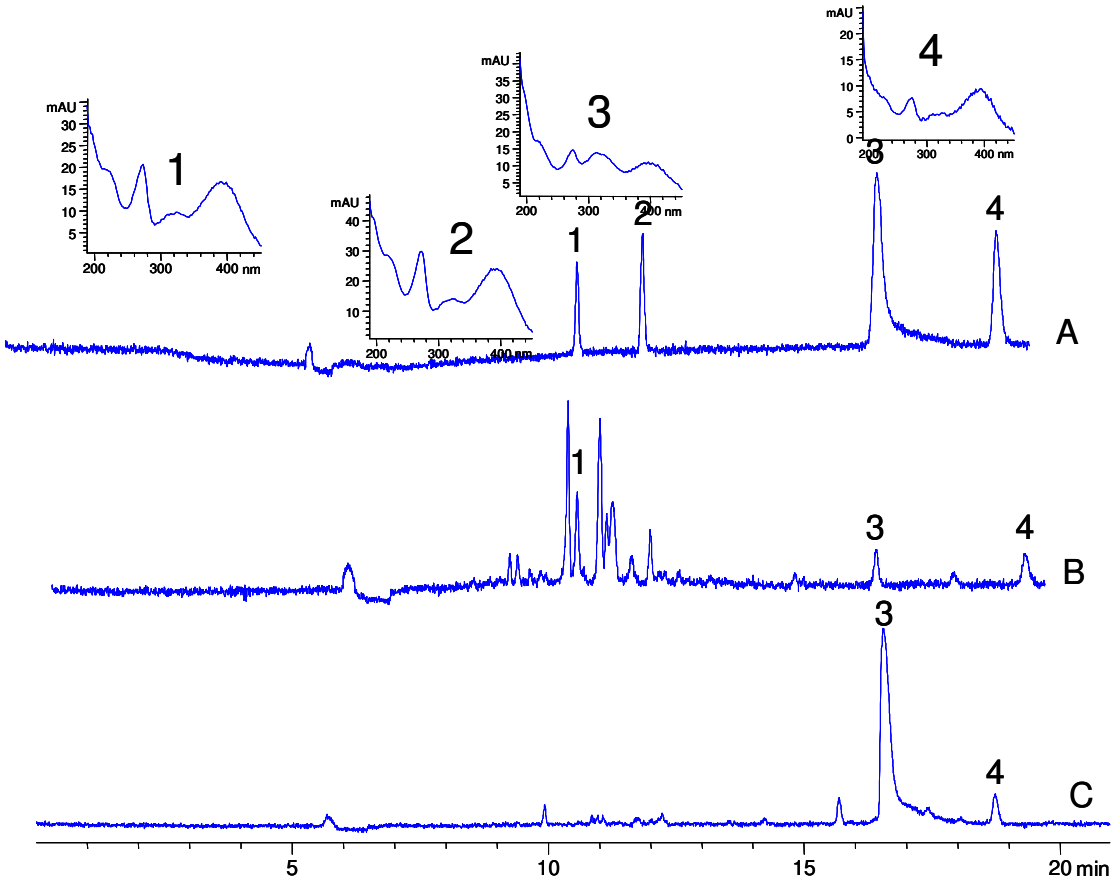

Figura 26 – Eletroferogramas do extrato da folha da soja obtido por Soxhlet e após hidrólise. Condições de análise: eletrólito: 40 mmol L^{-1} TBS, 20 mmol L^{-1} SDS, 20% MeOH, pH 9,3, tensão 20 kV, 20 ºC, 337 nm. Injeção a 40 mbar por 3 s. Hidrólise: 1 hora de extração, HCl 1,2 mol L^{-1}, 80º C. (A) Padrões de flavonóides (B) Extrato obtido por Soxhlet (C) Extrato obtido após hidrólise. 1 – Kaempferol-3-O-rutinosídeo 2 - astragalin, 3 - kampferol, 4 - apigenina.

3.4.1.3 - Apigenina e Kaempferol livres

Tabela 8 - Valores de curva analítica, coeficiente de correlação, LOD e LOQ.

Compostos	Equação	R^2	LOD (μg mL^{-1})	LOQ (μg mL^{-1})
Kaempferol	y =0,7188x – 2,2083	0,9983	2,3	6,9
Apigenina	y = 1,7739x + 5,125	0,9994	0,71	2,1

Intervalo: kaempferol: 25 - 400 μg mL^{-1} ; apigenina: 12,5 – 200 μg mL^{-1}

Tabela 9 – Valores intra-dia (para 5 corridas consecutivas, padrão de 100 μg mL^{-1}).

Compostos	Média das áreas	CV (%)
Kaempferol	91,2	2,6
Apigenina	63,7	2,7

Tabela 10 – Quantificação de flavonóides livres presentes na folha de soja.

Compostos	Média (μg mL^{-1})	CV (%)
Kaempferol	9,5	0,26
Apigenina	6,1	0,60

n = 6

3.4.1.4 - Kaempferol e Apigenina Após Hidrólise

Tabela 11 – Quantificação de flavonóides presentes na folha de soja.

Compostos	Média (μg mL^{-1})	CV (%)
Kaempferol	171	2,5
Apigenina	15,7	3,3

Tabela 12 – Valores de recuperação.

Compostos	Conc. Inicial (μg mL^{-1})	Adicionado (μg mL^{-1})	Encontrado (μg mL^{-1})	Recuperação (%)
Kaempferol	163	10	171	98,8
Apigenina	13,5	10	23,5	100

3.4.2 - Nitrito e Nitrato

A análise por CE foi realizada usando β-alanina como tampão, ajustando o pH com ácido sulfúrico. O sulfato possui mobilidade semelhante ao nitrato, favorecendo a simetria dos picos do nitrato e nitrito.

Os eletroferogramas dos padrões de nitrito e nitrato e do extrato da folha da soja estão apresentados na Figura 27. Verificou-se que o extrato da folha de soja apresentou somente a presença de nitrato.

Análise quantitativa do nitrato foi conduzida usando 5 diferentes concentrações dos padrões, cada ponto correspondendo à análise em triplicata de cada padrão.

A relação linear foi obtida pela variação da área em função da concentração, trabalhando nas faixas de concentrações de 7,8-250 $\mu g\ mL^{-1}$. Boa relação linear foi obtida para o nitrato (maior que 0,99). Os valores de limite de detecção e quantificação são apresentados na Tabela 13 e foram calculados para a concentração que fornece relação sinal/ruído igual a três e dez, respectivamente.

A repetibilidade foi determinada quanto ao desvio para 5 consecutivas injeções do nitrato. Os resultados estão apresentados na Tabela 14. A quantificação do nitrato foi realizada, sendo os resultados apresentados na Tabela 15.

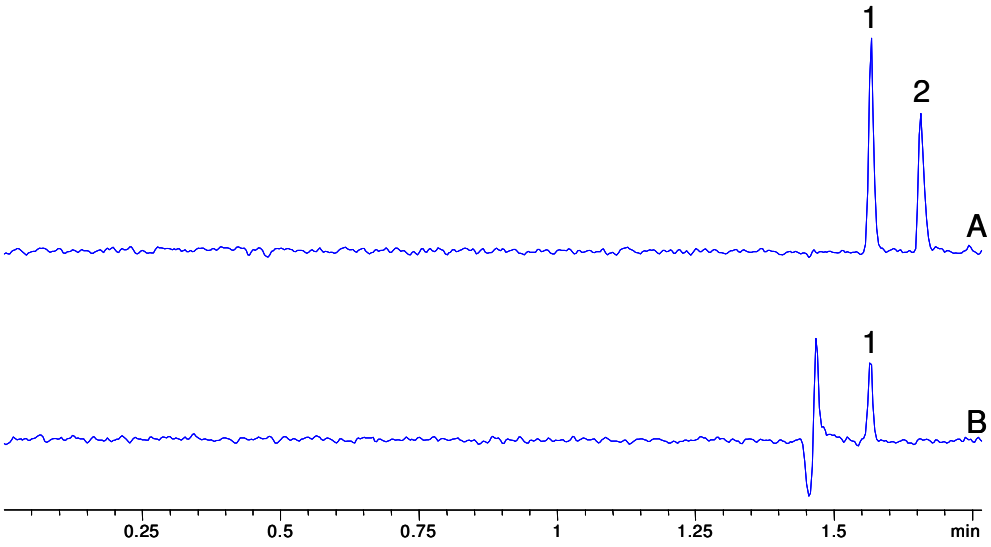

Figura 27 – Eletroferogramas da análise de nitrato do extrato da folha da soja. Condições de análise: eletrólito: 30 mmol L^{-1} β-alanina, 0,20 mmol L^{-1} CTAB, pH 4, tensão 20 kV, 20 ºC, 210 nm. Injeção a 40 mbar por 3 s. (A) Padrões de nitrato e nitrito (B) Extrato da folha de soja. 1 – Nitrato, 2 - Nitrito

Tabela 13 - Curva analítica, coeficiente de correlação, LOD e LOQ.

Composto	**Equação**	**R^2**	**LOD (µg mL^{-1})**	**LOQ (µg mL^{-1})**
Nitrato	y = 0,6854x + 0,245	0,9997	1,26	3,78

Intervalo de concentração de 7,8 – 250 µg mL^{-1}

Tabela 14 - Valores intra-dia (para 5 corridas consecutivas padrão 100 µg mL^{-1}).

Composto	**Média das áreas**	**CV (%)**
Nitrato	34,3	0,48

Tabela 15- Quantificação do nitrato.

Composto	**Média (µg mL^{-1})**	**CV (%)**
Nitrato	3,2	0,21

3.4.3 – CÁTIONS

A análise de cátions foi realizada pelo método de detecção indireta, utilizando como agente cromóforo imidazol. Hiba foi adicionado ao tampão pois é um agente complexante, aumentando a seletividade dos componentes e éter coroa é um agente complexante para separação de potássio e amônio; o pH foi ajustado em 4,5-5 com HCl.

Uma mistura de potássio, sódio, magnésio, cálcio e amônio foi preparada na concentração de 100 μg mL^{-1} a partir de solução estoque de 1000 μg mL^{-1} de cada padrão. Para análise por eletroforese capilar primeiramente foi avaliado o eletrólito constituído de 15 mmol L^{-1} de imidazol contendo 5 mmol L^{-1} de Hiba e 2 mmol L^{-1} éter coroa em pH 4,5. As análises iniciais foram realizadas em 29º C, 20 kV, capilar de 46 cm x 75 μm, tempo de injeção de 40 mbar/3s. Temperatura de análise entre 25 e 20 ºC foram avaliadas, como o resultado não foi satisfatório a concentração de imidazol foi variada em 5 e 10 mmol L^{-1}. A concentração de 10 mmol L^{-1} de imidazol, 5 mmol L^{-1} HIBA e 2 mmol L^{-1} de éter coroa em pH 4,6 apresentou melhor tempo de migração e melhor resolução entre os padrões, como pode se observar na Figura 28.

A partir da extração da folha da soja realizada em meio aquoso, verificou-se a presença dos seguintes cátions: potássio, cálcio sódio e magnésio.

Análise quantitativa dos cátions foi conduzida usando 5 diferentes concentrações dos padrões, cada ponto correspondendo à análise em triplicata de cada padrão. A relação linear foi obtida pela variação da área em função da concentração, trabalhando nas faixas de concentrações de 7,81 a 250 μg mL^{-1}. Boa relação linear foi obtida para os cátions (maior que 0,999). Os valores de limite de detecção e quantificação são apresentados na Tabela 16 e foram calculados para a concentração que fornece relação sinal/ruído igual a três e dez, respectivamente.

A repetibilidade foi determinada quanto ao desvio para 5 injeções consecutivas dos padrões de cátions. Os resultados estão apresentados na Tabela 17. Quantificação dos cátions na folha da soja foi realizada, sendo os resultados apresentados na Tabela 18.

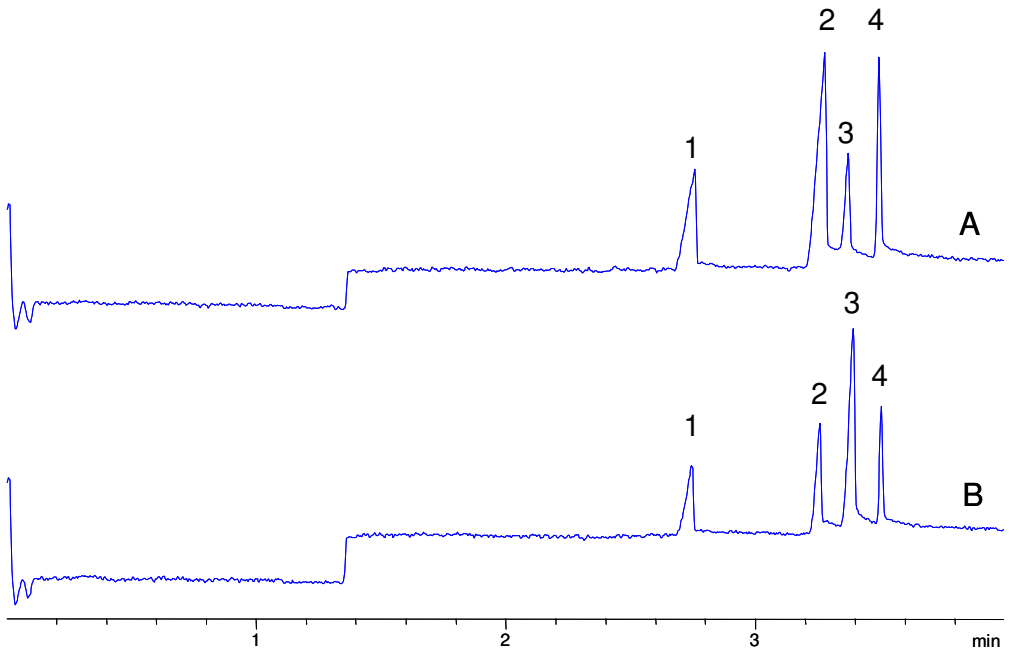

Figura 28 – Eletroferograma da análise de cátions. Condições de análise: eletrólito: 15 mmol L^{-1} imidazol, 5 mmol L^{-1} HIBA, 2 mmol L^{-1} éter coroa, pH 4,5, tensão 20 kV, 20 ºC, 337 nm. Injeção a 40 mbar por 3 s, 214 nm. (A) Padrões de cátions (B) Extrato aquoso da folha da soja. 1 - Potássio, 2 - Cálcio, 3 - Sódio, 4 - Magnésio.

Tabela 16 - Curva analítica, coeficiente de correlação, LOD e LOQ para análise dos cátions.

Compostos	**Equação**	**R^2**	**LOD (µg mL^{-1})**	**LOQ (µg mL^{-1})**
Potássio	y=0,5203x + 0,3053	0,9997	6,2	18,4
Cálcio	y=0,5813x - 0,9697	0,9993	8,8	26
Sódio	y=0,6349x + 6,7015	0,9993	10	31
Magnésio	y=0,4357x - 1,5230	0,9991	10	31

Intervalo de concentração de 7,8 – 250 µg mL^{-1}

Tabela 17 - Valores intra-dia (para 5 corridas consecutivas padrão 100 µg mL^{-1}).

Compostos	Média das áreas	CV (%)
Potásio	51,1	2,02
Cálcio	55,8	2,04
Magnésio	37,25	1,42
Sódio	75,08	3,05

Tabela 18 – Quantificação dos cátions da folha de soja.

Compostos	Média (µg mL^{-1})	CV (%)
Potássio	62,8	1,4
Cálcio	95,1	0,94
Magnésio	54,7	1,2
Sódio	13,1	0,82

3.4.4 - Açúcares

Freqüentemente os açúcares podem ser analisados diretamente (por exemplo, após hidrólise ácida) ou são facilmente extraídos com água. Etanol/água (80% v/v) é um bom extrator para monossacarídeos, no qual proteínas, polissacarídeos e muitos oligossacarídeos são insolúveis. Tais monossacarídeos nesta solução são estáveis.[26]

Foram encontrados na folha da soja os seguintes açúcares: frutose, glicose e sacarose, como apresentado na Figura 29; o eletroferograma do extrato obtido nesta figura refere-se ao extrato obtido em meio aquoso.

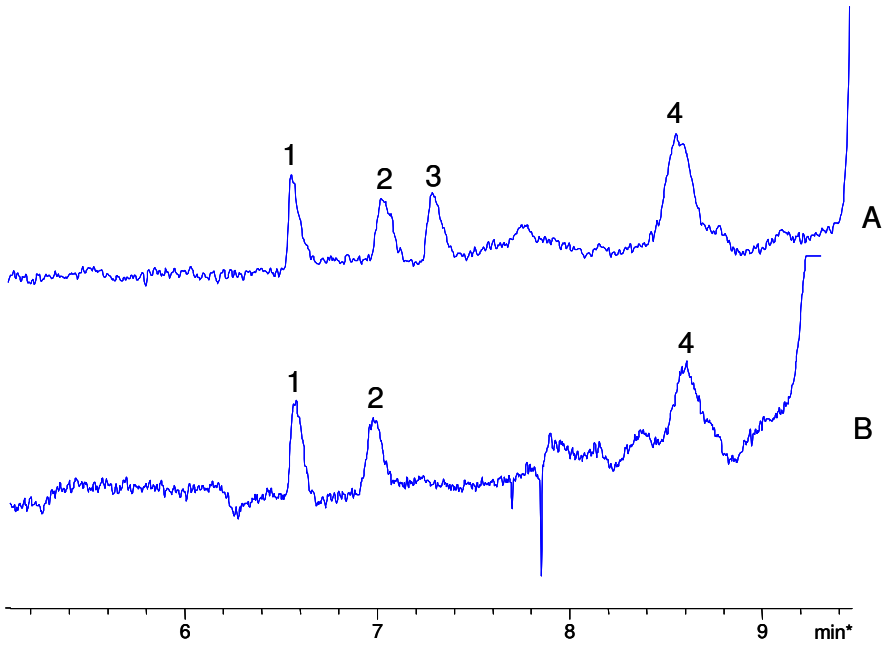

Figura 29 – Eletroferogramas da análise de açúcares da folha da soja. Condições de análise: eletrólito: 10 mmol L^{-1} 3,5 DNB, 0,5 mmol L^{-1} CTAB, pH 12, tensão -20 kV, 25 ºC, 254 nm. Injeção a 40 mbar por 3 s. (A) Padrões de açúcares (B) Extrato aquoso de folha de soja. 1 - frutose 2 - glicose 3 - galactose 4 – sacarose.

Análise quantitativa dos açúcares foi conduzida usando 5 diferentes concentrações dos padrões, cada ponto correspondendo à análise em triplicata de cada padrão. A relação linear foi obtida pela variação da área em função da concentração, trabalhando nas faixas de concentrações 12,5 a 100 µg mL^{-1}. Boa relação linear foi obtida para os açúcares (maior que 0,999). Os valores de limite de detecção e quantificação são apresentados na Tabela 19 e foram calculados para a concentração que fornece relação sinal/ruído igual a três e dez, respectivamente, cálculos obtidos a partir da reta.

A repetibilidade foi determinada quanto ao desvio para 5 injeções consecutivas dos açúcares. Os resultados estão apresentados na Tabela 20.

A quantificação dos açúcares presentes na folha da soja foi realizada, sendo os resultados apresentados na Tabela 21. Resultados obtidos pelos dois modos de extração citados no item Procedimento Experimental 3.3.4.3.

Dois métodos de extração foram avaliados e ambos apresentaram resultados similares, conforme Tabela 21.

Tabela 19 - Curva analítica, coeficiente de correlação, LOD e LOQ.

Compostos	Equação	R^2	LOD (μg mL^{-1})	LOQ (μg mL^{-1})
Frutose	y = 0,3586 x + 2,5	0,9996	7,3	22
Glicose	y = 0,4014 x + 1,5	0,9997	6,6	20
Sacarose	y = 0,7286 x + 5	0,9988	12	36

Intervalo de concentração de 12,5 - 100 μg mL^{-1}

Tabela 20 - Valores intra-dia (para 5 corridas consecutivas padrão 100 μg mL^{-1}).

Compostos	Média (μg mL^{-1})	CV (%)
Frutose	26,7	2,03
Glicose	31,4	2,12
Sacarose	100,3	1,95

Tabela 21 - Quantificação de açúcares presentes na folha de soja.

Compostos	Média (μg mL^{-1})*	CV (%)	Média (μg mL^{-1})**	CV (%)
Frutose	158	1,86	163	1,4
Glicose	128	1,21	128	1,4
Sacarose	160	0,6	159	2,1

* Extrato obtido em meio aquoso

** Extrato obtido em meio aquoso e etanólico

3.4.5 - Ácidos Orgânicos

Após extração da folha da soja em meio aquoso, os ácidos orgânicos encontrados foram: malêico, malônico, fórmico, cítrico, málico, lático, succínico e acético. A Figura 30 apresenta o eletroferograma dos padrões e do extrato das folhas de soja obtido por ultrassom.

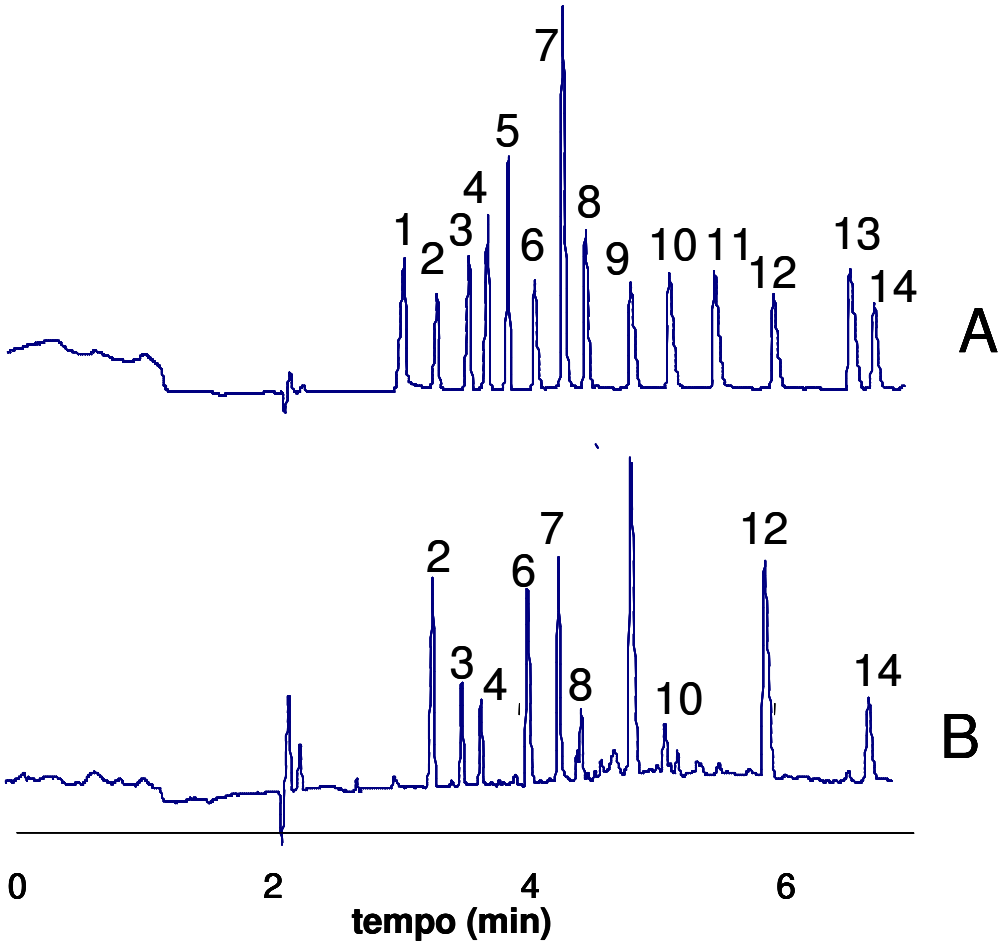

Figura 30 – Eletroferogramas da análise de ácido orgânico do extrato da folha da soja. Condições de análise: eletrólito: 10 mmol L^{-1} 3,5 DNB, 8,5 mmol L^{-1} TRIS e 0,1 mmol L^{-1} CTAB, pH 3,6, tensão -20 kV, 30 ºC, 254 nm, injeção a 35 mbar por 3 s. (A) Padrões de ácidos orgânicos (B) Extrato aquoso da folha de soja obtido por ultrassom. Ácidos: 1 – oxálico 2 – malêico 3 – malônico 4 – fosfórico 5 – tartárico 6 – fórmico 7 – cítrico 8 – málico 9 – glicólico 10 – lático 11 – aspártico 12 – succínico 13 – glutâmico 14 – acético.

A otimização do método de separação por eletroforese capilar é apresentada em artigo submetido pelo grupo e apresentado na Tabela 22.[33]

Análise quantitativa dos ácidos orgânicos foi conduzida usando 5 diferentes concentrações dos padrões, cada ponto correspondendo à análise em triplicata de cada padrão.

A relação linear foi obtida pela variação da área em função da concentração. Boa relação linear foi obtida para os ácidos orgânicos (maior que 0,99) sendo apresentados na Tabela 22.

A quantificação dos ácidos orgânicos na folha de soja foi realizada, sendo os resultados apresentados na Tabela 23.

Verificou-se que os dois modos de extração apresentaram praticamente a mesma concentração dos ácidos orgânicos.

Tabela 22 - Curva analítica, coeficiente de correlação.

Compostos	**Equação**	**r^2**	**LOD (μg mL^{-1})**	**LOQ (μg mL^{-1})**
Ácido malônico	y = 0,6 x - 0,16	0,9999	0,003	0,011
Ácido fosfórico	y = 0,7 x + 0,010	0,9997	0,003	0,009
Ácido fórmico	y = 0,4 x + 0,12	0,9998	0,003	0,010
Ácido cítrico	y = 1,8 x - 0,051	0,9999	0,002	0,008
Ácido málico	y = 0,7 x - 0,0086	0,9998	0,003	0,009
Ácido lático	y = 0,6 x + 0,071	0,9999	0,003	0,009
Ácido acético	y = 0,4 x - 0,043	0,9998	0,005	0,016

Tabela 23 – Quantificação dos ácidos orgânicos presentes na folha de soja.

Compostos	**Média (μg mL^{-1})***	**CV (%)**	**Média (μg mL^{-1}) ****	**CV (%)**
Ácido malônico	0,95	1,72	0,95	1,96
Ácido fosfórico	0,44	1,56	0,43	0,040
Ácido fórmico	2,0	2,35	2,05	2,30
Ácido cítrico	0,54	2,14	0,56	5,66
Ácido málico	0,54	0,33	0,54	1,53
Ácido lático	0,37	0,50	0,37	0,34
Ácido acético	1,30	0,50	1,30	0,21

* Extrato obtido sob agitação

** Extrato obtido por ultrassom

3.4.6 - Ácidos Graxos Livres

A análise dos ácidos graxos foi realizada pelo método direto por eletroforese capilar. A quantificação não foi possível devido a indisponibilidade de padrões. Uma comparação do extrato da folha de soja obtido por hexano com um óleo de soja comercial após saponificação foi realizada para determinação dos ácidos graxos. De acordo com a literatura[34] e com dados obtidos no nosso laboratório[28], o óleo de soja contém os seguintes ácidos graxos: C18:1, C18:2 e C18:3, em maiores concentrações. As Figuras 31 e 32 apresentam eletroferogramas da folha da soja e do óleo de soja, ambos obtidos após saponificação. Verifica-se por comparação do tempo de migração, que a folha de soja possui maior concentração de C18:3 comparada ao óleo de soja.

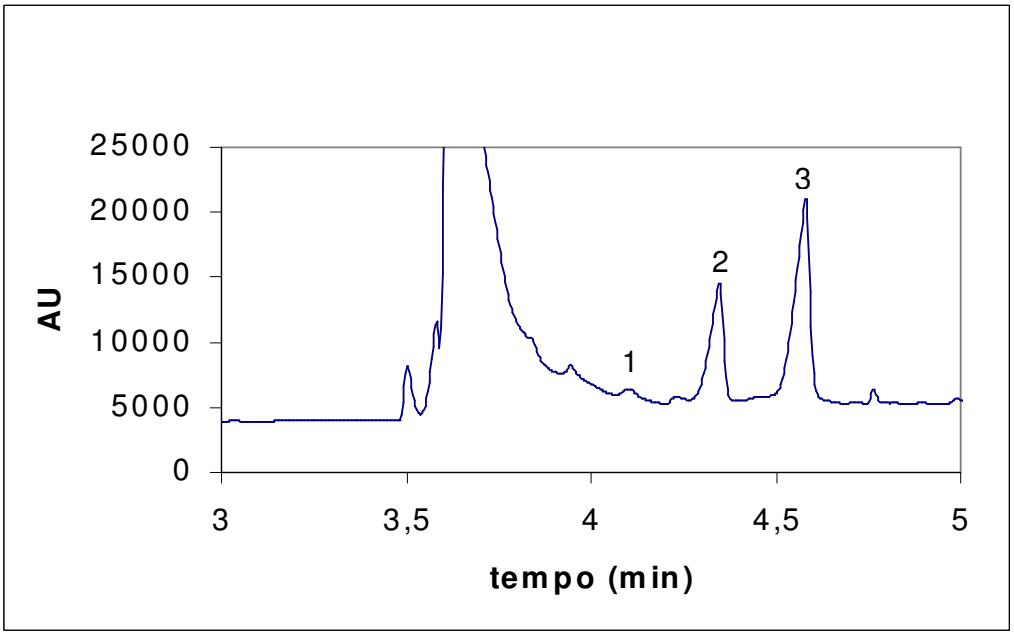

Figura 31 – Eletroferograma dos ácidos graxos presentes na folha de soja após saponificação. Condições de análise: eletrólito: 10 mmol L^{-1} TBS, 10 mmol L^{-1} Brij-35 e 45% ACN pH 9,3, tensão 20 kV, 20 ºC, 200 nm, injeção a 35 mbar, por 3 s. 1 – C18:1 ; 2 – C18:2 ; 3 – C18:3

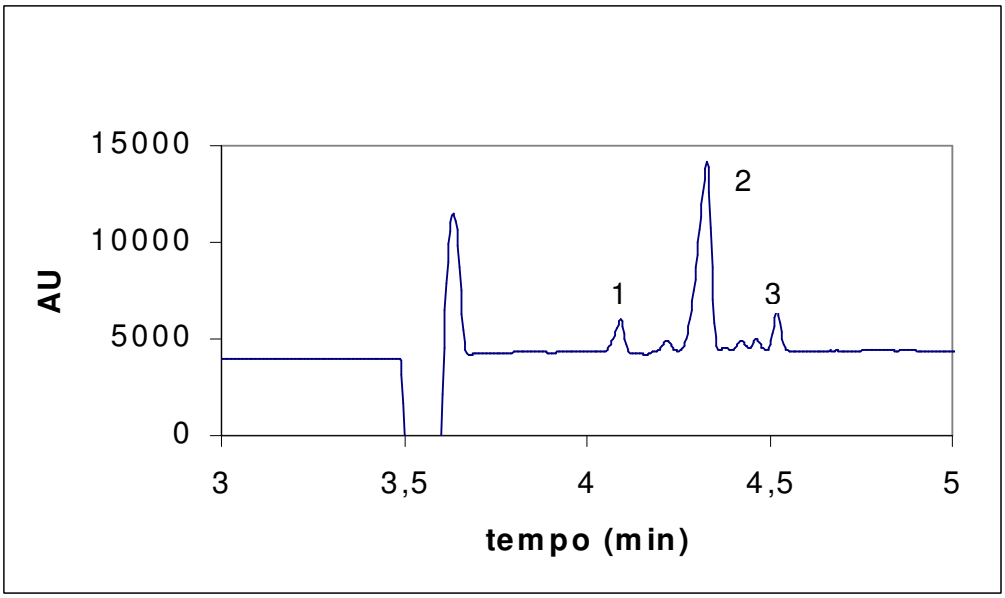

Figura 32 – Eletroferograma dos ácidos graxos do óleo de soja após saponificação. Condições de análise: eletrólito: 10 mmol L^{-1} TBS, 10 mmol L^{-1} Brij-35 e 45% ACN pH 9,3, tensão 20 kV, 20 ºC, 200 nm, injeção a 35 mbar por 3 s. 1 – C18:1 ; 2 – C18:2 ; 3 – C18:3

3.5 - CONCLUSÕES

A folha de soja apresentou flavonóides como kaempferol-3-O-rutinosídeo, apigenina e kaempferol livres em seu extrato, nitrato, alguns açúcares, magnésio, potássio, cálcio e sódio, alem de vários ácidos orgânicos e uma maior quantidade do ácido graxo C18:3 comparado ao próprio óleo de soja.

Desta forma, foi possível verificar a presença de importantes metabólitos e nutrientes, mostrando a possibilidade de aproveitamento da folha de soja em finalidades farmacológicas e alimentares.

As extrações realizadas são simples, de fácil e rápido preparo, razoavelmente econômicas e quantitativas, sendo a eletroforese capilar versátil para amostras complexas, pois em uma mesma coluna conseguiu-se separar diferentes metabólitos e nutrientes.

3.6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 - MOURE, A.; CRUZ, J.M.; FRANCO, D., *et al.*, *Food Chem.*, v.72, p.145-171, 2001.

2 - HO H.M.; CHEN, R.Y.; LEUNG, L.K.; CHAN, F.L.; HUANG, Y.; CHEN, Z-Y., *Biomed. Pharmacother.,* v.56, p.289-295, 2002.

3 - ROMANI, A.; VIGNOLINI, P.; GALARDI, C.; AROLDI, C.; VAZZANA, C.; HEIMLER, D., *J. Agric. Food Chem.,* v.51, p.5301-5306, 2003.

4 - ROBARDS, K., *J. Chromatogr. A*, 975 (2002) 71-93.

5 - MATTILA, P.; ASTOLA, J.; KUMPULAINEN, *J. Agric. Food Chem.*, v.48, p.5834-5841, 2000.

6 - NACZK, M.; SHAHIDI, F., *J. Chromatogr. A*, v.1054, p.95-111, 2004.

7 - KEINANEN, M., *J. Agric. Food. Chem.*, v.41, p.1986-1990, 1993.

8 - HERTOG, M.G.L.; HOLLMAN, P.C.H.; VENEMA, D.P., *J. Agric. Food Chem.*, v.40, p.1591-1598, 1992.

9 - SKERGET, M.; KOTNIK, P.; HADOLIN, M.; HRAS, A.R.; SIMONIC, M.; KNEZ, Z., *Food Chem.*, v.89, p.191-198, 2005.

10 - JUSTESEN, U.; KNUTHSEN, P., *Food Chem.,* v.73, p.245-250, 2001.

11 - PIETTA, P.G.; MAURI, P.L.; ZINI, L.; GARDANA, C., *J. Chromatogr.,* v.680, p.175, 1994.

12 - SIMÓN, B.F.; ESTRELLA, I.; HERNÁNDEZ, T., *Chromatographia,* v.41, n.7/8, p.389-392, 1995.

13 - MOLNÁR-PERL, I.; FUZFAI, Z., *J. Chromatogr. A,* v.1073, p.201-227, 2005.

14 - WANG, M.; QU, F.; SHAN, X-Q.; LIN, J.M., *J. Chromatogr. A*, v.989, p.285-292, 2003.

15 - RIBEIRO, E., *Plantas Medicinais e Complementos Bioterápicos*, Publicações Europa-América, 1992.

16 - GALLI, V.; BARBAS C., *J. Chromatogr. A,* v.1032, p.299-304, 2004.

17 - SOGA, T.; ROSS, G.A., *J. Chromatogr. A*, v.837, p.231-239, 1999.

18 - CATALDI, T.R.I.; MARGIOTTA, G.; DEL FIORE, A.; BUFO, S.A., *Phytochem. Anal.*, v.14, p.176-183, 2003.

19 - FILGUEIRAS, A.V.; CAPELO, J.L.; LAVILLA, I.; BENDICHO, C.; *Talanta,* v.53, p.433-441, 2000.

20 - WARREN, C.R.; ADAMS, M.A., *Phytochem. Anal.,* v.15, p.407-413, 2004.

21 - CAMARGOS, L.S., Análise das alterações no metabolismo de nitrogênio em Canavalia ensiformes (L.) em resposta a variações na concentração de nitrato fornecida, Piracicaba, 2002, Dissertação de mestrado – ESALQ – Universidade de São Paulo.

22 - HUBER,S.C.; BACHMANN, M.; HUBER, J.L., *Trends Plant Sci.*, v.1, n.12, p.432-438, 1996.

23 - MANTOVANI, J.R.; CRUZ, M.C.P.; FERREIRA, M.E.; BARBOSA, J.C., *Pesq. Agropec. Bras.*, v.40, n.1, p.53-59, 2005.

24 - LEE, Y.-H.; LIN T.-I., *J. Chromatogr. B*, v.681, p.87-97, 1996.

25 - KEREPESI, I., *J. Agric. Food Chem.*, v.44, p.3235-3239, 1996.

26 - CHAPLIN, M.F.; KENNEDY, J.F., *Carbohydrate Analysis, A Practical Approach*, 2.ed., New York, Oxford University Press, 1994.

27 - SOGA, T.; SERWE, M., *Food Chem.*, v.69, p.339-344, 2000.

28 - OLIVEIRA, M.A.L., Análise de Ácidos Graxos em Óleos e Gorduras por Eletroforese Capilar, São Paulo, 2003, Tese de doutorado, Instituto de Química – Universidade de São Paulo.

29 - SANGWAN, N.K.; GUPTA, K.; DHINDSA, K.S., *J. Agric. Food Chem.*, v.34, p.415-417, 1986.

30 - COSSIGNANI, L.; DAMIANI, P.; SIMONETTI, M.S.; MANES, J., *J. Chromatogr. A*, v.1052, p.167-170, 2004.

31 - COLLET, J.; GAREIL, P., *J. Chromatogr. A,* v.792, p.154-177, 1997.

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

33 - MICKE, G.A.; COSTA, A.C.O., CARPENTIERI, V.M., SORIO, C.S.N.M.,TAVARES, M.F.M.*, J. Chromatogr. A*, 2006 (no prelo).