

ISSN 2175-8395

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Instrumentação
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

**ANAIS DO VII WORKSHOP DA REDE DE
NANOTECNOLOGIA APLICADA AO AGRONEGÓCIO**

Maria Alice Martins
Odílio Benedito Garrido de Assis
Caue Ribeiro
Luiz Henrique Capparelli Mattoso

Editores

Embrapa Instrumentação
São Carlos, SP
2013

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Instrumentação

Rua XV de Novembro, 1452
Caixa Postal 741
CEP 13560-970 - São Carlos-SP
Fone: (16) 2107 2800
Fax: (16) 2107 2902
www.cnpdia.embrapa.br
E-mail: cnpdia.sac@embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: João de Mendonça Naime
Membros: Dra. Débora Marcondes Bastos Pereira Milori
Dr. Washington Luiz de Barros Melo
Sandra Protter Gouvea
Valéria de Fátima Cardoso
Membro Suplente: Dra. Lucimara Aparecida Forato

Revisor editorial: Valéria de Fátima Cardoso
Capa - Desenvolvimento: NCO; criação: Ângela Beatriz De Grandi
Imagem da capa: Imagem de MEV-FEG de Titanato de potássio – Henrique Aparecido de Jesus
Loures Mourão, Viviane Soares

1a edição

1a impressão (2013): tiragem 50

Todos os direitos reservados.
A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).
CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação.
Embrapa Instrumentação

Anais do VII Workshop da rede de nanotecnologia aplicada ao agronegócio –
2012 - São Carlos: Embrapa, 2012.

Irregular
ISSN 2175-8395

1. Nanotecnologia – Evento. I. Martins, Maria Alice. II. Assis, Odílio Benedito Garrido de.
III. Ribeiro, Caue. IV. Mattoso, Luiz Henrique Capparelli. V. Embrapa Instrumentação.

© Embrapa 2013

VALIDAÇÃO DE MÉTODO ELETROQUÍMICO COM USO DE ELETRODO GPU, PARA A DETERMINAÇÃO DOS FLAVONOIDES DAIDZEÍNA E GENISTEÍNA

Marta Érica Saidel^{1*}; Aline Carlos de Oliveira²; Carlos Manoel Pedro Vaz³; Wilson Tadeu Lopes da Silva³

¹ Biomédica, estagiária da Embrapa Instrumentação, São Carlos –SP;

² Pesquisadora, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia – MG;

³ Pesquisador, Embrapa Instrumentação, São Carlos – SP

*mesaidel@hotmail.com

Projeto Componente: PC2 Plano de Ação: PA2

Resumo

Os flavonoides foram identificados como os maiores responsáveis pelo sistema de defesa a ataques de insetos apresentados por algumas plantas ou suas variedades. A soja apresenta alto teor de flavonoides com importantes funções defensivas contra microrganismos e pestes. A avaliação do desempenho dos flavonoides e de seus extratos se deve ao uso de eletrodos compósito a base de grafite/poliuretana (GPU) em comparação com a determinação de quantificação aliada à cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Assim, esse projeto poderá auxiliar para o melhoramento genético e seleção de variedades mais resistentes a insetos.

Palavras-chave: flavonoides de soja, extração, HPLC, Eletrodo compósito de grafite/poliuretana.

Introdução

Os flavonoides (que são metabólicos secundários) foram identificados como os maiores responsáveis pelo sistema de defesa a ataque de insetos apresentados por algumas plantas. A soja, no geral, apresenta alto teor de flavonoides com importantes funções defensivas contra microrganismos e pestes. Dentre estes flavonoides, podemos destacar a genisteína e a daidzeína, que são responsáveis pela defesa direta e indireta da planta contra insetos herbívoros e patógenos. Abaixo, seguem as fórmulas estruturais dos flavonoides estudados.

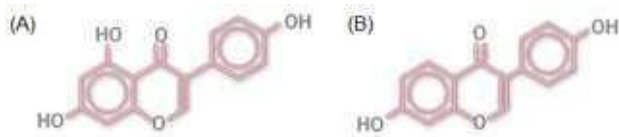


Fig 1: Representação das fórmulas estruturais dos flavonoides genisteína (A) e daidzeína (B).

A cromatografia é um método físico-químico utilizado para a separação de compostos de uma mistura com diferentes interações, apresentando

duas fases: um móvel e uma estacionária. É considerado um método moderno de análise de compostos, tendo como destaque por efetuar a separação da amostra com posterior identificação

e quantificação. A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLA

E) é uma importante técnica de separação, podendo-se detectar a maioria dos compostos e analisar traços de amostras complexas, como sangue, urina, solo, alimento, petróleo (VALENTE *et al.*, 1983). O primeiro artigo que se trata da determinação de flavonoides por CLAE foi apresentado em 1976 por Ficher e Wheaton (MERKEN & BEECHER, 2000).

As técnicas eletroanalíticas apresentam vantagens na determinação de flavonoides de soja. Essas vantagens estão associadas à alta sensibilidade, rapidez nas determinações e em alguns casos não necessita de etapa de separação ou pré-tratamento.

Voltametria é uma técnica eletroquímica onde se estudam informações qualitativas e quantitativas com o uso de registros a partir de corrente - potencial. O desenvolvimento de eletrodo compósito a base de carbono, tem se mostrado uma alternativa promissora na busca de novos materiais eletródicos para a utilização da eletroanalítica (SANMANTIAS *et al.*, 1999; TRIJUEQUE *et al.*, 1997; GUO & GUADALUPE, 1998; ALBERTÚS *et al.*, 1997; TAKAMASA *et al.*, 1996). Dentre esses eletrodos, podemos destacar o eletrodo compósito à base de grafite e poliuretana (GPU). A resina poliuretana (PU) à

base de óleo vegetal apresenta um acentuado caráter hidrofóbico, melhorando as características em relação à percolação observada em outros materiais poliméricos.

Neste trabalho, teve-se como objetivo comparar a quantificação dos flavonóides por eletroanálise com método de referência –CLAE.

Materiais e métodos

Para a extração dos flavonoides de soja, foi utilizado o procedimento operacional da Embrapa Soja. Inicialmente preparou-se uma solução de etanol 70% (v/v) e água ultrapura, grau Milli-Q (solução de extração). Para cada litro de solução de álcool etílico 70%, adicionou-se 1 mL de ácido acético glacial. Os grãos de soja foram separados e desidratados à 50°C. Após a desidratação, os grãos foram moídos até obter uma farinha bem fina. A farinha foi desengordurada com hexano PA por 6 horas em agitação. O óleo foi descartado. Um grama de farinha desengordurada foi transferida para um tubo falco e adicionou-se a solução de extração e agitou-se com o auxílio de um Vortex. Os extratos foram ultrasonificados e em seguida centrifugados a 14.000 rpm com a temperatura de 5°C. Após a centrifugação, a solução foi filtrada. A liofilização foi realizada com o auxílio de nitrogênio líquido para o congelamento do extrato. A cada 1 mg do extrato, diluiu-se em 5 mL de etanol PA. Foram armazenados em frasco âmbar e ao abrigo de luz.

Para a confecção do eletrodo composto de grafite (GPU), seguiu-se a metodologia de Mendes *et al.* (2003) com as proporções de 60% de grafite Aldrich (m/m) e 40% de poliuretana (m/m), formando-se tarugos de 3 mm de diâmetros, dos quais foram cortados em pastilhas de 1 cm cada comprimento. As pastilhas foram conectadas em fios de cobre através de resina epóxi. Abaixo segue uma ilustração de um eletrodo. Figura 2.

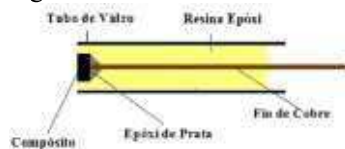


Fig 2: Representação esquemática de um eletrodo GPU.

A metodologia analítica estudada está baseada na voltametria de pulso diferencial (VPD). Os resultados propostos foram obtidos através da otimização dos parâmetros experimentais, como eletrólito suporte, intervalo de potencial, velocidade de varredura, altura de pulso e pH. Dentre os parâmetros estudados, o

tampão utilizado para a análise eletroquímica foi o BR (Britton - Robinson) pH 3 (OLIVEIRA *et al.*, 2009). As medidas voltamétricas foram realizadas em uma cela de 3 eletrodos. O eletrodo auxiliar era um fio de platina, o eletrodo de referência foi o calomelano saturado (ECS) e o eletrodo de trabalho foi o GPU. As medidas foram realizadas com o uso de um potenciostato AUTOLAB-PGSTAT 30.

A preparação dos padrões foi realizada da seguinte forma:

- Genisteína: pesou-se 0,00270 g do padrão (LC Laboratories) e diluiu-se em 10 mL em etanol PA para preparar uma solução de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.
 - Daidzeína: pesou-se 0,00420 g de daidzeína (LC Laboratories) e diluiu-se em 10 mL em etanol PA para preparar uma solução de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.
- As soluções foram armazenadas em frasco âmbar, sob refrigeração e ao abrigo de luz.

Resultados e discussão

Foi realizado um estudo para melhor identificação dos flavonoides em eletroanalítica. Os parâmetros estudados variaram de 10 a 100 mV para amplitude e 5 a 50 mV s^{-1} para velocidade de varredura. As medidas voltamétricas foram realizadas com eletrodo GPU em solução de daidzeína e genisteína, ambas nas concentrações de concentração de $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão BR pH 2 e voltametria de pulso diferencial. Os voltamogramas obtidos são apresentados na figura 3, a partir do qual é possível observar um pico anódico de 0,69 V para a genisteína e 0,71 V para a daidzeína.

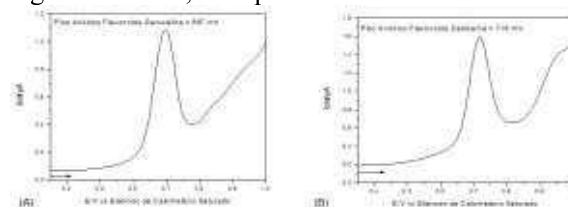


Fig 3: Pico anódico referente aos flavonoides daidzeína e genisteína.

Após as condições otimizadas, fez-se a curva analítica da genisteína, com limite de detecção de $1,19 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ($32,15 \mu\text{g L}^{-1}$) e limite de quantificação de $4,04 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ($109,1 \mu\text{g L}^{-1}$). Para a daidzeína obtivemos limite de detecção de $7,51 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ($191 \mu\text{g L}^{-1}$) e um limite de quantificação de $2,89 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ($734 \mu\text{g L}^{-1}$) representados na figura 4.

Após as otimizações dos padrões em eletroquímica, foram realizadas injeções dos flavonoides do HPLC para sua identificação. Após sua identificação, foi realizada a curva

analítica, variando sua concentração de $1,56 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ a $1,00 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, presentes na figura 5.

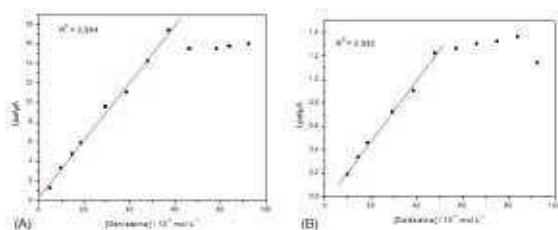


Fig 4: Curvas analíticas Daidzeína (direita) e da Genisteína (esquerda), obtidas por VPD.

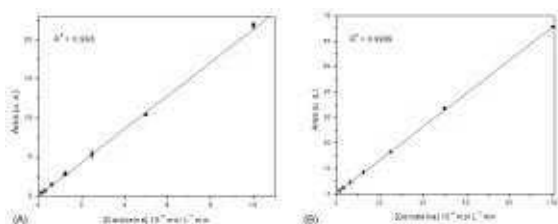


Fig 5: Curvas analíticas da Daidzeína (direita) e da Genisteína (esquerda) obtidas por CLAE

Com base nos resultados, foram adicionados padrões no extrato. E a partir das curvas pode-se fazer uma quantificação.

Fez-se a quantificação global dos flavonoides presente no extrato liofilizado. Como padrão, foi utilizada a genisteína por ser o flavonoide encontrado em maior quantidade conforme os resultados em CLAE. As concentrações de genisteína variaram de $6,85 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ a $2,68 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹.

A tab 1 mostra os valores referentes à concentração de flavonoide encontrado pelos dois métodos de adição de padrão na solução de análise (10 mL de Tampão BR pH 2 + 1,6 mL de extrato liofilizado).

Tab 1: Comparação dos métodos de quantificação global dos flavonoides por VPD e CLAE.

Metodologia	[Flavonoide] _{lio} mol L ⁻¹
CLAE	$2,07 \times 10^{-5}$
VPD	$1,17 \times 10^{-4}$

Conclusões

Observa-se uma discrepância nos valores, sendo de quase 5,65 vezes maior em VPD do que em CLAE. Isso pode ocorrer em virtude de diversos fatores e dentre eles, podemos destacar a hipótese da oxidação de outros flavonoides que não foram estudados. Dentre eles podemos destacar a rutina, glicitina e a gliciteína).

Agradecimentos

Os autores agradecem a FAPESP, CNPq, Finep, Capes e Projeto MP1 Rede Agronano – Embrapa.

Referências

ALBERTÚS, F.; A. LLERENA, J.; ALPÍZAR, V.; CERDÁ, M.; LUQUE, A.; RÍOS, & VALCÁRCEL, M. “A PVC-graphite composite electrode for electroanalytical use. Preparation and some applications”. *Anal. Chim. Acta*, 355: 23, 1997.

GUO, Y.; GUADALUPE, A. R. “Screen-printable surfactant-induced sol-gel graphite composites for electrochemical sensors”. *Sensors and Actuators*, 46: 213, 1998.

MERKEN, H. M., BEECHER, G. R.; “Measuring of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000.

OLIVEIRA, A. C.; VAZ, C. M. P.; SILVA, J. G.; CASTRO, C. S. P; MASCARO, L. H. “Avaliação das potencialidades analíticas de eletrodo compósito GPU e eletrodo compósito CNTs-PU na determinação de genisteína.” In: V Workshop de Rede de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio, 2009, Embrapa Instrumentação Agropecuária, São Carlos-SP.

SANMANTÍAS, A.; BENITO, D.; BASTOS, J.A.; NAVARRO-LABOULAIS, J.; GARCÍA-JAREÑO, J.J. & VICENTE, F. “Electrochemical behaviour of Nafion®+cupromeronic phthalocyanines films”. *Intern. J. Inorg. Mat.*, 1: 361, 1999.

TAKAMASA, K.; SUDA, Y.; NEGISHI, A. & HANEKO, H. “Carbon electrodes using graphite/carbon composites”. *Carbon*, 34: 433, 1996.