
AVALIAÇÃO DE PROCESSOS DE EXTRAÇÃO PARA RECUPERAÇÃO E ISOLAMENTO DE FLAVONÓIDES EM GRÃOS E FOLHAS DE SOJA POR VOLTAMETRIA UTILIZANDO ELETRODO DE CARBONO VÍTREO

Magarelli, G.¹, Cavalcante, R.S.², Silva, J.G.³, Castro, C.S.P.¹

¹Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - LSA, CP 2372, CEP: 70.770-917, Brasília – DF, clarissa.castro@embrapa.br, ²Universidade de Brasília, Campus de Planaltina, CEP 73.345-010, Planaltina –DF, ³Universidade Católica de Brasília, CEP 71.966-700 Brasília-DF

Projeto Componente: PC2 **Plano de Ação:** PA3

Resumo

Flavonóides foram recuperados e isolados seletivamente de amostras de grãos e folhas de soja por processos de extração sólido-líquido e em fase sólida, monitorados pela voltametria de pulso diferencial e eletrodo de carbono vítreo. Na extração sólido-líquido, a combinação do etanol 70% com o ultrassom por 20 minutos foi a mais adequada para o preparo dos extratos de grãos e folhas de soja. Na extração em fase sólida, o cartucho Strata-X e a mistura metanol/acetonitrila (1:1) foram os mais eficazes para remover os interferentes e recuperar e isolar as isoflavonas e a rutina dos extratos de soja.

Palavras-chave: Processos De Extração, Flavonóides, Soja, Voltametria, Eletrodo De Carbono Vítreo

Publicações relacionadas:

CAVALCANTE, R. S.; MAGARELLI, G.; SILVA, J.G.; DE CASTRO, C. S. P. Otimização do Preparo de Amostras de Soja Utilizando a Extração em Fase Sólida para Análise de Isoflavonas Totais por Voltametria de Pulso Diferencial. Anais do XVII ENCONTRO DO TALENTO ESTUDANTIL. Brasília - DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2012. p. 134.

Introdução

Os flavonóides são metabólitos secundários, encontrados na soja, que constituem a classe dos polifenóis. Relatos da literatura descrevem que as isoflavonas e a rutina, além da função benéfica à saúde humana por meio de ações antioxidantes e anticancerígenas, conferem às plantas de soja importantes funções defensivas contra micro-organismos e pragas (PIUBELLI et al., 2005).

Desta forma, a determinação destes compostos na soja, poderá auxiliar no manejo integrado de pragas, além de fornecer informações valiosas aos pesquisadores, para a seleção de variedades mais resistentes ao ataque de insetos herbívoros. As técnicas voltamétricas nas suas várias formas (pulso diferencial, onda quadrada, redissolução anódica e catódica e adsorbtiva) são ferramentas analíticas bastante vantajosas para a determinação dos flavonóides da soja, devido à capacidade eletroativa dos flavonóides e alta sensibilidade, baixo custo e tempo reduzido das análises (SILVA et al., 2012). Uma etapa chave que precede a determinação dos flavonóides em soja é o preparo das amostras de folhas e grãos, pois a

presença de interferentes pode afetar a seletividade e a sensibilidade das análises. A extração é o principal passo do preparo das amostras de soja, pois envolve a recuperação e o isolamento dos flavonóides, sendo influenciada principalmente pela natureza química da amostra e pelo método de extração. A extração em fase sólida, SPE – do inglês “solid-phase extraction”, é uma técnica de extração eficiente e já bastante utilizada para extração de isoflavonas em amostras de soja, em geral quando se utiliza métodos cromatográficos de análise. A técnica de SPE geralmente é usada tanto no “clean up” dos extratos como também na extração e isolamento das isoflavonas em amostras líquidas ou extraídas em meio líquido (ROSTAGNO et al., 2005). Deste modo, o trabalho teve como objetivo avaliar os processos de extração sólido-líquido e em fase sólida para recuperação e isolamento de flavonóides em grãos e folhas de soja, utilizando a voltametria de pulso diferencial e eletrodo de carbono vítreo no monitoramento dos sinais.

Materiais e métodos

No estudo do processo de extração sólido-líquido, os testes de extração foram realizados com comprimidos fitoterápicos a base de soja macerados, que continham em sua composição as isoflavonas. Neste estudo, avaliou-se a maior concentração de isoflavonas (em mg) extraídas em 0,1 g de amostra variando-se o tipo de solvente de extração (4 mL de: metanol 70%, acetonitrila 70%, acetona 70% e etanol 70%) e o procedimento de extração (1 hora de agitação mecânica em mesa agitadora e 20 minutos em ultrassom). Posteriormente, efetuou-se a centrifugação dos extratos (10 min à 13.000 rpm) e sua diluição para 10 mL com água ultra-pura.

No estudo do processo de extração em fase sólida foi realizada a extração sólido-líquido (4 mL de etanol 70%) de 0,1 g de grãos de soja desidratados e macerados (cultivar BRS 294 RR Embrapa) e de 0,1 g de folhas desidratadas e maceradas (cultivar FLORA Embrapa), com posterior agitação mecânica (1h) e centrifugação (10 min. à 13.000 rpm). Para testar o melhor desempenho na recuperação e isolamento dos flavonóides nas amostras de grãos e folhas de soja (remoção dos interferentes), aplicou-se o extrato etanólico em três cartuchos (dois a base de octadecilsilano (C18, 500 mg, Applied Separations e Strata-X C18-E, 1g, Phenomenex) e um polimérico a base de divinilbenzeno modificado (Strata-X, 200 mg, Phenomenex)). Os testes compreenderam quatro etapas: condicionamento dos cartuchos com 3 mL de água e 3 mL de metanol; aplicação de 2 mL do extrato; eluição dos interferentes com 3 mL de metanol 10% e eluição dos flavonóides com 3 mL de metanol 80% (cartuchos C18 e C18 E) e 3 mL da mistura metanol e acetonitrila (1:1) (cartucho Strata-X). O melhor cartucho para a SPE foi selecionado quando os voltamogramas apresentaram picos de flavonóides livres de interferentes e quantificáveis. As medidas voltamétricas foram realizadas em triplicata, utilizando-se o analisador voltamétrico Metrohm 797 e uma célula eletroquímica composta pelos eletrodos: carbono vítreo ($\Phi = 2,0$ mm) (trabalho), Ag/AgCl (KCl 3 mol L⁻¹) (referência) e platina (auxiliar). Soluções estoque dos padrões genisteína, daidzeína e rutina 1x10⁻³ mol L⁻¹ foram utilizadas para os estudos voltamétricos. Os parâmetros voltamétricos e condições de análise foram: tampão fosfato, pH 6,0 (eletrólito suporte), amplitude de pulso 50 mV e velocidade de varredura 50 mVs⁻¹. Todas as extrações foram

feitas em triplicata e as análises estatísticas realizadas foram o teste de Grubbs ($\alpha = 0,05$) e ANOVA ($\alpha = 0,05$).

Resultados e discussão

Nos resultados obtidos do estudo do processo de extração sólido-líquido, verificou-se que o etanol 70 % foi o melhor solvente para a extração das isoflavonas do fitoterápico a base de soja (Fig. 1 A). Ao se comparar a mesa agitadora (1 hora) com o ultrassom (20 minutos), verificou-se que ambos apresentaram a mesma eficiência de extração, no entanto, o uso do ultrassom é mais vantajoso por requerer menor tempo de extração (Fig. 1 B).

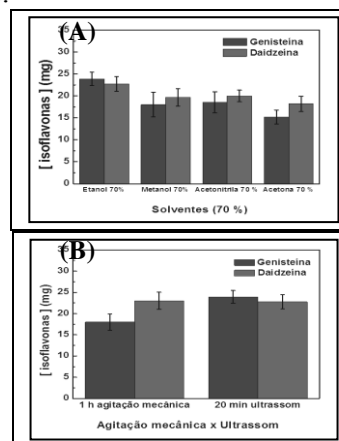


Fig. 1 (A) Eficiência de extração sólido-líquido das isoflavonas variando-se o tipo de solvente; (B) Eficiência de extração sólido-líquido das isoflavonas variando-se o procedimento de extração.

No estudo de extração em fase sólida para recuperação e isolamento dos flavonóides nos grãos de soja, verificou-se que todos os cartuchos testados foram eficientes na remoção dos interferentes. Entretanto, com o cartucho C18, 500 mg, houve perdas de aproximadamente 50% dos flavonóides na aplicação da amostra e na etapa de eluição do interferente, e com o cartucho Strata-X C18-E, 1g, a eluição dos flavonóides da fase sólida não ocorreu. Com o cartucho Strata-X 200 mg não foram observadas perdas dos flavonóides nas etapas de: aplicação da amostra (2 mL do extrato etanólico em tampão fosfato pH 6) (Fig. 2A) e eluição do interferente, em um potencial de oxidação de 0,663 V, utilizando-se 3 mL de metanol 10% (Fig. 2B). Os flavonóides retidos na fase sólida foram eluídos seletivamente, em um potencial de oxidação de 0,532 V, com 3 mL da mistura acetonitrila e metanol (1:1) (Fig. 2C). Este sinal de oxidação em 0,532 V é característico das flavonóides retidos na fase sólida foram eluídos seletivamente, em um potencial de oxidação de 0,532 V, com 3 mL da mistura acetonitrila e metanol (1:1) (Fig. 2C). Este sinal de oxidação em

0,532 V é característico das isoflavonas e foi confirmado por meio da adição de 20 μL de Genisteína $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Este resultado corrobora com dados da literatura que indicam que as isoflavonas são um dos principais constituintes dos grãos de soja (CARRÃO-PANIZZI; KITAMURA, 1995). Na segunda eluição das isoflavonas retidas na fase sólida com 3 mL da mistura acetonitrila e metanol (1:1), nenhum sinal quantificável das isoflavonas foi detectado, o que mostra que a primeira eluição foi completa (Fig. 2D).

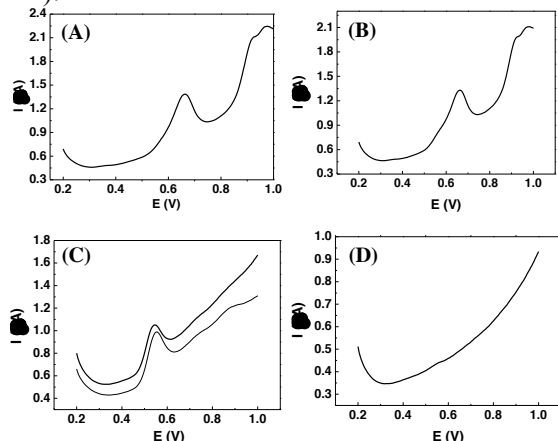


Fig. 2. Voltamogramas do extrato dos grãos de soja (A) etapa de aplicação da amostra no cartucho; (B) etapa de eluição do interferente do cartucho; (C) primeira etapa de eluição da amostra do cartucho; (D) segunda etapa de eluição da amostra do cartucho. Cartucho Strata-X, 200 mg, Phenomenex.

O cartucho Strata-X, 200 mg, Phenomenex, mostrou-se também eficiente na recuperação e isolamento dos flavonóides nas folhas de soja (Fig.3). Não foram observadas perdas dos flavonóides nas etapas de: aplicação da amostra (2 mL do extrato etanólico em tampão fosfato pH 6) (Fig. 3A) e eluição do interferente, em um potencial de oxidação de 0,196 V, utilizando-se 3 mL de metanol 10% (Fig. 3B). Os flavonóides retidos na fase sólida foram eluídos seletivamente, em um potencial de oxidação de 0,257 V, com 3 mL da mistura acetonitrila e metanol (1:1) (Fig. 3C). Este sinal de oxidação em 0,257 V é característico de rutina e foi confirmado por meio de 4 adições de 20 μL de Rutina $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Este resultado corrobora com dados da literatura que mostram que a rutina é um dos principais constituintes das folhas de soja (PIUBELLI *et al.*, 2005). Após uma segunda eluição da rutina retida na fase sólida com 3 mL da mistura acetonitrila e metanol (1:1), nenhum sinal quantificável de rutina foi detectado, o que mostra que a primeira eluição foi completa (Fig. 3D).

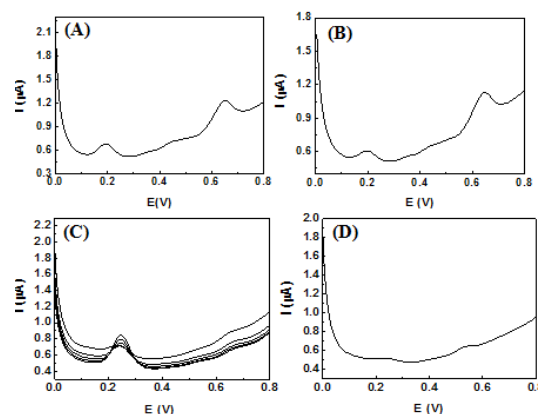


Fig 3. Voltamogramas do extrato das folhas de soja (A) etapa de aplicação da amostra no cartucho; (B) etapa de eluição do interferente do cartucho; (C) primeira etapa de eluição da amostra do cartucho; (D) segunda etapa de eluição da amostra do cartucho. Cartucho Strata-X, 200 mg, Phenomenex.

Conclusões

A recuperação e o isolamento dos flavonóides nos grãos e folhas de soja foram realizados com sucesso por meio de uma extração sólido-líquido, utilizando-se etanol 70 % e ultrassom por 20 minutos e uma extração em fase sólida, utilizando-se o cartucho Strata-X 200 mg e a mistura metanol e acetonitrila (1:1). Estes processos de extração serão utilizados para as determinações voltamétricas de rutina e isoflavonas totais em cultivares de soja da Embrapa.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq, a CAPES, a UnB, a UCB, a Rede Agronano – Embrapa e a Allcrom.

Referências

- CARRÃO-PANIZZI, M. C., KITAMURA, K. Isoflavone content in Brazilian soybean cultivars. *Breeding Science*, v. 45, p. 295-300, 1995.
- PIUBELLI G. C., HOFFMANN – CAMPO, C. B., MOSCARDI, F., MIYAKUBO, S. H., OLIVEIRA, M. C. N. Are chemical compounds important for soybean resistance to *Anticarsia gemmatilis*? *Journal of Chemical Ecology*, v. 31, n. 7, p. 1509-1525, 2005.
- ROSTAGNO, M.A.; PALMA, M.; BARROSO, C.G. Solid-phase extraction of soy isoflavones, *Journal of Chromatography A*, v.1076, p. 110-117, 2005.
- SILVA, J. G.; LOPES, M. R.; DE OLIVEIRA, A. C.; SOUZADE, J. R.; VAZ, C. M. P.; DE CASTRO, C. S. P. Cathodic adsorptive stripping voltammetric determination of rutin in soybean cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 25, p. 1-8, 2012.