



**Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Química**

Tese de doutorado

"OBTENÇÃO E APLICAÇÃO DE PADRÕES DE ISOFLAVONAS DE SOJA"

Autor: Marcelo Ribani

Orientadora: Profa. Dra. Carla B.G. Bottoli

Co-orientadora: Profa. Dra. Carol H. Collins

Setembro 2008

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO
INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP**

R352o Ribani, Marcelo.
Obtenção e aplicação de padrões de isoflavonas
de soja / Marcelo Ribani. -- Campinas, SP: [s.n], 2008.

Orientadora: Carla Beatriz Grespan Bottoli.

Co-orientadora: Carol Hollingworth Collins

Tese - Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Química.

1. Isoflavonas. 2. Soja. 3. Cromatografia.
4. Validação de método. I. Bottoli, Carla Beatriz
Grespan. II. Collins, Carol Hollingworth.
III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Química. IV. Título.

Título em inglês: Obtention and application of isoflavone standards from soybeans

Palavras-chaves em inglês: Isoflavones, Soybeans, Chromatography, Validation
of methods

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora: Carla Beatriz Grespan Bottoli (orientadora), Martha Bohrer
Adaime (DQ-UFSM), Luis Antonio d'Avila (EQ-UFRJ), Anne Hélène Fostier (IQ-
UNICAMP), Maria Izabel Maretti Silveira Bueno (IQ-UNICAMP)

Data de defesa: 19/09/2008

DEDICATÓRIA

A Deus por tudo

*A minha esposa, pelo carinho, amor e dedicação, sem você nada
seria possível.*

*A minhas filhas,
Esther, Giulia e Hanna,
que em cada sorriso e brincadeira tornaram possível encontrar a
fortaleza para prosseguir sempre.*

Aos meus pais pela força em estimular o trabalho.

*A todos que se preocupam em propagar a importância da
metrologia na química analítica moderna.*

AGRADECIMENTOS

Ao Tecpar pela liberação e ajuda para realização deste trabalho.

À minha orientadora Profa. Dra. Carla Beatriz Grespan Bottoli pelos ensinamentos, viagens, trabalhos, apoio e amizade. Posso dizer que foi muito divertido ser seu aluno. Muito obrigado por tudo inclusive a paciência quando chegava cansado de viagem.

À Profa. Dra. Carol H. Collins pela sincera amizade e seriedade no trabalho sempre provocando iniciativas, mas não perdendo o objetivo do trabalho. Posso dizer que foi e sempre será um privilégio ser seu aluno, meus profundos agradecimentos.

Ao amigo, Dr. César Ricardo, pela assistência em todos os aspectos do trabalho e estudo. Pelo incentivo e apoio, despertando sempre iniciativas além da pesquisa no Brasil e no exterior, muito obrigado.

Ao amigo, M.Sc. Endler Marcel, pela assistência nas análises de RMN e em todos os aspectos do trabalho e estudo. Pelo incentivo e apoio, muito obrigado.

Às minhas amigas no TECPAR: Tatiane e Melissa, pelo companheirismo e incentivo, mesmo estando muitas vezes longe do laboratório.

Ao meu amigo Renato Rau – diretor do TECPAR - que incentivou o início deste trabalho. Sem suas idéias eu jamais começaria este trabalho.

CURRICULUM VITAE

MARCELO RIBANI

Rua Atílio Bório, 119 ap. 104

e-mail: ribani@tecpar.br

CEP: 80050-250 Curitiba - PR.

Tel. (+5541) 3085-4202 (Residencial)

(+5541) 3352-2346 (Comercial)

1. FORMAÇÃO ACADÊMICA

- Mestrado em Química Analítica – UNICAMP, Campinas – 2004.
- Química Industrial - Escola Superior de Química Oswaldo Cruz, São Paulo, SP – 1992.
- Curso Técnico em Química Industrial - Colégio São Judas Tadeu, São Paulo, SP – 1988.

2. ARTIGOS PUBLICADOS

- Ribani, M.; Collins, C.H.; Bottoli, C.B.G.; Validation of chromatographic methods: Evaluation of detection and quantification limits in the determination of impurities in omeprazole, *J. Chromatogr. A*, 1156, 2007, 201.
- Ribani, M.; Bottoli, C.B.G.; Collins, C.H.; Jardim, I.C.S.F.; Melo, L.F.C.; Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos, *Quim. Nova*, 27, 2004, 771.

3. TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

- Ribani, M.; Ribani, R.H.; Valle, T.; Guilherme, M.A.W.; Collins, C.H.; Bottoli, C.B.G. “Extração, hidrólise e determinação de isoflavonas agliconas em grãos de soja por cromatografia líquida de alta eficiência” 31º SBQ – Reunião anual da Sociedade Brasileira de Química. Águas de Lindóia, SP, Brasil, 2008.
- Ribani, M.; Ribani, R.H.; Valle, T.; Guilherme, M.A.W.; Collins, C.H.; Bottoli, C.B.G. “Determination of isoflavones in non-transgenic and transgenic soybeans” 32º HPLC 2008 – International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Baltimore, MD, USA.
- Ribani, M.; Ribani, R.H.; Valle, T.; Guilherme, M.A.W.; Collins, C.H.; Bottoli, C.B.G. “Determinação de isoflavonas em grão de soja transgênica e não-transgênica” 14º ENQA – Encontro Nacional de Química Analítica. João Pessoa, PB, Brasil, 2007.
- Ribani, M.; Collins, C.H.; Bottoli, C.B.G.; Valle, T.; Guilherme, M.A.W. “Scale-up of analytical to preparative HPLC for purification of the isoflavones of soybeans” 31º HPLC 2007 – International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Ghent, Belgium.
- Ribani, M.; Collins, C.H.; Bottoli, C.B.G. “Transposição de escala analítica para preparativa em cromatografia líquida: purificação de isoflavonas de soja” SIMCRO II – Simpósio Brasileiro de Cromatografia – 2006, São Pedro, SP, Brasil.

- Ribani, M.; Collins, C.H., Bottoli, C.B.G. “Validation of chromatographic methods: Evaluation of detection and quantification limits in the determination of impurities in omeprazole” 30° HPLC 2006 – International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, San Francisco, USA.
- Ribani, R.H.; Ribani, M.; Amaya, D.R. “Separação cromatográfica de flavonóides agliconas em erva-mate” 13° ENQA – Encontro Nacional de Química Analítica. Niterói, RJ, Brasil, 2005.
- Ribani, M.; Bottoli, C.B.G.; Collins, C.H. “Caracterização da sericina através do perfil de aminoácidos utilizando derivatização pré-coluna com fenilisotiocianato” 13° ENQA – Encontro Nacional de Química Analítica. Niterói, RJ, Brasil, 2005.

4. PARTICIPAÇÃO EM CONGRESSOS

- 32° International Symposium on High Performance Liquid Phase and Related Techniques, International Convention Centre, Baltimore, MD, USA (2008).
- 31° SBQ 2008, Águas de Lindóia – SP (2008).
- V Congresso Latino Americano de Metrologia, Curitiba – PR (2007).
- 14° Encontro Nacional de Química Analítica, João Pessoa – PB (2007).
- 31° International Symposium on High Performance Liquid Phase and Related Techniques, International Convention Centre, Ghent Belgium (2007).
- II SIMCRO – Simpósio Brasileiro de Cromatografia, São Pedro, SP (2006).
- 29° SBQ 2006, Águas de Lindóia – SP (2008).
- 30° International Symposium on High Performance Liquid Phase and Related Techniques, San Francisco, USA (2006).
- 13° Encontro Nacional de Química Analítica, Niterói, RJ, (2005).
- VI Programa de Educação Tutorial de Farmácia da UFPR, Curitiba, PR, (2005).
- 10° COLACRO – Congresso Latino Americano de Cromatografia e Técnicas Afins, Campos do Jordão, SP (2004).
- 12° Encontro Nacional de Química Analítica, São Luis, MA, (2003).

RESUMO

Título: “OBTENÇÃO E APLICAÇÃO DE PADRÕES DE ISOFLAVONAS DE SOJA”.

O uso de padrões analíticos em análises cromatográficas é de fundamental importância para obter resultados analíticos confiáveis tanto em processos de validação de métodos quanto em análises rotineiras. Porém, o custo dos padrões de referência e sua disponibilidade para comercialização tornam o processo analítico muito caro e demorado. Neste trabalho foram obtidos padrões analíticos de isoflavonas de soja através da cromatografia líquida preparativa. Inicialmente foi desenvolvida uma método analítica por cromatografia líquida de alta eficiência, para separação e identificação de isoflavonas em extrato seco de soja. A seguir, foi realizada a transposição da escala analítica para a escala preparativa, iniciando pelo método da transposição direta. A caracterização e a pureza das isoflavonas obtidas foram verificadas a partir da pureza cromatográfica e pelos espectros na região do ultra violeta e visível, complementados pela espectrometria de massas e pela ressonância magnética nuclear. Os padrões obtidos por cromatografia preparativa apresentaram um teor de pureza de 93,1 % para daidzina, 99,8 % para daidzeína, 89,5 % para genisteína e 87,7 % para glicitina, permitindo, assim, o seu uso como padrões em análises rotineiras. Para demonstrar a aplicabilidade dos padrões obtidos, foi desenvolvido e validado um método para extração, hidrólise ácida e determinação das isoflavonas agliconas contidas em grãos de soja. Os resultados do conteúdo total de isoflavonas foram $283,5 \pm 10,7$ mg/100 g para soja não transgênica (BRS133) e $228,2 \pm 13,8$ mg/100 g para soja transgênica (BRS245RR), demonstrando diferenças significativas no conteúdo destas duas variedades de soja.

ABSTRACT

Title: “OBTENTION AND APPLICATION OF ISOFLAVONE STANDARDS FROM SOYBEANS”.

The use of analytical standards in chromatographic analyses is very important to get trustworthy analytical results for validation of methodologies and for routine analyses. However, the cost of the available reference standards is high, prejudicing the overall analytical process. In this work, a transposition from analytical to preparative scale was carried out to obtain analytical standards of isoflavones from soybeans. An analytical methodology using high performance liquid chromatography (HPLC) was developed for separation and identification of isoflavones in dry soy extract. The transposition of the analytical parameters to the preparative scale was done initially through direct transposition. The characterization and purity of the isoflavones was determined by HPLC with spectra from a DAD detector, complemented by mass (MS+/-) and nuclear magnetic resonance spectrometries. The resulting isoflavone purities, after preparative separation and lyophilization, were 93.1 % for daidzin, 99.8 % for daidzein, 89.5 % for genistein and 87.7 % for glycitin, allowing their use as standards in routine analyses. To demonstrate the applicability of the standards obtained, an approach for extraction, acid hydrolysis and determination of the total amounts of isoflavone aglicones in soybeans was developed and validated. The results indicated total isoflavone contents of 283.5 ± 10.7 mg/100 g for non-transgenic (BRS133) and 228.2 ± 13.8 mg/100 g for transgenic (BRS245RR) soybeans, demonstrating significant differences in the isoflavone content of these two different soybeans.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Combinação ensaiada para avaliação da robustez para cada isoflavona.	37
Tabela 2: Parâmetros das curvas analíticas para cada isoflavona.....	45
Tabela 3: Valores de LD e LQ do instrumento e do método, determinados pelo método baseado nos parâmetros da curva analítica.	46
Tabela 4: Parâmetros de precisão no nível de repetitividade para os teores de isoflavonas contidas nas amostras de extrato seco de soja.	46
Tabela 5: Valores da recuperação das isoflavonas, do CV e do teste t_s de Student.	48
Tabela 6: Resultados expressos em % das combinações ensaiadas na avaliação da robustez para cada isoflavona.....	49
Tabela 7: Comparação entre os efeitos avaliados no teste de Youden com a precisão do método.....	49
Tabela 8: Teores de isoflavonas presentes no extrato seco de soja padronizado.	50
Tabela 9: Resultados de NMR de ^1H para daidzina obtidos, comparados os dados de literatura.....	71
Tabela 10: Resultados obtidos de NMR de ^{13}C para daidzina, comparados os dados de literatura.	72
Tabela 11: Resultados NMR de ^1H para glicitina obtidos comparados os dados de literatura.....	75
Tabela 12: Resultados obtidos NMR de ^{13}C para glicitina comparados os dados de literatura.....	75
Tabela 13: Resultados obtidos de NMR de ^1H para daidzeína e comparados aos dados de literatura.	78
Tabela 14: Resultados obtidos de NMR de ^{13}C para daidzeína e comparados aos dados de literatura.	78

Tabela 15: Resultados de NMR de ^1H para genisteína obtidos comparados os dados de literatura.	80
Tabela 16: Resultados obtidos de NMR de ^{13}C para genisteína comparados os dados de literatura.	81
Tabela 17: Teores de pureza das isoflavonas obtidas após purificação por cromatografia preparativa.	82
Tabela 18: Rendimento do processo após separação, secagem e pesagem das isoflavonas.....	82
Tabela 19: Combinação ensaiada para avaliação da robustez para cada isoflavona.	90
Tabela 20: Parâmetros das curvas analíticas das isoflavonas preparadas com adição de padrão	94
Tabela 21: Parâmetros das curvas analíticas das isoflavonas preparadas com padrões dissolvidos em metanol:água.....	94
Tabela 22: Valores de LD e LQ do instrumento e do método, determinados pelo método baseado nos parâmetros da curva analítica com adição de matriz.....	98
Tabela 23: Valores da recuperação das isoflavonas agliconas em % e valores calculados para o test t_s de Student.....	99
Tabela 24: Resultados estatísticos dos teores de isoflavonas agliconas de amostras de soja para determinação da precisão no nível de repetitividade.....	99
Tabela 25: Resultado expressos em % de recuperação das combinações ensaiadas na avaliação da robustez para cada isoflavona.	100
Tabela 26: Comparação entre os efeitos avaliados no teste de Youden com a precisão do método expressos como coeficiente de variação (%) para cada isoflavona aglicona.....	101
Tabela 27: Resultados obtidos em mg/100g das amostras de soja transgênica e não-transgênica.....	103

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química das isoflavonas encontradas em grãos de soja, adaptado de Rostagno <i>et al.</i> ¹³	2
Figura 2: Gráfico da adsorção linear e não linear, expressando a relação entre concentração do soluto encontrado na fase móvel e na fase estacionária. Até uma determinada concentração esta relação é linear para todos os casos.	12
Figura 3: Cromatogramas típico de adsorção tipo (a) Langmuir e (b) anti-Langmuir, adaptado de Levin ⁷⁵ , mostrando os deslocamentos de tempo de retenção com o aumento da carga de amostra.....	13
Figura 4: Separação cromatográfica da mistura de padrões de isoflavonas com os espectros de cada isoflavona obtido com o detector de arranjo de diodos.	39
Figura 5: Cromatograma da amostra de extrato seco de soja com os espectros de cada isoflavona obtidos com o detector por arranjo de diodos e comparados com os espectros dos padrões.	41
Figura 6: Curva analítica da daidzina (a) no intervalo de concentração de 1-15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e gráfico de linearidade (b).....	43
Figura 7: Curva analítica da glicitina (a) no intervalo de concentração de 1-10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e gráfico de linearidade (b).....	43
Figura 8: Curva analítica da daidzeína (a) no intervalo de concentração de 1-15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e gráfico de linearidade (b).	44
Figura 9: Curva analítica da genisteína (a) no intervalo de concentração de 10-50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e gráfico de linearidade (b).	44
Figura 10: Cromatogramas das isoflavonas injetadas individualmente no sistema cromatográfico analítico nas concentrações de 50 a 500 μg . Condições cromatográficas similares à figura 5.	58
Figura 11: Cromatograma da separação das isoflavonas no sistema preparativo após a transposição de escala, com indicação das frações coletadas.....	60
Figura 12: Análise cromatográfica do composto obtido na primeira fração na separação preparativa (Figura 11), com os respectivos espectros de absorção	

(início, cauda e ápice do pico) no UV-Vis. Condições cromatográficas iguais às da figura 5.....	62
Figura 13: Análise cromatográfica do composto coletado na segunda fração na separação preparativa (Figura 11), com os respectivos espectros de absorção (início, cauda e ápice do pico) no UV-Vis. Condições cromatográficas iguais às da figura 5.....	63
Figura 14: Análise cromatográfica do composto coletado na terceira fração na separação preparativa (Figura 11), com os respectivos espectros de absorção (início, cauda e ápice do pico) no UV-Vis. Condições cromatográficas iguais às da figura 5.....	63
Figura 15: Análise cromatográfica do composto coletado na quarta fração na separação preparativa (Figura 11), com os respectivos espectros de absorção (início, cauda e ápice do pico) no UV-Vis. Condições cromatográficas iguais às da figura 5.....	64
Figura 16: Espectro de massas do padrão da daidzeína, por infusão direta, modo negativo.	65
Figura 17: Espectro de massas da daidzina, obtida após separação por cromatografia preparativa por infusão direta, modo positivo.....	65
Figura 18: Espectro de massas do padrão de glicitina, por infusão direta, modo positivo.	66
Figura 19: Espectro de massas da glicitina obtida após separação por cromatografia preparativa por infusão direta, modo positivo.....	66
Figura 20: Espectro de massas da padrão da daidzeína, por infusão direta, modo negativo.	67
Figura 21: Espectro de massas da daidzeína obtida após separação por cromatografia preparativa por infusão direta, modo negativo.....	67
Figura 22: Espectro de massas do padrão da genisteína por infusão direta, modo negativo.	68
Figura 23: Espectro de massas da genisteína obtido após separação por cromatografia preparativa, por infusão direta, modo negativo.	68
Figura 24: Estrutura química da daidzina	69

Figura 25: Espectro NMR de ^1H da fração daidzina obtida após purificação.	70
Figura 26: Espectro NMR de ^{13}C da daidzina obtida após purificação.	70
Figura 27: Estrutura química da glicitina.....	73
Figura 28: Espectro NMR de ^1H da glicitina obtida após purificação.....	73
Figura 29: Espectro NMR de ^{13}C da glicitina obtida após purificação.....	74
Figura 30: Estrutura química da daidzeína	76
Figura 31: Espectro de NMR de ^1H da fração daidzeína obtida após purificação.	76
Figura 32: Espectro de NMR de ^{13}C da daidzeína obtida após purificação.....	77
Figura 33: Estrutura química da genisteína.....	79
Figura 34: Espectro NMR de ^1H da genisteína obtida após purificação.....	79
Figura 35: Espectro NMR de ^{13}C da genisteína obtida após purificação.	80
Figura 36: Cromatograma da amostra de grão de soja após extração e sem hidrólise. Condições cromatográficas iguais da figura 5.....	91
Figura 37: Cromatograma dos padrões de isoflavonas incorporados na amostra de grão de soja com a pureza espectral em três pontos do pico (início, ápice e cauda). Condições cromatográficas iguais da figura 5.	93
Figura 38: Curvas analíticas dos padrões dissolvidos em metanol:água 80:20 (v/v) e dos padrões incorporados em amostra de grão de soja, na faixa de concentração de 16,5 – 109,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para daidzeína, 5,4 – 36,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para gliciteína e 15,6 – 103,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para genisteína.	95
Figura 39: Gráfico da linearidade das isoflavonas agliconas daidzeína, genisteína e gliciteína, na faixa de concentração estudada.	97
Figura 40: Cromatogramas das amostras de soja transgênica (a) e não-transgênica (b). Condições cromatográficas iguais as da figura 5.....	103

LISTA DE ABREVIATURAS

- C_{inj} : Concentração de substâncias na injeção
- C_M : Concentração do soluto na fase móvel
- CRM : Material de referência certificado
- C_S : Concentração do soluto na fase estacionária
- CV : Coeficiente de variação
- DAD : Detector por arranjo de diodos
- F : Vazão de fase móvel
- GC : Cromatografia Gasosa
- h : Altura reduzida do prato
- HPLC : Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- INMETRO : Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
- ISO : International Standard Organization
- k : Fator de retenção
- K_c : Constante de distribuição linear
- K_L : Constante de distribuição na equação de Langmuir
- LD : Limite de Detecção
- LQ : Limite de Quantificação
- MS : Espectrometria de massas
- N : Número de pratos da coluna cromatográfica
- NMR : Ressonância magnética nuclear
- r : Coeficiente de correlação
- r' : Limite de repetitividade

- $r'_{(CV)}$: Limite de repetitividade expresso em porcentagem
- $R(\%)$: Recuperação em porcentagem
- R_s : Resolução cromatográfica
- RSD : Estimativa do desvio padrão relativo
- s_b : Estimativa do desvio padrão do coeficiente linear da equação da curva analítica
- s : Estimativa do desvio padrão amostral
- S : Inclinação ou coeficiente angular da curva analítica
- t_a : Tempo de saída do centro de gravidade do perfil injetado
- t_{n-1} : Valor crítico da distribuição t de Student com $n - 1$ graus de liberdade
- t_R : Tempo de retenção
- t_s : Teste estatístico de Student
- T : Temperatura
- USP : United States Pharmacopeia
- V_{inj} : Volume de injeção
- V_R : Volume de retenção
- \bar{X} : Média aritmética amostral
- σ : Desvio padrão da população
- ε : Porosidade total da coluna
- μ : Média verdadeira (média da população)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. <i>Considerações Gerais.....</i>	<i>1</i>
1.2. <i>Cultivo da soja convencional e transgênica.....</i>	<i>4</i>
1.3. <i>Métodos analíticos de extração de isoflavonas</i>	<i>7</i>
1.4. <i>Métodos de determinação de isoflavonas em produtos de soja.....</i>	<i>8</i>
1.5. <i>Cromatografia preparativa.....</i>	<i>9</i>
1.5.1. <i>Modelo de momentos estatísticos</i>	<i>14</i>
1.5.2. <i>Modelo de pratos representado pelo algoritmo de Craig</i>	<i>16</i>
1.5.3. <i>Modelo de transferência de massas ideal.....</i>	<i>17</i>
1.6. <i>Transposição de escala analítica para escala preparativa.....</i>	<i>18</i>
1.6.1. <i>Modelo da transposição direta.....</i>	<i>19</i>
1.7. <i>Materiais de referência certificados.....</i>	<i>20</i>
1.8. <i>Validação de métodos analíticos</i>	<i>22</i>
1.8.1. <i>Seletividade.....</i>	<i>23</i>
1.8.2. <i>Linearidade e faixa de aplicação.....</i>	<i>24</i>
1.8.3. <i>Precisão</i>	<i>25</i>
1.8.4. <i>Exatidão</i>	<i>27</i>
1.8.5. <i>Limite de detecção (LD).....</i>	<i>27</i>
1.8.6. <i>Limite de quantificação (LQ).....</i>	<i>28</i>
1.8.7. <i>Robustez.....</i>	<i>29</i>
2. OBJETIVOS.....	30
2.1. <i>Objetivo geral</i>	<i>30</i>
2.2. <i>Objetivos específicos.....</i>	<i>30</i>

3. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA SEPARAÇÃO DE ISOFLAVONAS EM EXTRATO SECO DE SOJA.....	31
3.1. <i>Materiais e métodos.....</i>	31
3.1.1. <i>Equipamento analítico.....</i>	31
3.1.2. <i>Reagentes e padrões utilizados.....</i>	32
3.1.3. <i>Amostras de extrato seco de soja.....</i>	32
3.2. <i>Validação do método</i>	33
3.2.1. <i>Seletividade</i>	33
3.2.2. <i>Linearidade e faixa de aplicação.....</i>	33
3.2.3. <i>Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)</i>	34
3.2.4. <i>Precisão</i>	35
3.2.5. <i>Exatidão</i>	35
3.2.6. <i>Robustez.....</i>	36
3.3. <i>Resultados e discussão.....</i>	38
3.3.1. <i>Parâmetros da validação.....</i>	40
3.3.1.1. <i>Seletividade.....</i>	40
3.3.1.2. <i>Linearidade e faixa de aplicação.....</i>	42
3.3.1.3. <i>Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).....</i>	45
3.3.1.4. <i>Precisão</i>	46
3.3.1.5. <i>Exatidão</i>	47
3.3.1.6. <i>Robustez.....</i>	48
3.3.2. <i>Determinação dos teores de isoflavonas no extrato seco de soja</i>	49
3.4. <i>Conclusões parciais.....</i>	50
4. TRANSPOSIÇÃO DA ESCALA ANALÍTICA PARA ESCALA PREPARATIVA...	51

4.1.	<i>Materiais e métodos</i>	52
4.1.1.	<i>Isotermas: carga ideal para manter o sistema linear</i>	52
4.1.2.	<i>Transposição direta</i>	52
4.1.3.	<i>Amostras de extrato seco de soja</i>	54
4.1.4.	<i>Instrumentação</i>	54
4.1.4.1.	<i>Sistema de cromatografia líquida preparativa</i>	54
4.1.4.2.	<i>Espectrometria de massas</i>	55
4.1.4.3.	<i>Ressonância magnética nuclear</i>	56
4.1.4.4.	<i>Determinação de água pelo método Karl Fisher</i>	56
4.1.5.	<i>Rendimento do processo</i>	56
4.2.	<i>Resultados e discussão</i>	57
4.2.1.	<i>Carga ideal para manter o sistema linear</i>	57
4.2.2.	<i>“Scale-up” - Transposição da escala analítica para uma escala preparativa</i>	59
4.2.3.	<i>Caracterização das frações obtidas e identificação estrutural das isoflavonas isoladas</i>	61
4.2.3.1.	<i>Caracterização das frações obtidas por HPLC-DAD</i>	61
4.2.3.2.	<i>Caracterização das frações obtidas por espectrometria de massas</i>	64
4.2.3.3.	<i>Caracterização das frações obtidas por ressonância magnética nuclear</i>	69
4.2.4.	<i>Pureza das frações e rendimento do processo</i>	81
4.2.5.	<i>Conclusões parciais</i>	83
5.	DETERMINAÇÃO DE ISOFLAVONAS EM GRÃOS DE SOJA TRANSGÊNICA E NÃO-TRANSGÊNICA	84
5.1.	<i>Materiais e métodos</i>	84

5.1.1.	<i>Equipamento analítico.....</i>	84
5.1.2.	<i>Padrões de isoflavonas</i>	85
5.1.3.	<i>Extração e hidrólise das amostras de grão de soja.....</i>	85
5.1.4.	<i>Validação de método para determinação de isoflavonas em grão de soja por HPLC-DAD.....</i>	86
5.1.4.1.	<i>Seletividade.....</i>	87
5.1.4.2.	<i>Linearidade e faixa de aplicação.....</i>	87
5.1.4.3.	<i>Limite de detecção e limite de quantificação.....</i>	88
5.1.4.4.	<i>Precisão</i>	88
5.1.4.5.	<i>Exatidão</i>	89
5.1.4.6.	<i>Robustez.....</i>	89
5.1.5.	<i>Determinação de isoflavonas em grãos de soja</i>	90
5.2.	<i>Resultados e discussão.....</i>	91
5.2.1.	<i>Validação do método para determinação de isoflavonas em grãos de soja..</i>	92
5.2.1.1.	<i>Seletividade.....</i>	93
5.2.1.2.	<i>Linearidade</i>	94
5.2.1.3.	<i>Limite de detecção e limite de quantificação.....</i>	97
5.2.1.4.	<i>Exatidão</i>	98
5.2.1.5.	<i>Precisão</i>	99
5.2.1.6.	<i>Robustez.....</i>	100
5.2.2.	<i>Teores das isoflavonas nas variedades transgênica e não-transgênica.....</i>	101
5.3.	<i>Conclusões parciais.....</i>	104
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	105
7.	REFERÊNCIAS	107

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações Gerais

Entre os produtos agrícolas que alimentam a população mundial, a soja vem apresentando extraordinária expansão e ocupando uma posição de destaque. Isto ocorre porque esta leguminosa é um alimento que apresenta alto valor nutricional, tem uma composição química rica que inclui óleos, vitaminas e alguns sais minerais como cálcio e ferro, contém mais de 34% de proteína e é fonte de antioxidantes como as isoflavonas ¹. A plantação, crescimento e colheita de soja apresentam alta produtividade e uma fácil adaptação em quase todas as regiões do mundo.

O consumo de soja e de produtos à base de soja estão associados com os benefícios à saúde, fato que criou considerável expectativa na comunidade dietética e nutricional. Contudo, grande parte da pesquisa sobre este tema permanece em andamento como uma questão polêmica na literatura sobre sua eficácia terapêutica ².

As isoflavonas caracterizam a soja como um alimento funcional, ou seja, além dos grãos fornecerem nutrientes essenciais ao organismo, também trazem benefícios à saúde, prevenindo algumas doenças.

As isoflavonas são compostos fenólicos naturalmente encontrados em algumas plantas e são conhecidas como fitoestrogênios, compostos encontrados em alimentos derivados de plantas, primeiramente em produtos à base de soja. Suas estruturas são similares ao hormônio estrogênio, ligando-se aos receptores de estrogênio ³. Algumas isoflavonas (genistina, daidzina e glicitina) são encontradas na soja, sendo consideradas antioxidantes naturais ⁴. Assim, o consumo de produtos contendo isoflavonas tem crescido nos últimos anos como uma alternativa à reposição hormonal, devido à sua atividade estrogênica e

poucos efeitos colaterais. Acredita-se que as isoflavonas tenham uma ação potencial na prevenção de algumas doenças crônicas ⁵, como câncer relacionado à problemas hormonais ⁶, osteoporoses ², disfunções cardiovasculares ⁷, câncer de colo ⁸, câncer de próstata ⁹ e ainda é indicada para diminuição dos sintomas ligados à menopausa ^{10,11}.

As formas predominantes de isoflavonas em soja e em produtos não fermentados de soja são as formas glicosídicas ¹², enquanto em produtos fermentados as formas predominantes são as agliconas. Suas estruturas químicas podem ser visualizadas na figura 1.

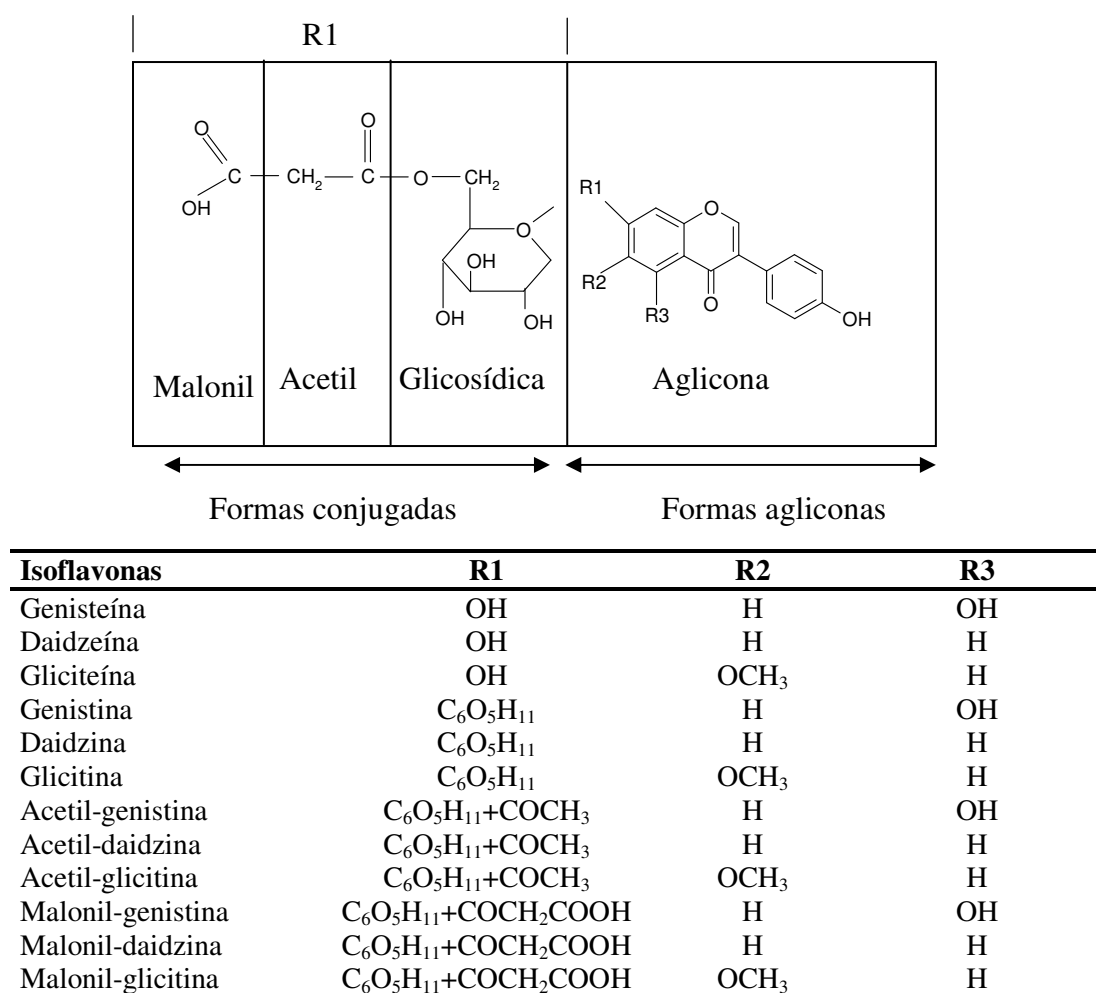


Figura 1: Estrutura química das isoflavonas encontradas em grãos de soja, adaptado de Rostagno *et al.* ¹³.

Após o consumo de produtos que contenham as formas de isoflavonas glicosídicas, estas passam pelo metabolismo enzimático no intestino delgado para serem transformadas em agliconas ¹⁴, que é a forma da isoflavona mais biodisponível no organismo ¹⁵.

A concentração de isoflavonas em grão de soja é bastante variável, entre 0,1 – 0,4 % ¹⁶⁻¹⁸, e a quantidade e composição das diferentes isoflavonas dependem da época do ano em que a soja foi plantada, do genótipo ¹⁶, da localização, do cultivo e das condições climáticas. A maior parte das isoflavonas está concentrada no hipocótilo e o seu conteúdo na casca é bem baixo ⁴. A extração do óleo de soja não remove as isoflavonas, devido à insolubilidade destes compostos em hexano ⁴.

A soja, no mundo oriental, é a base de composição de diversos pratos naturais e tradicionais, sendo, em certos casos, como os de populações de baixa renda e vegetarianos, a principal fonte de proteína. Talvez seja este um dos motivos desta parte do mundo ser menos afetada por problemas relacionados a reposição hormonal. Nos países ocidentais, a soja é largamente utilizada na indústria alimentícia como um alimento processado, sendo a sua aceitação como alimento natural ainda pequena, devido a fatores culturais.

A soja possui ainda importantes qualidades nutricionais, como a grande quantidade de proteínas vegetais (maior que 30 %) de alto valor biológico, além de ser fonte de ácidos graxos poliinsaturados (linoléico e linolênico). Apresenta uma elevada quantidade de ferro (de 9 a 13 mg/100 g), que possui boa biodisponibilidade. O termo biodisponibilidade, relacionado ao ferro, é a medida da fração do ferro alimentar capaz de ser absorvida pelo trato gastrointestinal e subsequentemente armazenada e incorporada ao grupo heme da hemoglobina ¹⁵.

1.2. Cultivo da soja convencional e transgênica

No mundo de hoje existe uma relação intrínseca entre a agricultura e a saúde dos consumidores. Os métodos de cultivo afetam a qualidade do solo e este o equilíbrio da planta e finalmente, a planta interfere na qualidade de vida do homem e do animal que dela se alimentam ¹⁹.

Todos os seres vivos carregam em suas células uma espécie de carteira de identidade – o ácido desoxirribonucleico (DNA). A engenharia genética trabalha com a manipulação do DNA, criando novas características para o ser vivo – seja trocando a ordem dos genes ou introduzindo um novo gene, alheio à composição original. O gene modificado é chamado de transgene, daí o termo “transgênico” para definir o novo ser vivo que é gerado desta manipulação, também conhecido como GM, geneticamente modificado ²⁰.

Devido ao grande avanço na biotecnologia, cientistas estão atualmente utilizando a tecnologia em genética para transferir genes com tolerância ou resistência a herbicidas, pragas e insetos para grãos de soja tradicionais. Existem vários tipos de soja transgênicas sendo desenvolvidas atualmente. A mais conhecida e plantada comercialmente é uma planta que recebeu, por meio de técnicas da biotecnologia, um gene de outro organismo capaz de torná-la tolerante ao uso de um tipo de herbicida, o glifosato, comumente utilizado nesta cultura.

Este gene foi extraído de uma bactéria do solo, conhecida por *Agrobacterium*, e patenteado por uma empresa privada com o nome CP4-EPSPS. Estruturalmente, é muito parecido com os genes que compõem o genoma de uma planta. Quando inserido no genoma da soja, tornou a planta resistente à aplicação do herbicida.

Em sojas não-transgênicas, essa resistência natural da planta ao glifosato é muito pequena e inibe a produção de proteínas na soja. A soja modificada tem um gene transferido da bactéria que possibilita a síntese das proteínas mesmo sob altas doses de herbicida o que, em teoria, deixa as plantas mais resistentes e mais produtivas.

Entretanto, um estudo constatou que a soja transgênica é menos produtiva do que a soja convencional, além de necessitar de mais agrotóxico que os cultivos convencionais ²¹.

O glifosato é um produto comumente utilizado pelos agricultores no controle de ervas daninhas e limpeza de áreas antes do plantio ²². Suas moléculas se ligam a uma proteína vital destas plantas, impedindo seu funcionamento e ocasionando sua morte. O glifosato, N-(fosfonometil)-glicina, (GLI), costuma ser pulverizado, sendo em geral absorvido na planta através de suas folhas e dos caulículos novos ²³. Ele é um herbicida não seletivo, sistêmico, pós-emergente, representando atualmente 60 % do mercado mundial de herbicidas não seletivos. Sua elevada eficiência na eliminação de ervas daninhas e o fato de possuir uma baixa toxicidade aos que o manipulam são responsáveis pelo seu grande sucesso ²³.

Essa novidade chegou ao campo pela primeira vez nos Estados Unidos na safra de 1996. No ano seguinte, os agricultores argentinos também aderiram à novidade. Com a nova tecnologia de soja transgênica, ficou mais fácil para os agricultores controlarem as ervas daninhas, sem afetar a soja ²⁴.

No Brasil, a história da soja GM é cheia de polêmica desde 1995. Foi nesse ano que, através da Lei de Biossegurança, o cultivo de plantas GM foi autorizado no Brasil, somente em caráter experimental. Em 1998, a CTN-Bio (Comissão Técnica Nacional de Biossegurança) autorizou o cultivo da soja

geneticamente modificada *Roundup Ready*, da empresa de biotecnologia Monsanto (Biotech), para venda ao público.

Uma das grandes problemáticas em torno deste tema é com relação ao uso abusivo do agrotóxico glifosato, pelo fato da planta não sofrer danos pelo seu uso.

De acordo com os técnicos da defesa sanitária, a grande preocupação está na utilização do glifosato no cultivo da soja transgênica pois, segundo eles, neste cultivo, o herbicida é utilizado no período pós-emergente, ou seja, diretamente sobre a planta germinada. Com isso, as chances dos resíduos desta substância permanecerem no alimento são maiores. Como cerca de 60% dos produtos comprados nos supermercados têm soja, fatalmente os que são derivados daquelas geneticamente modificadas também correm o possível risco de estarem contaminados ²⁵⁻²⁷. Além disso, já se observa que algumas pragas estão desenvolvendo resistência ao herbicida glifosato. Esta situação exige o aumento de número de aplicações de glifosato ou voltar a utilizar os herbicidas antigos, como o 2,4-D, podendo gerar possíveis resíduos nos alimentos ²⁸.

Em consequência de tudo isto, outra preocupação bastante grande é com relação às exportações, pois assim que os países importadores observarem todos esses riscos poderão restringir a entrada da soja transgênica brasileira por estarem contaminadas com glifosato e ácido fosfônico amino metílico (AMPA), seu principal metabólito ²⁸⁻³¹. Esta é uma das principais preocupações do Brasil e de outros países, com a grande produção dos vários tipos de soja transgênica e não transgênica.

1.3. Métodos analíticos de extração de isoflavonas

O procedimento analítico para análise de amostras complexas consiste em vários passos, incluindo amostragem, preparação da amostra, separação, quantificação, tratamento estatístico dos dados e decisão de executar a análise.

A técnica analítica por si só não remove interferências provenientes das amostras para a identificação dos compostos, principalmente em se tratando de alimentos. A preparação de amostra é um procedimento que consiste no isolamento do componente de interesse (analito) dos demais componentes de uma amostra (matriz). Este procedimento pode variar de acordo com a seletividade, velocidade e conveniência, dependendo do método e das condições utilizados, bem como da configuração da fase de extração. A otimização deste procedimento diminui os gastos e melhora a eficiência das análises. O equipamento apropriado para a técnica de extração e o procedimento adequado facilitam para que as análises sejam rápidas e eficientes.

As isoflavonas são compostos fenólicos presentes na soja e em produtos a base de soja. Vários trabalhos indicam que diferentes interações com os componentes na matriz da amostra, por exemplo proteínas ^{32,33}, podem influenciar diretamente na sua extração.

Os métodos mais comuns utilizados para extração de isoflavonas em grãos de soja e produtos derivados de soja incluem extrações em meio aquoso com solventes orgânicos ³⁴⁻³⁹, incluindo metanol ⁴⁰⁻⁴², etanol ^{43,44} ou acetonitrila ^{39-41,45}, ou ainda utilizando misturas simples de solventes diretamente no sólido. Também são utilizadas técnicas como soxhlet ¹³ ou ainda extração com banho ultra-sônico ³⁸ por algumas horas. Estes procedimentos produzem bons resultados após a extração, porém requerem longos períodos de extração,

envolvem grande consumo de solvente e ainda exigem um pré-tratamento adicional da amostra, o que pode resultar em perda ou degradação dos analitos.

Recentemente, alguns trabalhos têm sido publicados utilizando extrações por fluídos supercríticos ⁴⁶, líquidos pressurizados ⁴⁷, extração e micro-extração em fase sólida ⁴⁸, os quais relatam excelentes resultados de extração comparados aos por extração com solventes orgânicos, mas onerando muito o processo analítico.

A AOAC ⁴⁹ (*Association of Official Analytical Chemists*) recomenda como método de extração das isoflavonas, o uso de metanol e água como solvente, seguido de hidrólise alcalina. Com este método são extraídas as isoflavonas na forma glicosídica. Griffith e Collison ³⁵ desenvolveram um método mais simples e eficiente, em relação ao método oficial, para extração das isoflavonas em produtos à base de soja, no qual algumas formas glicosídicas das isoflavonas (6''-O-malonil- e 6''-O-acetil-), presentes na parte protéica do grão e encontradas em pequena quantidade, foram extraídas com metanol:água (80:20) e posteriormente determinadas na forma aglicona.

1.4. Métodos de determinação de isoflavonas em produtos de soja

Para determinação do teor de isoflavonas em grão de soja e outras matrizes, uma das técnicas analíticas utilizadas é a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) ^{16-18,50-54} que, após a extração das isoflavonas, permite sua separação e quantificação.

Os métodos empregando a cromatografia líquida são bastante eficientes para determinação e quantificação de isoflavonas em grão de soja. A maioria destes métodos emprega o modo de eluição por gradiente para separação e utilizam, como fase móvel, misturas de metanol:água ou acetonitrila:água e

ácido trifluoroacético ou ácido acético glacial como modificador⁵⁵⁻⁵⁷. Entretanto, estes métodos não têm sido bem sucedidos na resolução das 12 isoflavonas simultaneamente, mesmo utilizando programação por gradiente. Uma condição reprodutível que permitiu uma boa separação para todas as isoflavonas, porém com um tempo total de corrida de 90 minutos, foi relatado por Wang e Murphy⁵³. Os métodos foram desenvolvidos para separação de isoflavonas em produtos a base de soja por Murphy *et al.*⁵⁸ e Franke *et al.*⁵⁹, também com tempos de corridas muito longos e resolução insuficientes.

Métodos mais rápidos e mais simples foram também desenvolvidos e utilizados para a análise simultânea de 12 isoflavonas empregando uma fase móvel composta de acetonitrila:água com gradiente binário. Entretanto estes métodos apresentaram sobreposições do padrão interno com a genistina⁶⁰⁻⁶².

César *et al.*⁶³ estabeleceram um método usando condição isocrática para separação e quantificação das isoflavonas na forma aglicona (daidzeína, gliciteína e genisteína) para o extrato seco de soja. Esta metodologia utilizou hidrólise ácida para transformar todas as formas glicosídicas na forma aglicona, permitindo separar três isoflavonas na forma aglicona das impurezas provenientes do extrato seco.

1.5. Cromatografia preparativa

O poder de separação da cromatografia tem chamado a atenção de algumas empresas para produzir substâncias químicas puras em grandes quantidades. A cromatografia tem sido utilizada em escala preparativa, para purificação de compostos e posterior utilização como padrões⁶⁴. Porém, para que se possa obter uma separação eficaz e produzir uma quantidade representativa de um determinado composto, utilizando a cromatografia

preparativa, o rendimento e a faixa de produção dependem do volume da amostra e da sua concentração. Sendo assim, é preciso dimensionar o tamanho do equipamento, a vazão necessária e a coluna a ser utilizada na separação. A massa do composto adsorvido ou dissolvido na fase estacionária depende da natureza e da concentração do componente de interesse e de todos os outros compostos, sejam eles aditivos da fase móvel ou componentes da amostra eluídos próximos ao composto de interesse.

A cromatografia líquida foi inicialmente aplicada para extração e purificação de misturas complexas de origem vegetal em escala preparativa. As frações coletadas eram analisadas, identificadas e usadas para aplicações diversas⁶⁵. Assim, a importância da cromatografia líquida preparativa está em isolar uma certa quantidade de um composto purificado presente em uma amostra para utilizá-lo em um outro propósito.

A separação cromatográfica em escala preparativa e industrial envolve um custo elevado, principalmente de fase estacionária, fase móvel e matéria-prima, restringindo ao usuário os procedimentos de variações das condições para otimização do sistema nesta escala. Quando, além da separação, é necessário a otimização deste tipo de processo, torna-se importante um estudo detalhado partindo de condições de resolução e quantidade de amostra estabelecidas em pequena escala, como a analítica. Em escala reduzida é mais fácil estabelecer os parâmetros importantes e os que possam ser seguramente negligenciados.

Atualmente, o desenvolvimento de processos cromatográficos em escala preparativa tem se voltado para a aplicação de modelos para a otimização das condições cromatográficas. Modelos matemáticos sobre os fenômenos envolvidos em HPLC podem ajudar na transposição de escala e nas simulações de perfis cromatográficos⁶⁵.

Em uma separação cromatográfica, a relação de equilíbrio entre a quantidade sorvida na fase estacionária e a concentração na fase móvel de um composto a uma temperatura constante é denominada isoterma de sorção, que pode ser linear ou não-linear. Um grande problema no estudo da curvatura das isotermas é a origem e a natureza dos seus parâmetros, que podem explicar as falhas no escalonamento utilizado em aplicações preparativas, por causa da complexidade do aspecto físico-químico envolvido no processo de separação. A fundamentação teórica, neste caso, tem um papel muito importante no desenvolvimento de separações preparativas, devido ao custo e interesse econômico envolvido ⁶⁵.

O processo cromatográfico pode ser simulado por modelos matemáticos que descrevem os fenômenos que o constituem. Para processos preparativos, diversos modelos vêm sendo aplicados na transposição de escala e na otimização, por simularem a separação ao longo do tempo e em cada parte do leito cromatográfico ⁶⁵.

A equação de adsorção linear é empírica e expressa a relação constante entre a concentração do soluto encontrado em um dado volume de fase estacionária (C_S) e a concentração do mesmo na fase móvel (C_M), como pode ser observado na equação 1:

$$C_S = K_c \times C_M \quad \text{(equação 1)}$$

onde: K_c é a constante de distribuição linear.

Para um comportamento linear, as alterações na concentração e no volume de injeção não afetam a altura do prato e a retenção da substância. Segundo Jönsson ⁶⁶, o processo cromatográfico em que a retenção seja regida por uma

isoterma de distribuição linear é classificado como “cromatografia linear”, conforme pode ser observado na figura 2.

Este gráfico indica que quando ocorre uma sobrecarga na coluna cromatográfica, a isoterma de distribuição deve ser mantida linear para que não haja distorção nos picos e prejuízo na separação entre os compostos e no rendimento do processo de separação. Nos casos onde a relação para um determinado composto é não-linear, este composto pode apresentar um comportamento típico de uma isoterma do tipo Langmuir (figura 2 e 3a) ou do tipo anti-Langmuir (figura 2 e 3b). Caso o composto apresente esta relação não-linear, há a necessidade de utilizar outros modelos matemáticos para prever a separação e a carga máxima quando a escala é aumentada.

Pode-se ainda diminuir a concentração e o volume injetado (diminuir o rendimento do processo) até uma concentração na qual esta relação ainda é linear (linha tracejada na figura 2).

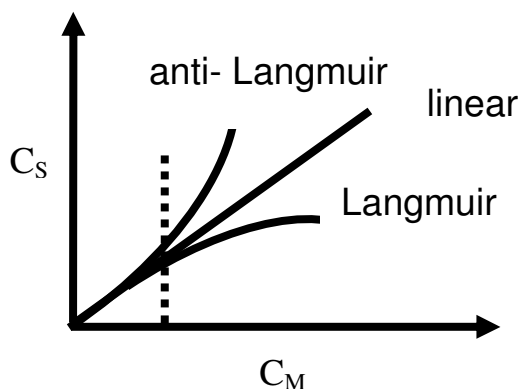


Figura 2: Gráfico da adsorção linear e não linear, expressando a relação entre concentração do soluto encontrado na fase móvel e na fase estacionária. Até uma determinada concentração esta relação é linear para todos os casos.

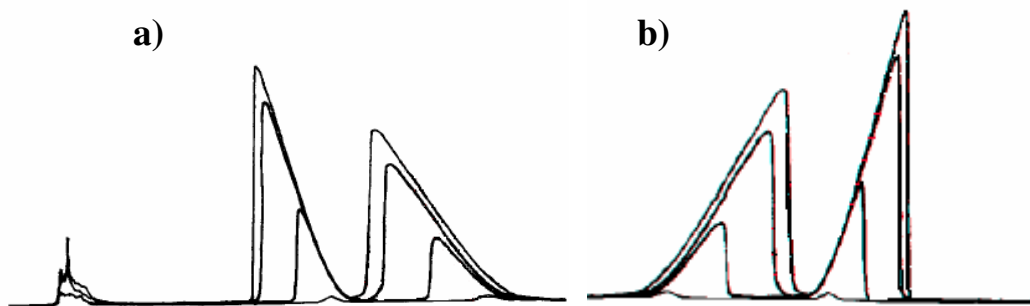


Figura 3: Cromatogramas típico de adsorção tipo (a) Langmuir e (b) anti-Langmuir, adaptado de Levin ⁷⁵, mostrando os deslocamentos de tempo de retenção com o aumento da carga de amostra.

Nas condições de comportamento linear, a retenção, a intensidade relativa e a largura dos sinais cromatográficos em larga escala, tornam-se idênticos aos dos ensaios em pequena escala. Por isso, a transposição direta é freqüentemente aplicada pelos fabricantes de colunas cromatográficas para HPLC para demonstrar a repetibilidade da composição e do recheio da fase estacionária entre as colunas analítica e preparativa. No entanto, a similaridade do perfil cromatográfico entre as duas escalas é obtida apenas quando se executa a transposição, preservando a proporcionalidade do fator de transposição direta. Na cromatografia preparativa os picos cromatográficos muitas vezes não se apresentam no cromatograma com a mesma eficiência obtida na escala analítica, devido à quantidade grande de amostra aplicada no sistema. Porém, o que irá interessar ao processo é a resolução entre o composto de interesse e seus interferentes.

Otimizações com alterações da vazão, da concentração de injeção ou do comprimento da coluna são ocasionalmente executadas após a transposição, quando se requer melhor separação. No entanto, a eficiência de separação desejada nestes casos pode ser prevista apenas matematicamente ⁶⁷, recorrendo-se ao empirismo para otimizar a separação.

Alguns modelos matemáticos explicam teoricamente a separação cromatográfica e os fenômenos físico-químicos dentro de uma coluna cromatográfica. Os vários modelos são descritivos dos fenômenos de cinética da distribuição, equilíbrio, transferência de massa, propagação e dispersão axial, baseados na resolução, simplificada ou não, de balanços de massa na coluna ⁶⁸⁻⁷⁴. Eles podem ser classificados em três grandes grupos: o modelo de momentos estatísticos, aplicáveis apenas em condições lineares ^{68,69}, o modelo de pratos, sendo mais comum o representado pelo algoritmo de Craig, que simula equilíbrio, propagação e a dispersão axial entre pratos ^{70,71}, e os modelos de transferência de massas ⁷²⁻⁷⁴, classificados como ideais.

1.5.1. Modelo de momentos estatísticos

Os modelos de momentos estatísticos baseiam-se na hipótese de que os fenômenos ocorridos na coluna são representados por um operador Gaussiano, ou seja, cada elemento (concentração da substância) do perfil de entrada (injeção) é disperso, numa distribuição Gaussiana, ao propagar-se na coluna. Pelo balanço global de massas, a área total do perfil de saída corresponde à entrada (substância injetada), o que representa o momento de ordem zero da distribuição Gaussiana ⁷³. A retenção do centro de gravidade da substância injetada é representada pelo tempo (ou volume) de retenção (t_R ou V_R) e corresponde ao momento de primeira ordem. Ao longo da propagação, ocorre o espalhamento do mesmo centro de massa, o qual é representado, no fim da coluna, pela variância do perfil (momento de segunda ordem - σ^2). Os modelos de momentos estatísticos representam perfis para baixa concentração total de amostra, ou seja, quando a cromatografia é regida pela isoterma de distribuição linear (cromatografia linear), sendo o perfil de concentração na saída da coluna

calculada pela expressão integral baseada na distribuição Gaussiana, na qual a função $f(t_a)$ descreve, matematicamente, o perfil de injeção (entrada) ao longo do tempo e t_a representa o tempo em que o centro de gravidade do pico sai da coluna, com contribuição dos tempos de retenção. A integral resultante, descrita na equação 2, têm sido resolvida pelo método de transformada de Laplace para diferentes perfis de injeção.

$$C_M(t) = (C_{inj} \times V_{inj}) / [F \times (2\pi \times \sigma^2)^{1/2}] \times \int_{t_{a,min}}^{t_{a,máx}} f(t_a) \times \exp [(t-t_a)^2 / (2 \times \sigma^2)] dt_a$$

(Equação 2)

O modelo clássico de van Deemter, Zuiderweg e Klinkenberg apresenta resolução algébrica para um breve intervalo de injeção, desprezando qualquer efeito extracoluna ^{68,73}. Neste modelo, o perfil de injeção ($f(t_a)$) é representado por um pulso imediato de tempo aproximado de zero. Assim, a função matemática de distribuição de probabilidade (Equação 3) define a expressão algébrica do modelo mais simples de momento estatístico (Equação 2), representando os perfis simétricos dos componentes da amostra na fase móvel no fim da coluna.

$$C_M(t) = (C_{inj} \times V_{inj}) / [F \times (2\pi \times \sigma^2)^{1/2}] \times \exp [(t - t_a)^2 / (2 \times \sigma^2)] \quad \textbf{(Equação 3)}$$

A quantidade injetada, representada pelo momento de ordem zero, influi somente na intensidade do sinal sem alterar seu padrão (perfil cromatográfico). Este modelo representa apenas dois parâmetros: a retenção e a dispersão axial do fenômeno cromatográfico.

1.5.2. Modelo de pratos representado pelo algoritmo de Craig

O algoritmo de Craig foi originado de um balanço de massas de um extrator líquido-líquido de múltiplos tubos ⁷³ e vem sendo aplicado em cromatografia para resolver o balanço de massas ao longo da coluna a cada intervalo de tempo, sendo também conhecido por “modelo de pratos”. Tem como principal vantagem a sua aplicação com quaisquer equações de equilíbrio, incluindo as competitivas, sendo por isso muito aplicado para estudos de situações de sobrecarga da coluna, embora também represente condições de cromatografia linear ⁷¹.

Neste modelo, a coluna é artificialmente dividida em uma série de pequenos estágios (nos quais são admitidas uma mistura ideal das fases), normalmente chamadas de “estágios de Craig” e que não corresponde a um prato, já que são calculados equilíbrio e dispersão axial. O número de estágios na coluna (N_c) é calculado pela equação 4 e corresponde a um elemento da coluna em relação a sua dimensão axial (Δz) a um determinado intervalo de tempo (Δt).

$$N_c = \left(N \times \frac{k}{1+k} \right) \quad \text{(Equação 4)}$$

onde: k = Fator retenção e N = Número de pratos da coluna

A simulação do cálculo é feita da seguinte forma: a coluna é dividida em uma série de estágios de igual comprimento na direção da vazão. Cada estágio contém um volume V_M de fase móvel e um volume V_S de fase estacionária. A massa de soluto (no injetor) entra no volume do composto não retido no primeiro estágio de fase móvel que passa pelo sistema e a concentração é calculada. A partir desta etapa, podem ser calculados três fenômenos seqüencialmente:

equilíbrio, dispersão axial e propagação. O equilíbrio de cada componente é determinado em cada estágio entre a fase móvel e a estacionária, baseando-se nos fatores de distribuição (pelo modelo de equilíbrio que for adotado); a massa de fase móvel difundida para os estágios vizinhos é obtida pelo cálculo de dispersão axial. A seguir a fase móvel (contendo a concentração não adsorvida do soluto) é propagada para o estágio seguinte. A concentração de equilíbrio do soluto é novamente alcançado e o processo é repetido. Para encontrar a carga máxima a ser aplicada neste modelo, é necessário calcular o número total de estágios e prever a concentração do soluto em cada estágio.

Os algoritmos de Craig são aplicáveis a sistemas multicomponentes, até mesmo considerando efeitos de impedimento competitivo no cálculo de equilíbrio. Por não considerarem os efeitos de transferência de massas na partícula, esses algoritmos representam melhor as separações em colunas de número de pratos elevado, mas podem ser também aplicados para colunas menos eficientes, desde que se conheça a eficiência da mesma.

1.5.3. Modelo de transferência de massas ideal

Aumentando a quantidade de amostra injetada até a saturação total da fase estacionária na coluna ou superando-a, a largura do pico aumenta tão fortemente que os efeitos dispersivos podem ser desprezados, como se a eficiência da coluna fosse considerada infinita. Para situações de sobrecarga de massas, o modelo ideal supõe que o balanço entre as fases móvel e estacionária seja alcançado em todo ponto (na coluna) e a todo instante. Com isso, o termo de acúmulo da massa do soluto na partícula da fase estacionária é expressa pela isoterma escolhida.

Se a isoterma for linear utiliza-se a equação 5:

$$\frac{(1-\varepsilon)}{\varepsilon} \frac{dC_s}{dC_M} = k \quad \text{(Equação 5)}$$

onde: ε é a porosidade total da coluna.

Se a isoterma for do tipo Langmuir, utiliza-se a equação 6:

$$\frac{(1-\varepsilon)}{\varepsilon} \frac{dC_s}{dC_M} = \frac{k}{(1 + K_L \times C_M)^2} \quad \text{(Equação 6)}$$

onde: K_L é a constante de distribuição da equação de Langmuir.

O modelo ideal supõe um perfil de fluxo contínuo da fase móvel, ou seja, sem dispersão axial ao longo da coluna, negligenciando assim a resistência à transferência de massas. Estas considerações são válidas admitindo a coluna com eficiência infinita, recomendável para simulação de sistemas cromatográficos de alto número de pratos (sistemas analíticos).

No caso da isoterma tipo Langmuir⁶⁵, a capacidade de saturação da fase pode ser estimada acompanhando a perda de resolução com experimentos de sobrecarga de massa na coluna.

1.6. Transposição de escala analítica para escala preparativa

A transposição de escala é uma etapa no desenvolvimento de processos de separação e purificação que utiliza cromatografia líquida de alta eficiência e que pode ser realizada a partir de diferentes métodos na literatura⁷⁵⁻⁷⁷ como, por exemplo, a purificação de insulina de uma série de impurezas⁷⁸. Porém, o

comportamento do composto deve ser estudado previamente em uma escala analítica, para analisar qual será seu comportamento com o aumento de carga.

Somente depois de estabelecidas as condições ideais de separação em escala analítica a transposição de escala deve ser realizada para separar os compostos na escala preparativa e prever qual a quantidade possível de ser obtida com este sistema.

1.6.1. Modelo da transposição direta

Este modelo é comum em trabalhos de separação em escalas semi-preparativas e preparativas de substâncias naturais e é recomendado pelos fabricantes de colunas. Na transposição direta, variáveis operacionais, como vazão da fase móvel, volume de injeção e diâmetro da coluna, podem ser ajustados nas condições preparativas a partir de uma relação direta com o sistema analítico. Além disso, pode-se prever qual será o volume de um composto não retido, qual o consumo de fase móvel, qual a produtividade, além da possibilidade de previsão de um fator de carga entre as duas escalas.

A transposição da escala analítica para a escala preparativa, na purificação dos compostos, deve ser feita através do modelo matemático descrito na literatura ⁶⁷. Neste modelo matemático, um fator, chamado de “fator de transposição direta” é calculado e é utilizado para prever a concentração em termos de massa e volume no sistema preparativo. Também é calculada a vazão a ser utilizada no sistema preparativo de tal maneira que seja possível reproduzir as condições obtidas no sistema analítico com uma relação direta entre as vazões e o diâmetro das colunas.

Seguindo este modelo de transposição, a isoterma de distribuição pode ser mantida linear para que não haja distorções entre os picos nem problemas com a

resolução, comprometendo assim a pureza dos compostos e o rendimento do processo.

O modelo da transposição direta é o modelo mais simples de transposição de escalas e não leva em consideração nenhum fator extra-coluna. A desvantagem deste modelo é a necessidade de definição prévia dos parâmetros de separação analítica antes da transposição e o estabelecimento do equilíbrio linear com o aumento da carga (massa e volume).

1.7. Materiais de referência certificados

A necessidade de demonstrar a comparabilidade e a rastreabilidade das medições químicas, isto é, sua qualidade, está sendo cada vez mais exigida. Isto é explicado pelo fato de que tais medições têm um papel chave no diagnóstico de doenças, na identificação das tendências globais da biosfera e na avaliação dos efeitos de vários contaminantes no meio ambiente. Além disso, uma fração significativa da produção industrial e do comércio exterior (alimentos, insumos agrícolas, medicamentos, etc.) é também dependente das medições químicas, que utilizam padrões para estas medições. Desta forma, uma informação ou um resultado analítico, originado de uma medição química, ao ser considerado como um recurso, tem certas características, entre as quais se destaca a exatidão ⁷⁹.

Para a quantificação dos compostos em uma análise, há a necessidade do uso de padrões analíticos. Estes padrões são de fundamental importância para obter resultados analíticos confiáveis em processos de validação de métodos e em análises rotineiras para garantir a qualidade de produtos. Porém, o custo de alguns padrões de referência disponíveis para comercialização ainda é bastante alto, onerando muito o processo analítico.

Os métodos cromatográficos dependem fortemente dos padrões e materiais de referência para fornecerem dados exatos. Materiais de referência certificados (CRM) são materiais de referência, acompanhados de um certificado, que lista o valor de concentração de uma dada substância em uma matriz, ou outra grandeza, para cada parâmetro e uma incerteza associada. Já os padrões de referência são substâncias puras isenta de matrizes e qualquer outro composto.

A utilização de padrões de referência certificados é um requisito recomendado no processo de validação de um método de ensaio. Entretanto não existem materiais de referência certificados para todas as diferentes matrizes necessárias. Somente estão disponíveis materiais de referência para as técnicas analíticas mais empregadas e para um número muito pequeno de matrizes.

Estes materiais de referência certificados e padrões de referência são fornecidos por organismos reconhecidos e confiáveis, como NIST (National Institute of Standards and Technology - USA), LGC (Laboratory of the Government Chemist - UK), USP (United States Pharmacopeia), etc.

O US-FDA reconhece duas categorias de padrões de referências: compendial e não compendial. Os padrões de referência compendiais podem ser obtidos de fontes como a USP⁸⁰ e não necessitam de caracterização posterior. Os padrões de referência não compendiais são substâncias com elevado teor de pureza que podem ser obtidas através da utilização de procedimentos exaustivos de purificação e devem ser cuidadosamente caracterizados para garantir sua identidade, potência e pureza. É recomendável que fatores de correção de pureza sejam incluídos em qualquer cálculo existente no método quando este tipo de padrão é utilizado.

1.8. Validação de métodos analíticos

Um processo analítico pode ser dividido em desenvolvimento de método, sua validação e fase de aplicação. O objetivo de uma análise é gerar informações confiáveis, exatas e interpretáveis sobre a amostra e garantir que o método analítico preencha estes requisitos. Para tornar o método validado, deve-se observar as diretrizes a serem seguidas numa seqüência lógica. Atualmente, nenhum método analítico deve ser usado rotineiramente se não for totalmente validado ⁷⁹.

Dados analíticos não confiáveis podem conduzir à decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irreparáveis.

Todos os órgãos reguladores do Brasil ⁸¹⁻⁸² e de outros países exigem a validação de métodos analíticos, que é considerada um dos requisitos essenciais no registro de produtos. A maioria dos países tem estabelecido documentos oficiais que são diretrizes a serem adotadas na validação de métodos analíticos ⁷⁹.

Os parâmetros analíticos normalmente encontrados para validação de métodos de separação são: seletividade, linearidade e faixa de aplicação, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez. Para a validação de um método, a avaliação de cada parâmetro vai depender de sua aplicabilidade. Estes termos são também conhecidos como parâmetros de desempenho analítico, características de desempenho e, algumas vezes, como figuras analíticas de mérito.

1.8.1. Seletividade

A seletividade de um método é a sua capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação numa amostra complexa. A seletividade corresponde ao grau de interferência de espécies como outro ingrediente ativo, excipientes, impurezas e produtos de degradação, bem como outros compostos de propriedades similares que possam estar porventura presentes, garantindo que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse ⁸⁰. Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão serão seriamente comprometidas. Apenas depois de assegurada a seletividade do método, os demais parâmetros analíticos devem ser analisados. A seletividade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método. Ela deve ser reavaliada continuamente durante a validação e subsequente ao uso do método.

A seletividade pode ser assegurada de várias maneiras. Comparando os cromatogramas da matriz isenta do analito e da matriz adicionada do analito, nenhum interferente deve eluir no tempo de retenção do analito. Deve-se observar que o analito incorporado à matriz precisa ser mantido da mesma forma ativa para ser garantida a seletividade.

A segunda maneira é através da avaliação com detectores como arranjo de diodos ou espectrômetro de massas, que permitem a comparação do espectro do composto separado com o do analito puro, utilizado como uma indicação da presença do composto puro. Estas técnicas são as mais utilizadas.

O método de adição de analito também pode ser aplicado para os estudos de seletividade, quando não for possível obter uma matriz isenta do analito. Neste caso é construída uma curva analítica com adição do analito na amostra e outra sem a amostra. Os resultados destas duas curvas e seus coeficientes são

então representados em um mesmo gráfico em função da concentração do analito adicionado. Se as inclinações de regressão destas duas curvas não diferirem significativamente, pode-se garantir que não há interferência da matriz.

1.8.2. Linearidade e faixa de aplicação

A linearidade corresponde à capacidade do método de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação.

Na maior parte dos casos, a relação matemática entre o sinal e a concentração ou massa da espécie de interesse deve ser determinada empiricamente a partir de sinais medidos para massas ou concentrações conhecidas dessa espécie. Esta relação matemática é chamada de curva analítica, também conhecida como curva de calibração, e é um gráfico que mostra a resposta de um método analítico como uma função de uma quantidade conhecida do constituinte a ser medida. Entretanto, somente a curva analítica e o coeficiente de correlação (r) próximo da unidade não garantem a linearidade da método⁷⁹. Para assegurar a linearidade de uma método, deve-se ter um critério mais rigoroso, como o gráfico dos resíduos da curva analítica ou ainda o gráfico de linearidade.

O gráfico dos resíduos⁸³ é construído com os resíduos dos pontos da curva no eixo y versus a concentração no eixo x. Pode-se então verificar visualmente quais os pontos que mantêm uma relação linear e quais estão dispersos, estabelecendo assim a linearidade.

O gráfico de linearidade⁸³⁻⁸⁵ é construído com as respostas relativas da curva no eixo y e as concentrações correspondentes, em escala logarítmica, no eixo x. O coeficiente angular intercepta as respostas relativas da curva analítica e

é traçado como uma linha horizontal sobre toda a faixa de concentração. São desenhadas outras linhas horizontais paralelas no gráfico, para 85 e 115 % da linha central do coeficiente angular. Conclui-se que o método é linear até o ponto onde a resposta relativa compreenda entre a linha de 85 e 115 %.

1.8.3. Precisão

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas ⁷⁹. Normalmente a precisão pode ser expressa através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD), também conhecido como coeficiente de variação (CV), ou através do desvio associado a um número estatisticamente significativo de amostras ⁸⁶.

O desvio pode ser expresso através do intervalo de confiança da média, que é uma faixa de valores dentro da qual existe uma determinada probabilidade de se encontrar um certo valor de uma variável contínua. É uma expressão que estabelece que a média verdadeira está a uma certa distância do valor médio experimental.

O intervalo de confiança da média pode ser obtido através da equação 7:

$$\text{intervalo de confiança da média} = \bar{x} \pm t_{n-1} \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (\text{Equação 7})$$

onde: s = estimativa do desvio padrão relativo, n = número de medições e t_{n-1} = valor crítico da distribuição t_s de Student com n-1 graus de liberdade. O valor t_s é tabelado e apresenta valores para diferentes níveis de confiança

A precisão é considerada em três níveis diferentes: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

A repetitividade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas condições de repetitividade: mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo instrumento usado sob as mesmas condições, mesmo local e repetições em um curto intervalo de tempo.

Recomenda-se que a repetitividade seja verificada a partir de um mínimo de nove determinações cobrindo o limite especificado do procedimento (ex.: três níveis, três repetições cada um), ou a partir de um mínimo de seis determinações a uma concentração similar a do valor esperado ⁸².

A precisão intermediária indica o efeito das variações dentro do laboratório devido a eventos como: diferentes dias ou diferentes analistas ou diferentes equipamentos ou uma combinação destes fatores.

A precisão intermediária é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um único laboratório e, como tal, mais aconselhável de ser adotada, porém é menos eficiente quando comparada com os estudos de repetitividade e reprodutibilidade. O objetivo da precisão intermediária durante o processo de validação é verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados ou estatisticamente sem diferenças no resultado. O número de ensaios necessários para se avaliar a precisão intermediária seguem as mesmas recomendações do INMETRO ⁸¹ ou da ANVISA ⁸² para o cálculo de repetitividade descrita acima e deve ser expressa da mesma maneira.

A reprodutibilidade é o grau de concordância entre os resultados das medições de uma mesma amostra, efetuadas sob condições variadas (mudança de operador, local, equipamentos, etc.). A reprodutibilidade refere-se aos resultados

dos estudos de colaboração entre laboratórios e deve ser considerada em situações como a padronização de procedimentos analíticos a serem incluídos, por exemplo, em farmacopéias. É muito comum encontrar desacordo entre métodos analíticos. Isto aparece quando vários laboratórios analisam uma amostra em comum em estudos colaborativos. Frequentemente altas variações são observadas entre os resultados. Assim, os dados provenientes de apenas um laboratório não são suficientes para avaliar o método. Estudos colaborativos são indispensáveis para avaliação da reprodutibilidade e também podem ser de grande ajuda para avaliar a exatidão do método.

1.8.4. Exatidão

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. É importante observar que o valor exato ou verdadeiro é o valor obtido por uma medição perfeita e este valor é indeterminado por natureza. Os processos utilizados para avaliar a exatidão de um método são: uso de materiais de referência, comparação de métodos, utilização de ensaios de recuperação e o método de adição de padrão. Todos estes procedimentos devem ser acompanhados de testes estatísticos para garantir a exatidão^{79,87}.

1.8.5. Limite de detecção (LD)

O limite de detecção representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada com um certo limite de confiabilidade utilizando um determinado procedimento experimental.

O LD pode ser expresso de três maneiras diferentes: através do método visual, pela relação sinal-ruído de 3:1 e através do método baseado em parâmetros da curva analítica ⁸⁵.

1.8.6. Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser quantificada com um certo limite de confiabilidade utilizando um determinado procedimento experimental.

Como o LD, o LQ é expresso como uma concentração, sendo que a precisão e exatidão das determinações também devem ser registradas. Esse critério é uma boa regra a ser seguida, porém não se deve esquecer que a determinação do LQ representa um compromisso entre a concentração e a precisão e exatidão exigidas. Isto significa que, quando decresce o nível de concentração do LQ, a medida torna-se menos precisa. Se houver a necessidade de uma maior precisão, uma concentração maior deve ser registrada para o LQ. O método analítico e seu respectivo uso ditam esse compromisso.

Os mesmos critérios de LD podem ser adotados para o LQ, utilizando a relação 10:1 da razão sinal ruído. O LQ também pode ser calculado utilizando três vezes o valor de LD obtido pelo método visual e através do método baseado em parâmetros da curva analítica. Outro método também utilizado para o cálculo do LQ é o método da EURACHEM ⁸⁸, na qual se pré-estabelece um valor de coeficiente de variação, sendo que a concentração relativa a este valor será o limite de quantificação para o analito.

1.8.7. Robustez

De acordo com o INMETRO a robustez de um método mede a sensibilidade que este apresenta face à pequenas variações. Diz-se que um método é robusto quando ele não é afetado por uma pequena e deliberada modificação em seus parâmetros. A robustez de um método cromatográfico é avaliada, por exemplo, pela variação de parâmetros como a concentração do solvente orgânico, pH e força iônica da fase móvel em HPLC, e rampa de programação da temperatura e natureza do gás de arraste em GC, bem como o tempo de extração, agitação, etc. As mudanças introduzidas refletem as alterações que podem ocorrer quando um método é transferido para outros laboratórios, analistas ou equipamentos. Para determinar a robustez de um método para várias modificações, o INMETRO recomenda o teste de Youden^{81,89}. Trata-se de um teste que permite não só avaliar se uma pequena e deliberada modificação no método pode refletir em uma diferença estatisticamente significativa, como também ordenar se uma ou a combinação das influências podem causar diferenças significativas nos resultados finais. Por este método são realizados oito ensaios separadamente para determinar quais os efeitos das diferentes etapas no procedimento analítico que afetam o resultado. As oito medições devem ser realizadas em ordem aleatória.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo a obtenção de padrões de isoflavonas de soja por cromatografia líquida preparativa e a aplicação destes como padrões na validação de um método analítico.

2.2. Objetivos específicos

- Desenvolvimento e validação de um método analítico para separação e quantificação de isoflavonas em extrato seco de soja.
- Transferência do método de análise das isoflavonas da escala analítica para escala preparativa, através da transposição direta.
- Produção de padrões de isoflavonas agliconas e glicosídicas, a partir do extrato seco de soja padronizado.
- Caracterização dos padrões obtidos pelas técnicas de ressonância magnética nuclear, espectrometria de massas e espectrofotometria no ultravioleta e visível.
- Desenvolvimento e validação de um método analítico para a quantificação de isoflavonas agliconas em grãos de soja transgênica e não-transgênica, utilizando os padrões obtidos.

3. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA SEPARAÇÃO DE ISOFLAVONAS EM EXTRATO SECO DE SOJA

Foi desenvolvido um método analítico por HPLC para a separação e a quantificação de isoflavonas presentes em extrato seco de soja.

Este método foi desenvolvido com o intuito de preservar tanto as isoflavonas na forma glicosídica quanto as isoflavonas na forma aglicona presentes no extrato seco, a fim de confirmar os teores de cada uma das isoflavonas individualmente. Este método foi utilizado posteriormente para a transposição na escala preparativa.

Para a validação do método desenvolvido, foram avaliados os parâmetros seletividade, precisão, exatidão, linearidade e faixa de trabalho, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e robustez e estabelecidos critérios de aceitabilidade para cada parâmetro⁸⁰.

3.1. Materiais e métodos

3.1.1. Equipamento analítico

O sistema cromatográfico analítico utilizado no desenvolvimento da separação e na validação foi um cromatógrafo Merck Hitachi LaChrom, composto de uma bomba quaternária L-7100, um injetor automático L-7250, um detector UV-Vis com varredura espectral L-7455 e um módulo de aquecimento de colunas L-7300. O software Merck HSM, versão 4.1, foi usado no tratamento dos dados. A coluna usada foi a Nova-Pak C-18 (150 mm x 3,9 mm d.i.), com partículas de 4 µm, Waters. A coluna foi mantida na temperatura de 35 °C. A fase móvel foi um gradiente de água acidificada com 0,1 % ácido acético glacial,

pH 3,5 (Solução A) e acetonitrila acidificada com 0,1 % ácido acético glacial (Solução B). A programação do gradiente da fase móvel foi otimizada como: 14 % of B por 8 min; 14 % até 21 % B em 4 min; 21 % de B por 3 min; 21 % até 29 % B em 5 min; 29 % para 40 % B em 3 min; 40 % até 50 % B em 2 min; 50 % de B por 5 min; 50 % até 14 % B em 5 min; 14 % B por 3 min. O volume de injeção foi de 10 μ L e o sistema de detecção utilizado foi UV-vis com varredura espectral de 200 a 400 nm, monitorado em 254 nm. A vazão da fase móvel foi mantida constante durante a análise em 1,0 mL min⁻¹.

3.1.2. Reagentes e padrões utilizados

Os padrões de referência de isoflavonas utilizados foram: daidzeína 99,9 %, gliciteína 96,3 %, genisteína 99,6 % (isoflavonas na forma aglicona), daidzina 99,2 %, glicitina 87,4 % e genistina 98,2 % (isoflavonas na forma glicosídica) obtidos da Chromadex, certificados internacionalmente pela USP (United States Pharmacopeia) e FDA (Food and Drug Administration).

Todos os reagentes utilizados foram grau P.A. e os solventes grau cromatográfico. A água utilizada foi ultra-purificada pelo equipamento Milli-Q modelo gradiente A-10 da Millipore.

3.1.3. Amostras de extrato seco de soja

As amostras de extrato seco de soja, contendo 40 % (m/m) de isoflavonas, foram fornecidas pelo laboratório botânico Herbarium (Curitiba, Paraná) e em todo trabalho foi empregado o extrato seco proveniente de um mesmo lote.

Foram pesados 10 mg de amostra de extrato seco de soja em balão volumétrico de 100 mL e adicionado solução metanol:água (80:20 v/v), obtendo

concentração de 0,1 mg mL⁻¹. As amostras foram colocadas em banho ultrassônico por 20 minutos, agitadas vigorosamente e filtradas em membrana de 0,45 µm de porosidade. A seguir as amostras foram injetadas no sistema cromatográfico utilizando as condições cromatográficas otimizadas.

3.2. Validação do método

3.2.1. Seletividade

Para avaliar e comprovar a seletividade na separação cromatográfica para cada uma das isoflavonas, foram preparadas soluções padrão contendo daidzina (4 µg mL⁻¹), glicitina (2 µg mL⁻¹), daidzeína (7,5 µg mL⁻¹) e genisteína (30 µg mL⁻¹) em solução metanol : água (80:20 v/v). A solução da amostra de extrato seco de soja foi preparada na concentração de 1 mg mL⁻¹, fortificada com os padrões. Os cromatogramas obtidos dos padrões e da amostra fortificada foram comparados pelo tempo de retenção de cada composto. Também foram monitorados os espectros na faixa de 200 a 400 nm, tanto dos padrões quanto da amostra, para avaliar a pureza espectral de todos os compostos a fim de confirmar a seletividade do método na separação das isoflavonas frente aos interferentes do extrato.

3.2.2. Linearidade e faixa de aplicação

A linearidade foi verificada primeiramente pelo coeficiente de correlação linear, *r*, resultante da linha de regressão de cinco concentrações diferentes, para cada composto, individualmente. As concentrações utilizadas foram: 1, 2, 4, 10 e

15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para daidzina; 1, 1,5, 2, 4 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para glicitina; 1, 5, 7,5, 10 e 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para daidzeína; e 10, 20, 30, 40 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para genisteína, dissolvidos em solução metanol:água (80:20 v/v).

A linearidade foi confirmada pelo método do gráfico de linearidade⁸³⁻⁸⁴. Este método consiste na construção de um outro gráfico, relacionando a área por concentração (eixo y) e log da concentração (eixo x). Estabeleceu-se o coeficiente angular como a reta central (paralela ao eixo x) do gráfico e definiu-se como 15 % acima e 15 % abaixo deste valor, o intervalo de confiabilidade, para confirmar a linearidade dos pontos no intervalo de concentração⁸².

3.2.3. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados através do método baseado em parâmetros da curva analítica^{82,85}, conforme as equações 8 e 9 abaixo.

$$\text{LD} = 3,3 \times \frac{s}{S} \quad (\text{equação 8})$$

$$\text{LQ} = 10 \times \frac{s}{S} \quad (\text{equação 9})$$

onde: s = estimativa do desvio padrão do coeficiente linear da equação e S = inclinação ou coeficiente angular da curva analítica.

Posteriormente foram injetadas soluções nas concentrações determinadas para confirmação visual dos picos de cada um dos compostos.

3.2.4. Precisão

Foram preparadas 8 (oito) soluções da amostra de extrato seco de soja padronizado, na concentração de 1 mg mL^{-1} em solução metanol:água (80:20 v/v), deixados por 20 minutos em banho ultrassom e realizaram-se 3 (três) injeções de cada uma destas soluções. A dispersão de resultados repetidos da mesma amostra, para cada isoflavona, foi avaliada conforme a norma ISO 5725⁸⁶, que orienta sobre o cálculo da precisão de resultados num método para um nível de confiança de 95 % e infinitos graus de liberdade.

Foram calculadas e expressas as médias, as estimativas de desvio padrão, os coeficientes de variação e o limite de repetitividade em termos relativo e absoluto, para cada isoflavona.

Para o cálculo do limite de repetitividade (r') da precisão^{81,86}, utilizou-se a equação 10 e aplicou-a para cada isoflavona individualmente:

$$r' = 2,8 \times s_r \quad \text{(equação 10)}$$

onde: s_r = estimativa do desvio padrão relativo da concentração das 8 (oito) soluções amostra preparadas.

O limite de repetitividade encontrado deve ser menor que 5 % para cada uma das isoflavonas presentes no extrato seco.

3.2.5. Exatidão

Como não havia material de referência certificado (CRM) de extrato seco de soja para comparação, foram empregadas amostras de extrato seco adicionadas com quantidades conhecidas dos padrões de isoflavonas dissolvidos

em solução metanol:água (80:20 v/v). As concentrações empregadas foram: 2, 4 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para daidzina; 1,5, 2 e 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para glicitina; 5, 7,5 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para daidzeína e 20, 30 e 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para genisteína. Desta maneira, a exatidão foi avaliada pela recuperação (R) em triplicata, em cada nível de concentração e os resultados foram expressos em porcentagem, conforme equação 11.

$$R (\%) = \frac{\text{média do valor obtido}}{\text{média do valor adicionado}} \times 100 \quad (\text{equação 11})$$

Pelos resultados obtidos na recuperação foi aplicado teste t_s de Student⁸⁷, no qual foi feita a comparação da média experimental (\bar{x}), valor obtido pela média aritmética de nove resultados experimentais em termos de porcentagem, com o valor verdadeiro ($\mu = 100 \%$), valor obtido pela quantidade adicionada, conforme a equação 12:

$$t_s = (\bar{x} - \mu) \sqrt{n} / s \quad (\text{equação 12})$$

Os resultados calculados para t_s foram comparados com os valores t_s tabelados para 95 % de confiabilidade.

3.2.6. Robustez

Verificou-se a robustez do método para determinação de isoflavonas em extrato seco de soja por cromatografia líquida de alta eficiência, aplicando o teste de Youden^{81,89}.

As variações deliberadas no método foram a concentração de solvente orgânico para extração, o tempo de extração em ultrassom e a temperatura da solução durante a extração.

Realizaram-se 8 (oito) ensaios separados para determinar os efeitos da variação dos parâmetros no método, como indica a tabela 1. Os fatores nominais do método são representados pelo sinal (+) e as respectivas variações testadas são representadas pelo sinal (-). O resultado de cada ensaio em porcentagem de recuperação do composto foi representado com letra.

Tabela 1: Combinação ensaiada para avaliação da robustez para cada isoflavona.

FATOR	COMBINAÇÃO ENSAIADA							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1) Concentração MeOH:H ₂ O (v/v)	80:20 (+)	80:20 (+)	80:20 (+)	80:20 (+)	82:18 (-)	82:18 (-)	82:18 (-)	82:18 (-)
2) Tempo de ultrassom (minutos)	20' (+)	20' (+)	10' (-)	10' (-)	20' (+)	20' (+)	10' (-)	10' (-)
3) Temperatura (°C)	55 °C (+)	50 °C (-)	55 °C (+)	50 °C (-)	55 °C (+)	50 °C (-)	55 °C (+)	55 °C (-)
Letras para identificação dos resultados	a	b	c	d	e	f	g	h

A partir dos resultados obtidos nos oito ensaios, o efeito de cada um dos parâmetros foi calculado conforme equações 13, 14 e 15.

$$\text{Efeito concentração metanol:água} = \frac{a + b + c + d}{4} - \frac{e + f + g + h}{4} \quad (\text{equação 13})$$

$$\text{Efeito tempo de ultrassom} = \frac{a+b+e+f}{4} - \frac{c+d+g+h}{4} \quad (\text{equação 14})$$

$$\text{Efeito temperatura} = \frac{a+c+e+g}{4} - \frac{b+d+f+h}{4} \quad (\text{equação 15})$$

Este cálculo indica se houve ou não efeito significativo nos fatores, para um critério de significância de duas vezes o CV em relação ao resultado da precisão do método para todos os efeitos calculados, para cada uma das isoflavonas. Os resultados destas variações foram comparados com os resultados da precisão do método.

3.3. Resultados e discussão

Várias condições cromatográficas foram avaliadas até a obtenção da melhor separação das isoflavonas agliconas e glicosídicas. As variações foram feitas na composição da fase móvel, iniciando as separações com metanol e água acidificada no modo gradiente e posteriormente modificando para acetonitrila e água acidificada. A fase móvel contendo o metanol como modificador orgânico deixava os picos muito largos e, por este motivo, foi substituída pela acetonitrila. A figura 4 mostra a melhor condição cromatográfica obtida para uma separação dos padrões de isoflavonas de soja.

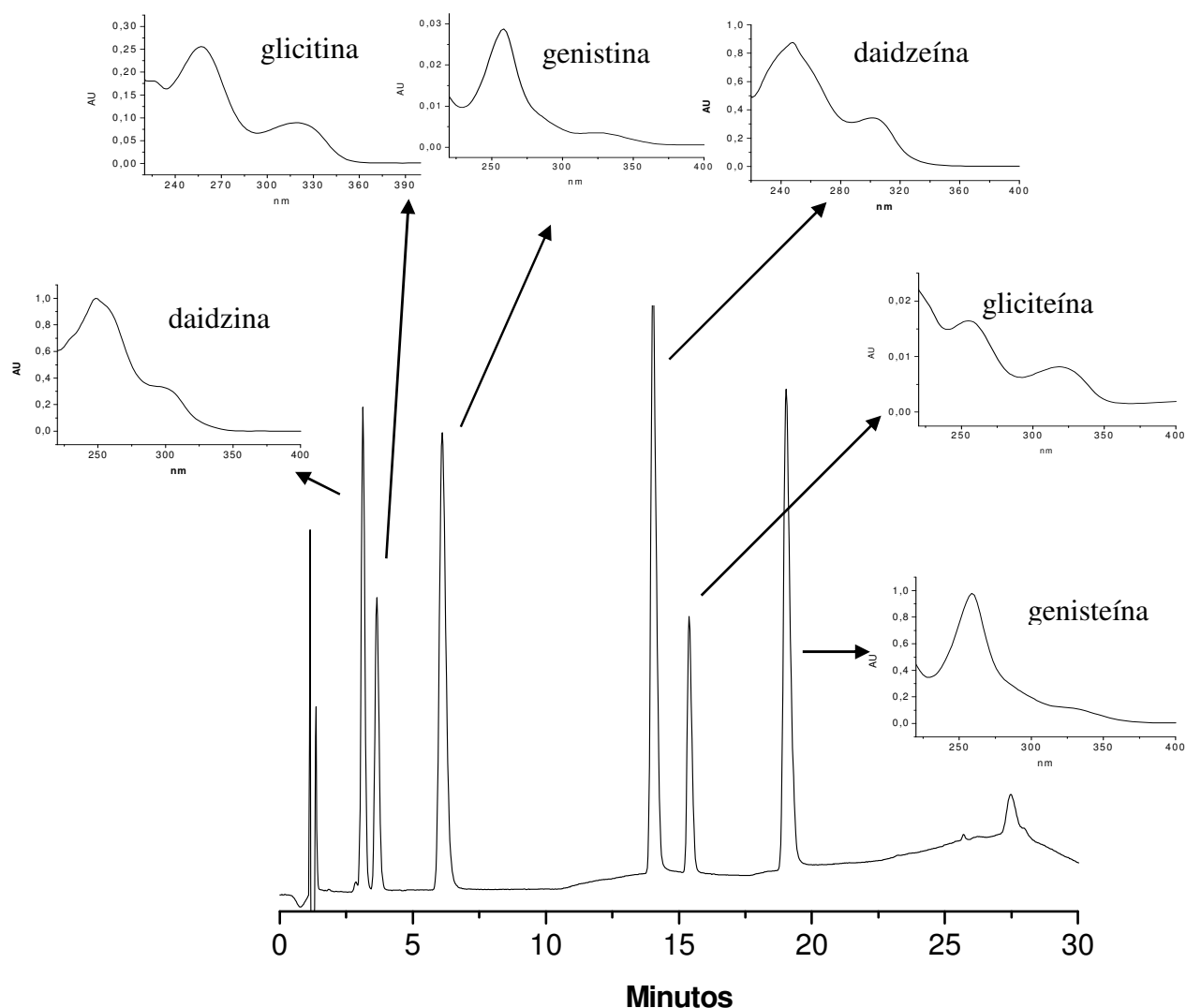


Figura 4: Separação cromatográfica da mistura de padrões de isoflavonas com os espectros de cada isoflavona obtido com o detector de arranjo de diodos.

Condições cromatográficas: Coluna analítica: Nova Pak Waters (150 x 3,9 mm) C-18, partículas esféricas de 4 μm ; Fase móvel: água + 0,1% ácido acético glacial, pH 3,5 (A); acetonitrila + 0,1 % ácido acético glacial (B). Programa de gradiente: 21 % de B por 8 min; 21 % até 27 % B em 4 min; 27 % de B por 3 min; 27 % até 31 % B em 5 min; 31 % para 40 % B em 3 min; 40 % até 50 % B em 2 min; 50 % de B por 5 min; 50 % até 21 % B em 5 min; 21 % B por 3 min. Volume de injeção: 10 μL . Concentração das isoflavonas: 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Detecção: UV-vis com varredura espectral de 200 a 400 nm, monitorado em 254 nm. Vazão: 1,0 mL min^{-1} . Temperatura da coluna: 35 $^{\circ}\text{C}$.

Estas condições cromatográficas de separação foram utilizadas durante toda validação do método, na determinação dos teores de isoflavonas em extrato seco de soja e na transposição de escala. Como no lote de extrato seco de soja analisado continha somente 4 isoflavonas, duas na forma aglicona (daidzina, glicitina) e duas na forma glicosídica (daidzeína e genisteína), os resultados da validação são apresentados somente para estes compostos.

3.3.1. Parâmetros da validação

Após obter a melhor separação para as isoflavonas presentes no extrato seco de soja, o método de análise foi validado e os teores de isoflavona foram calculados para as formas encontradas no extrato seco.

3.3.1.1. *Seletividade*

A seletividade foi confirmada pelo tempo de retenção dos compostos e pela comparação e pureza espectral, numa faixa de concentração similar entre os padrões de isoflavonas e as amostras de extrato seco fortificadas com os padrões de isoflavonas.

Na figura 4 pode-se observar a separação cromatográfica dos padrões de 6 isoflavonas. Os seus respectivos espectros compreendidos entre 200 e 400 nm foram armazenados na biblioteca espectral do equipamento para comparação com os espectros obtidos nas amostras.

Após o ajuste das condições cromatográficas, a figura 5 mostra um cromatograma de uma amostra de extrato seco contendo as isoflavonas: daidzina, glicitina, daidzeína e genisteína. As identidades das isoflavonas encontradas foram confirmadas pela pureza espectral e superposição dos espectros dos

padrões armazenados na biblioteca espectral e não indicaram coeluição de impurezas nos tempos de eluição das isoflavonas.

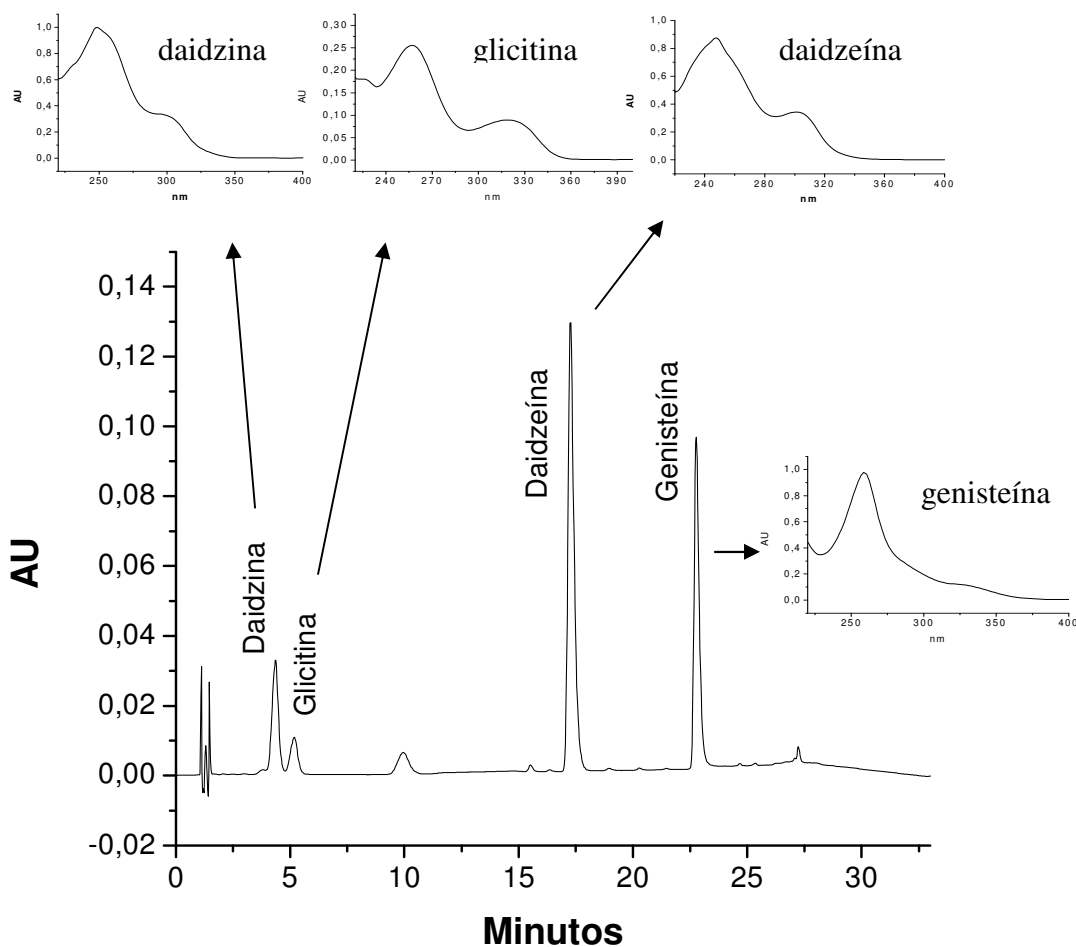


Figura 5: Cromatograma da amostra de extrato seco de soja com os respectivos espectros dos padrões de cada isoflavona, obtidos com o detector por arranjo de diodos.

Condições cromatográficas: Coluna analítica: Nova Pak Waters (150 x 3,9 mm) C-18, partículas esféricas de 4 μm ; Fase móvel: água + 0,1% ácido acético glacial, pH 3,5 (A); acetonitrila + 0,1 % ácido acético glacial (B). Programa de gradiente: 14 % de B por 8 min; 14 % até 21 % B em 4 min; 21 % de B por 3 min; 21 % até 29 % B em 5 min; 29 % para 40 % B em 3 min; 40 % até 50 % B em 2 min; 50 % de B por 5 min; 50 % até 14 % B em 5 min; 14 % B por 3 min. Volume de injeção: 10 μL . Concentração das isoflavonas: 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Detecção: UV-vis com varredura espectral de 200 a 400 nm, monitorado em 254 nm. Vazão: 1,0 mL min^{-1} . Temperatura da coluna: 35 $^{\circ}\text{C}$.

No tempo de retenção de dez minutos aparece um composto com espectro similar ao da daidzeína, porém devido a indisponibilidade de padrões de outras isoflavonas, não foi possível confirmar a identidade nem a quantidade do composto.

3.3.1.2. *Linearidade e faixa de aplicação*

Na construção da curva analítica observou-se que não houve interferência da matriz na quantificação das isoflavonas na faixa de concentração estudada, devido aos coeficientes angulares serem similares entre a curva analítica somente com o padrão dissolvido na fase móvel e a curva analítica na matriz, permitindo assim o uso dos padrões preparados em solução metanol:água (80:20 v/v).

As concentrações utilizadas nas curvas analíticas foram 1, 2, 4, 10 e 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para daidzina; 1, 1,5, 2, 4 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para glicitina; 1, 5, 7,5, 10 e 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para daidzeína; e 10, 20, 30, 40 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para genisteína, dissolvidos em solução metanol:água (80:20 v/v).

A curva analítica para a daidzina no intervalo de concentração de 1-15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ pode ser observada na figura 6(a) e o gráfico de linearidade apresentado na figura 6(b), o qual relaciona a área por concentração (eixo y) e log da concentração (eixo x). No gráfico de linearidade o coeficiente angular foi colocado como a reta central (paralela ao eixo x) e definiu-se 15% acima e 15% abaixo do valor desta reta como intervalo de confiança para confirmar a linearidade⁸³⁻⁸⁵ na faixa de concentração avaliada para a daidzina. Este gráfico permite visualizar como os pontos da curva analítica se comportam nesta faixa de concentração. Como nenhum ponto ficou fora do intervalo de confiança, esta faixa de concentração foi definida como intervalo linear.

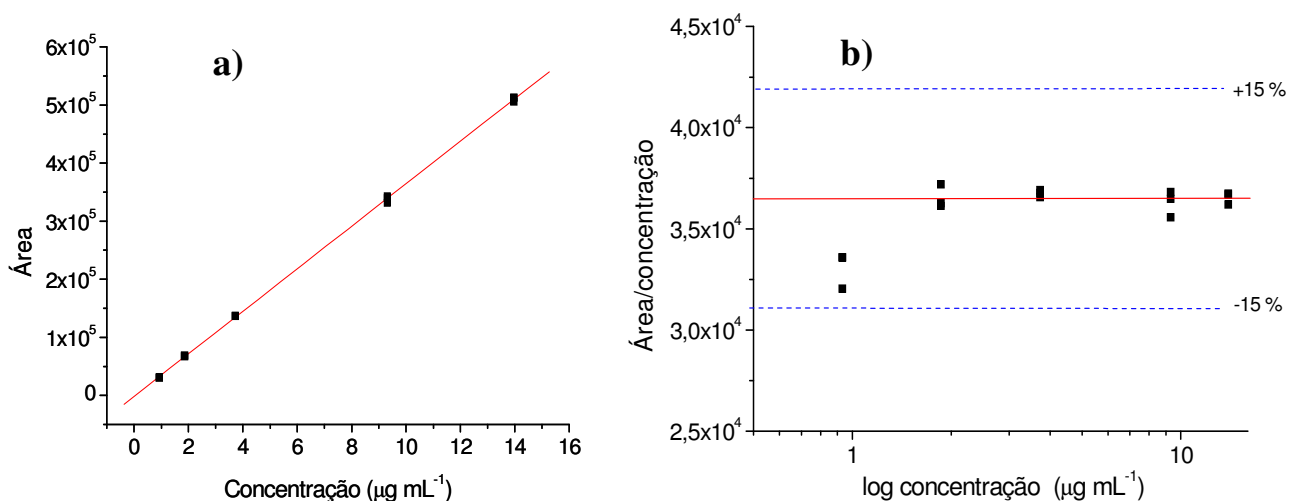


Figura 6: Curva analítica da daidzina (a) no intervalo de concentração de 1-15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e gráfico de linearidade (b).

A curva analítica para a glicitina no intervalo de concentração de 1-10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ pode ser observada na figura 7 (a). A figura 7 (b) é o gráfico de linearidade da glicitina. Como nenhum ponto ficou fora do intervalo de confiança, esta faixa de concentração foi definida como o intervalo linear.

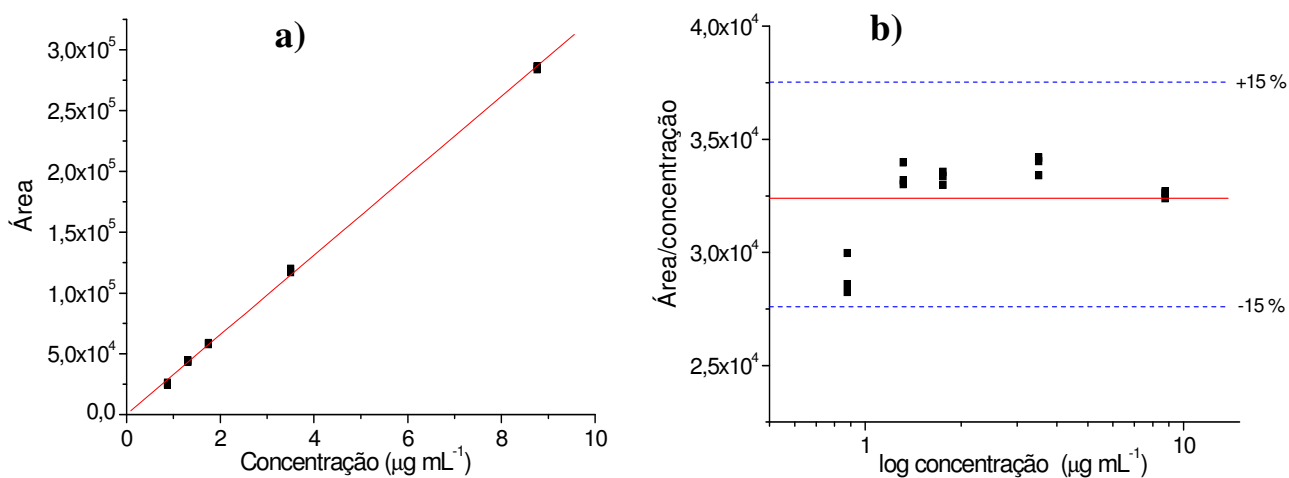


Figura 7: Curva analítica da glicitina (a) no intervalo de concentração de 1-10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e gráfico de linearidade (b).

As figuras 8 e 9 mostram as curvas analíticas e os gráficos de linearidade para a daidzeína e a genisteína, respectivamente.

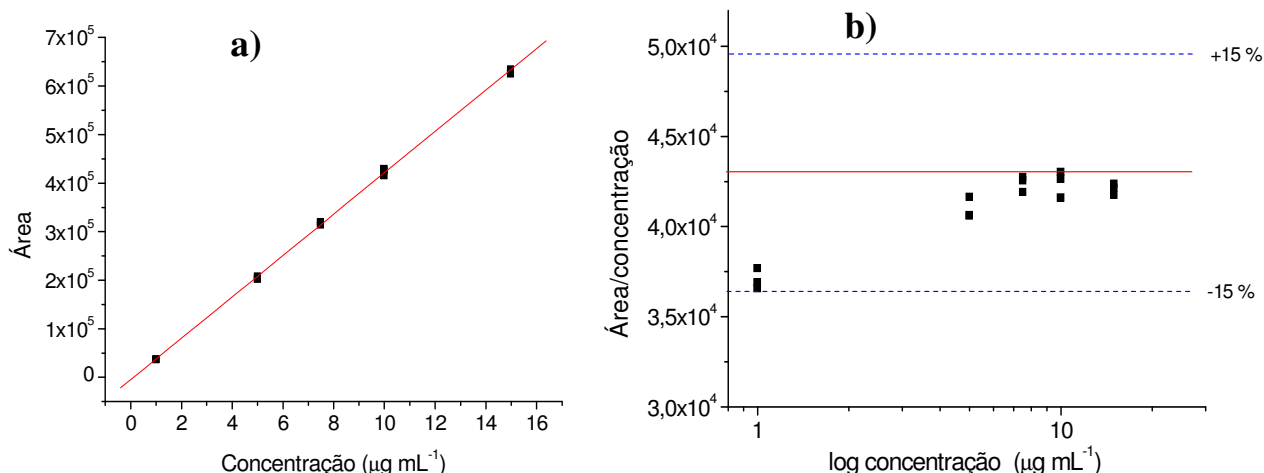


Figura 8: Curva analítica da daidzeína (a) no intervalo de concentração de 1-15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e gráfico de linearidade (b).

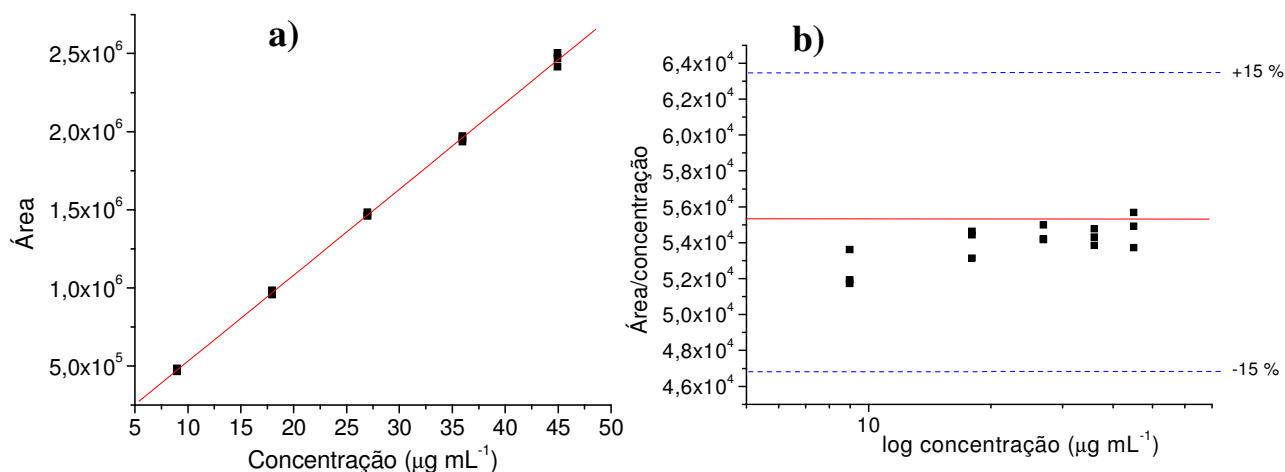


Figura 9: Curva analítica da genisteína (a) no intervalo de concentração de 10-50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e gráfico de linearidade (b).

Os parâmetros das curvas analíticas para as isoflavonas estão apresentados na tabela 2. Pode-se observar que todas as curvas analíticas apresentaram coeficientes de correlação maiores que 0,99. Cabe salientar aqui que somente um

coeficiente de correlação próximo da unidade não assegura a linearidade da curva, por isso utilizou-se o gráfico da linearidade. Este gráfico é muito similar ao gráfico de resíduos da curva e mostra visualmente se os pontos estão dentro do intervalo linear determinado.

Tabela 2: Parâmetros das curvas analíticas para cada isoflavona.

	Faixa de aplicação $\mu\text{g mL}^{-1}$	Coeficiente de correlação r	Coeficiente angular	Coeficiente linear	Desvio padrão do coeficiente linear	Desvio padrão da linha de regressão
Daidzina	1 – 10	0,9998	36595	-1299	1352	3347
Glicitina	1 – 15	0,9996	32673	405	1091	2818
Daidzeína	1 – 10	0,9997	42670	-4840	2440	4930
Genisteína	10 – 50	0,9996	55189	-23243	12734	21029

3.3.1.3. *Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)*

Para o cálculo de LD e de LQ foram utilizados os parâmetros das curvas analíticas, de acordo com as equações 8 e 9.

Os valores de LD e LQ do instrumento foram calculados para concentrações de massa por volume de solução ($\mu\text{g/mL}$). Para o cálculo dos limites do método foi obtida a relação entre a concentração do padrão na solução com a concentração da amostra (0,1 mg/mL). Considerando que o mesmo volume foi utilizado nas soluções dos padrões e da amostra, os valores dos limites são os mesmos ($\mu\text{g}/0,1\text{mg}$ ou g/100g) para a relação massa-massa.

A tabela 3 apresenta os valores de LD e de LQ do instrumento e do método para cada isoflavona contida no extrato seco, calculados a partir dos parâmetros da curva.

Tabela 3: Valores de LD e LQ do instrumento e do método, determinados pelo método baseado nos parâmetros da curva analítica.

Isoflavonas	LD do instrumento ($\mu\text{g/mL}$)	LQ do instrumento ($\mu\text{g/mL}$)	LD do método (g/100g)	LQ do método (g/100g)
Daidzina	0,1	0,4	0,1	0,4
Daidzeína	0,2	0,6	0,2	0,6
Glicitina	0,1	0,3	0,1	0,3
Genisteína	0,1	0,3	0,1	0,3

Os valores de LQ foram também confirmados visualmente no cromatograma, a partir da injeção de soluções de isoflavonas nas concentrações obtidas pelo método da curva analítica.

3.3.1.4. Precisão

As concentrações de isoflavonas presentes no extrato seco foram avaliadas em oito amostras de um mesmo lote e as médias, as estimativas dos desvios padrões, os coeficientes de variação e os limites de repetitividade foram calculados. Os resultados analíticos e estatísticos para cada isoflavona estão na tabela 4.

Tabela 4: Parâmetros de precisão no nível de repetitividade para os teores de isoflavonas contidas nas amostras de extrato seco de soja.

amostras (n=8)	Daidzina g/100g	Daidzeína g/100g	Glicitina g/100g	Genisteína g/100g
média, \bar{x}	7,9	24,4	3,2	10,5
Estimativa do desvio padrão s_r	0,1	0,2	0,1	0,1
Coeficiente de variação CV (%)	1,4	1,0	1,5	1,3
Limite de repetitividade r'	0,3	0,7	0,1	0,4
Limite de repetitividade r'_{CV} (%)	3,9	2,7	4,1	3,7

A partir da estimativa do desvio padrão, pode-se calcular o limite de repetitividade (r') que permite ao analista decidir se a diferença entre análises realizadas em duplicatas de uma amostra, determinada sob condições de repetitividade, é significativa ⁸¹. Os valores do limite repetitividade permitem a avaliação de amostras rotineiras e a verificação de diferenças significativas num nível de 95 % de confiabilidade.

O método demonstrou ser preciso para uma distribuição normal de t_s de *Student*, de acordo com os parâmetros apresentados na tabela 4. Os valores de r' indicam que, em análises rotineiras realizadas em duplicatas de amostras, a amplitude entre os resultados não poderá ser maior que este valor, para que o processo analítico esteja sob controle.

As variações apresentadas entre os resultados para cada isoflavona, apresentaram uma variação inferior a 5%, conforme determinação da ANVISA ⁸² para precisão de um método, indicando uma precisão adequada ao método.

3.3.1.5. Exatidão

A tabela 5 apresenta os valores de recuperação (equação 11) e os valores calculados para t_s de *Student*, conforme equação 12. O critério para verificar a exatidão do método foi a comparação entre o valor determinado experimentalmente (equação 12) e o valor tabelado para o t_s de *Student* para nove determinações feitas no mesmo dia e dentro de um intervalo curto de tempo utilizando resultados de recuperação.

Tabela 5: Valores da recuperação das isoflavonas, do CV e do teste t_s de Student.

	Daidzina	Daidzeína	Glicitina	Genisteína
Recuperação (n=9) (%)	100,9	100,1	100,7	98,9
Coeficiente de variação, CV (%)	1,5	1,6	1,5	1,6
t_s calculado	1,8	0,2	1,2	2,0
t_s tabelado (95%)	2,262	2,262	2,262	2,262

Os valores calculados para t_s de Student são menores que os valores tabelados, demonstrando que o método apresenta exatidão dentro de um intervalo de confiança de 95%.

3.3.1.6. Robustez

A robustez foi avaliada pelo teste de Youden^{81,89}. Os parâmetros avaliados foram a concentração de metanol na extração, o tempo em que as amostras foram deixadas em banho ultrassom e a temperatura durante a extração.

Foram realizados oito ensaios conforme a combinação dos parâmetros indicada na tabela 1.

Os resultados, em termos de porcentagem recuperada, de cada uma das isoflavonas, em cada um dos ensaios, pode ser visto na tabela 6 e os CV (%) resultantes de cada um dos ensaios calculados pelas equações 13-15 estão na tabela 7. Os valores dos efeitos formam comparados com os valores de CV encontrados na precisão do método (tabela 4), sendo que os efeitos devem apresentar valores menores que duas vezes os valores de CV para não mostrarem efeito significativo na precisão do método.

Tabela 6: Resultados expressos em % de recuperação das combinações ensaiadas na avaliação da robustez para cada isoflavona.

Isoflavonas	COMBINAÇÃO ENSAIADA							
	a	b	c	d	e	f	g	h
Daidzina	100,7	99,7	98,9	98,8	98,8	98,8	99,1	100,7
Glicitina	100,3	99,2	100,1	100,2	99,9	99,1	100,2	100,1
Daidzeína	100,1	99,5	99,8	99,1	100,2	100,5	100,1	98,9
Genisteína	99,4	100,2	100,4	100,1	99,9	99,6	99,6	99,8

Tabela 7: Comparação entre os efeitos avaliados no teste de Youden com a precisão do método.

	CV do método (%)*	Efeito dos parâmetros		
		Concentração de MeOH	Tempo ultrassom	Temperatura
Daidzina	1,4	1,4	0,5	1,4
Glicitina	1,5	1,5	2,1	1,5
Daidzeína	1,0	1,0	2,4	1,0
Genisteína	1,3	1,3	0,8	1,3

* Valores obtidos na avaliação da precisão do método (tabela 4)

Como os efeitos estudados não apresentaram valores maiores que dois CV, nenhum dos parâmetros avaliados mostrou efeito significativo, indicando que o método pode ser considerado robusto frente a estas variações experimentais.

3.3.2. Determinação dos teores de isoflavonas no extrato seco de soja

O método validado foi utilizada para determinação dos teores de cada uma das isoflavonas presentes no lote de extrato seco utilizado neste estudo. Os resultados e a incerteza associada, calculados pelo intervalo de confiança ⁸⁷, estão descritos na tabela 8. A partir destes resultados foi possível calcular a carga

de amostra permitida na separação em escala preparativa e, conseqüentemente, prever qual a quantidade máxima das isoflavonas (rendimento) que poderia ser obtida no sistema preparativo.

Tabela 8: Teores de isoflavonas presentes no extrato seco de soja padronizado.

Isoflavona	g/100 g	Incerteza
Daidzeína	24,4	$\pm 0,2$
Daidzina	7,9	$\pm 0,1$
Glicitina	3,2	$\pm 0,1$
Genisteína	10,5	$\pm 0,1$

3.4. Conclusões parciais

Os teores e a composição de isoflavonas em extratos secos podem variar consideravelmente dependendo do lote e do fornecedor. Normalmente estes extratos, encontrados comercialmente, são padronizados para conter um total de 40 % (m/m) de isoflavonas. No entanto, os teores individuais de isoflavonas não são controlados e podem variar devido a uma série de influências como as condições climáticas, a variedade da soja, o período da colheita e a localização geográfica⁹⁰.

Nesta etapa do trabalho foi desenvolvida e validada um método para determinação e quantificação de isoflavonas agliconas e glicosídicas presentes em extrato seco de soja.

A partir dos teores de isoflavonas determinados no extrato seco, será possível calcular a carga de amostra a ser utilizada na cromatografia preparativa e utilizar o método como base para transposição da escala analítica para preparativa.

4. TRANSPOSIÇÃO DA ESCALA ANALÍTICA PARA ESCALA PREPARATIVA

A transposição de escala só pode ser realizada depois de estabelecidas as condições ótimas de seletividade e de rendimento para a separação. A transposição direta de escala (também chamada de “linear”, ou “matemática direta”), tem as vantagens da simplicidade, por se basear em apenas um fator de cálculo a partir de um cromatograma e da similaridade gráfica com a escala analítica. Por isso a transposição direta é a mais empregada nas separações semi-preparativas de substâncias naturais.

Os parâmetros para o cálculo das isotermas de equilíbrio são os mais importantes para a exatidão dos cálculos pelos modelos. O tipo de isoterma de equilíbrio define o comportamento do perfil cromatográfico ⁹¹ para diferentes massas e volumes injetados numa escala preparativa ⁷³. Com a isoterma de equilíbrio pode-se prever com maior segurança as condições operacionais limites de representação do modelo proposto, como a concentração da amostra e o volume máximo do material, de modo que a isoterma de distribuição não se afaste do equilíbrio linear, e o perfil cromatográfico mantenha o comportamento linear.

Foram obtidas e avaliadas as isotermas das quatro isoflavonas isoladamente, e depois foi feita a transposição do método da escala analítica para preparativa para a obtenção dos padrões das isoflavonas presentes na amostra de extrato seco.

4.1. Materiais e métodos

4.1.1. Isotermas: carga ideal para manter o sistema linear

Foram obtidas as isotermas dos padrões, daidzina, daidzeína, glicitina e genisteína, no sistema cromatográfico analítico na faixa de massa de 50 – 500 μg . Os compostos foram dissolvidos individualmente na concentração de 5 mg mL^{-1} em solução metanol:água (80:20 v/v), para avaliar as isotermas visualmente. Após as injeções dos compostos, os cromatogramas obtidos foram sobrepostos em um gráfico a fim de verificar a distorção dos picos com o aumento da concentração e definir a carga ideal para ser injetada no sistema preparativo com resolução satisfatória entre os compostos.

4.1.2. Transposição direta

A transposição da escala analítica para a escala preparativa, para obtenção dos padrões de isoflavonas, foi feita iniciando-se com o modelo matemático de transposição direta mantendo o equilíbrio linear.

Depois de ajustadas a seletividade e a resolução na separação em escala analítica, em temperatura fixa, calculou-se o fator de transposição direta a partir da relação dos comprimentos e diâmetros das colunas entre a escala analítica e a escala preparativa, de acordo com a equação 16:

$$\text{Fator de transposição direta} = \frac{(\text{diam prep})^2}{(\text{diam analít})^2} \times \frac{\text{comp prep}}{\text{comp analit}} \quad \text{(Equação 16)}$$

onde: “diam prep” e “diam analít” referem-se aos diâmetros das colunas preparativas e das colunas analíticas e “comp prep” e “comp analít” aos comprimentos das colunas preparativas e analíticas, respectivamente.

Este fator foi utilizado para estimar a capacidade de carga do sistema preparativo em termos de massa e volume de amostra, ou seja, para estimar o volume de injeção e a concentração da amostra e otimizar o rendimento do processo.

Para encontrar a vazão no sistema preparativo (vazão prep), mantendo a velocidade linear da fase móvel similar à condição analítica, utilizou-se a equação 17, baseando-se nas condições estabelecidas no sistema analítico.

$$\text{vazão prep} = \frac{(\text{diam prep})^2}{(\text{diam analit})^2} \times \text{vazão analit} \quad \text{(Equação 17)}$$

onde: o termo “vazão analit” é a vazão otimizada na coluna analítica.

Para determinar o tempo de gradiente (t grad) no sistema preparativo, utilizou-se a equação 18.

$$t \text{ grad prep} = t \text{ grad analit} \times \frac{\text{comp prep}}{\text{comp analit}} \times \frac{(\text{diam prep})^2}{(\text{diam analit})^2} \times \frac{\text{vazão analit}}{\text{vazão prep}} \quad \text{(Equação 18)}$$

A partir da vazão e tempo de gradiente obtidos nas equações 17 e 18 iniciou-se o processo de separação na escala preparativa e estabeleceu-se as condições cromatográficas. A fase móvel empregada foi acetonitrila e água,

ambas contendo ácido acético glacial na concentração de 0,1 % (m/m). Foram necessários alguns ajustes nas condições de separação devido às diferenças entre as porcentagens de carbono nas fases estacionárias e as diferenças no recobrimento das partículas entre as colunas analítica e preparativa.

Para manter a velocidade linear também foram necessários alguns ajustes no programa do gradiente para a etapa de transposição, devido às diferenças entre os tamanhos e geometrias das partículas das duas colunas.

4.1.3. Amostras de extrato seco de soja

As amostras utilizadas de extrato seco de soja padronizado a 40 % (m/m) de isoflavonas foram provenientes de um mesmo lote e foram fornecidas pelo laboratório botânico Herbarium (Curitiba, Paraná).

Foi pesados 1 g de amostras de extrato seco de soja em balão volumétrico de 100 mL e adicionado solução metanol:água (80:20 v/v), obtendo concentração de 10 mg mL⁻¹. As amostras foram colocadas em banho ultra-sônico por 20 minutos, agitadas vigorosamente e filtradas em membrana de 0,45 µm de porosidade, antes de serem injetadas (5 mL) no sistema cromatográfico, utilizando as condições cromatográficas estimadas na transposição de escala.

4.1.4. Instrumentação

4.1.4.1. Sistema de cromatografia líquida preparativa

O sistema de cromatografia líquida preparativa utilizado na separação e purificação das isoflavonas foi um cromatógrafo Merck Knauer, composto de uma bomba ternária K-1800 com capacidade de bombeamento de até 100 mL

min⁻¹, um sistema de injeção por bombeamento programável K-120 para até 10 mL min⁻¹, um detector UV-Vis K-2501, um coletor de frações Vario-2000 e o software EZChrom Elite, versão 3.1.5, que foi usado para aquisição e tratamento dos dados. A separação e purificação das isoflavonas foram realizadas em uma coluna preparativa (25 x 250 mm) recheada no laboratório com sílica LiChrospher 100 RP-18, partículas de 12 µm.

O enchimento da coluna preparativa foi realizado pesando uma massa de 55 gramas de fase estacionária em um béquer e adicionando 200 mL de acetona. Esta mistura foi transferida para a coluna cromatográfica preparativa que era conectada a um sistema pneumático na parte inferior e aberta na parte superior. Através de sucção por vácuo, o solvente foi lentamente removido até que a coluna estivesse completamente recheada. A parte superior da coluna foi então conectada a um filtro e o sistema pressurizado por compressão axial até a pressão de 500 bar. A seguir, a coluna foi conectada no sistema preparativo, deixando passar uma fase móvel de metanol:água (80:20 v/v) a fim de condicionar a coluna cromatográfica.

A avaliação do enchimento foi feita através do cálculo de eficiência para a acetona e este cálculo foi obtido através do software EZChrom Elite, versão 3.1.5.

4.1.4.2. *Espectrometria de massas*

A caracterização das frações obtidas na separação cromatográfica foi realizada empregando um espectrômetro de massas com analisador triplo quadrupolo Applied Biosystem API 4000, com a fonte de ionização Turbo Ion Spray (ESI). A obtenção dos espectros de massas, tanto dos padrões como das amostras, foram obtidas por infusão direta, sendo que dois deles foram no modo

positivo (glicitina e daidzina) e dois no modo negativo (genisteína e daidzeína). As amostras e padrões de isoflavonas foram dissolvidos em solução metanol:água (80:20 v/v) na concentração de 0,1 mg mL⁻¹.

4.1.4.3. Ressonância magnética nuclear

As frações isoladas das isoflavonas também foram caracterizadas por ressonância magnética nuclear (NMR). O solvente utilizado foi dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d₆) e o sistema foi um equipamento Varian Gemini NMR, operando em 301 K e com 300 MHz para NMR de ¹H, com desacoplamento de prótons, e a 45 K e 45 MHz para NMR de ¹³C.

4.1.4.4. Determinação de água pelo método Karl Fisher

O sistema utilizado para determinação de água foi o sistema Karl Fisher volumétrico Tritoline KF da Schott Instruments. A solução titulante foi calibrada em 5 mg mL⁻¹ de H₂O e as amostras foram mantidas em frasco com tampa rosqueável em dessecador até o momento da análise.

4.1.5. Rendimento do processo

O volume de amostra previsto para injeção no sistema preparativo foi de 5 mL, o qual continha aproximadamente 50 mg de amostra de extrato seco, sendo que este continha 20 mg de isoflavonas. As quantidades teóricas de isoflavonas para um rendimento de 100 % no processo seriam de 3,9 mg de daidzina, 12,2 mg de daidzeína, 1,6 mg de glicitina e 5,3 mg de genisteína. Como poderiam ocorrer perdas durante o processo de fatiamento dos picos durante a coleta das

frações e durante a etapa de evaporação e liofilização, o rendimento real do processo foi calculado após obterem as massas das frações liofilizadas e pesadas.

4.2. Resultados e discussão

4.2.1. Carga ideal para manter o sistema linear

A otimização da separação deve ser feita previamente para qualquer transposição aplicada, pois devem ser selecionadas as condições cromatográficas e composições físicas das fases móvel e estacionária. Para conhecer a carga ideal a ser utilizada no sistema preparativo, foi obtido o perfil das isotermas de adsorção no sistema analítico empregando as condições cromatográficas de separação descritas no capítulo 3.

A figura 10 apresenta os cromatogramas obtidos para avaliar o comportamento de adsorção das isoflavonas no sistema analítico, segundo os critérios estabelecidos por Guiochon ⁶⁵, para uma concentração máxima mantendo o sistema linear e uma resolução satisfatória entre os compostos. Dois dos compostos isolados (glicitina e daidzeína) apresentaram comportamento linear até a massa de 400 µg, enquanto a daidzina e a genisteína apresentaram comportamento linear avaliadas pelo perfil, em toda a faixa estudada (50 – 500 µg).

A partir destes resultados cromatográficos, foi possível definir a isoterma de adsorção de cada composto e prever a carga ideal para utilização no sistema preparativo.

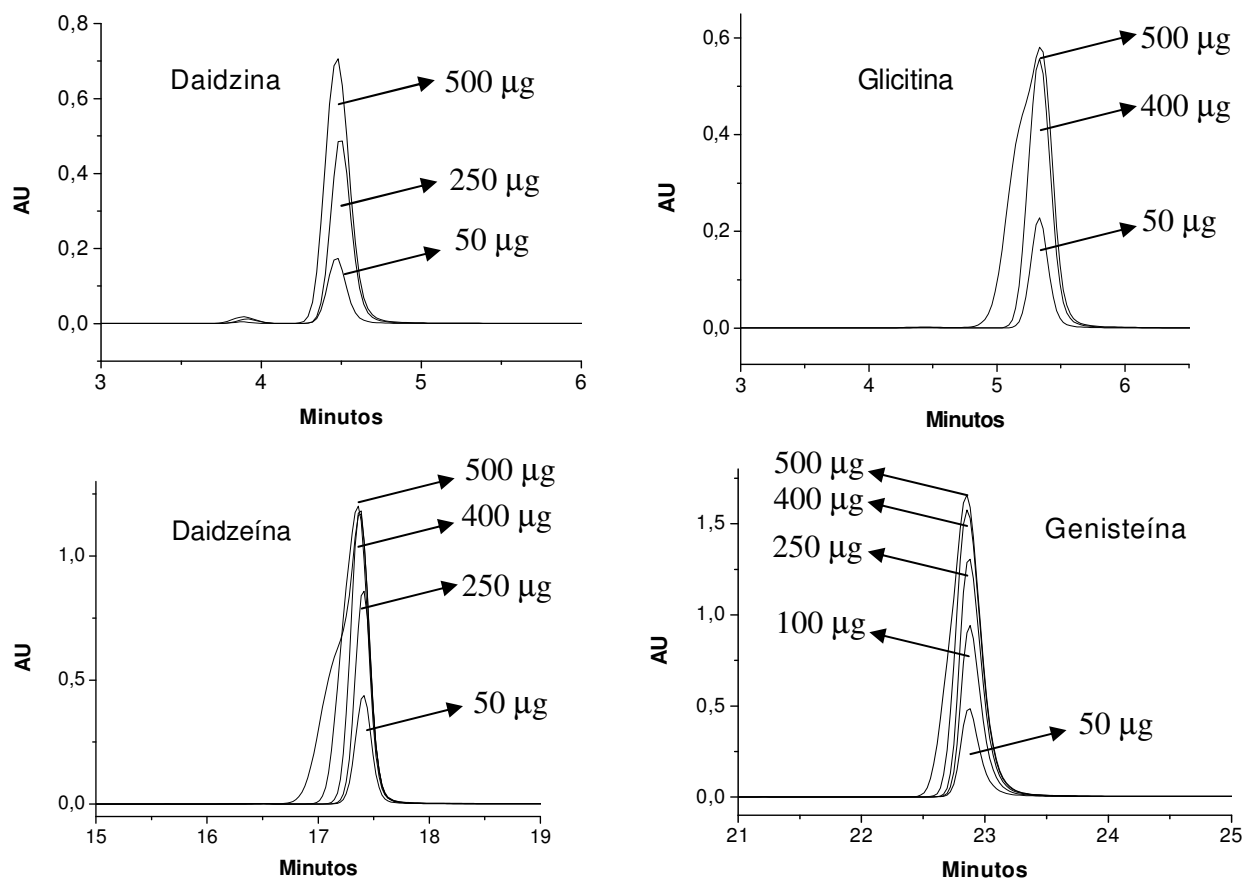


Figura 10: Cromatogramas das isoflavonas injetadas individualmente no sistema cromatográfico analítico nas concentrações de 50 a 500 µg. Condições cromatográficas similares à figura 5.

O volume de amostra previsto para injeção no sistema preparativo foi de 5 mL, contendo aproximadamente 50 mg de amostra de extrato seco com 20 mg de isoflavonas, para se obter uma resolução cromatográfica aceitável e uma eficiência adequada, no sistema preparativo.

A amostra de extrato seco de soja padronizado a 40 % (m/m) de isoflavonas não solubiliza em concentrações maiores que 10 mg mL⁻¹, sendo este um fator limitante no aumento do rendimento do processo. Pode-se observar na figura 10 que, com o aumento da concentração da daidzina e da glicitina, as caudas dos compostos começam a alargar podendo se sobrepor na mistura.

Portanto foi necessário estabelecer uma concentração limite de 20 mg de isoflavonas para obtenção de uma pureza e um rendimento razoáveis para utilizar no sistema preparativo.

Mesmo obtendo o perfil de isoterma de adsorção não-linear para estas duas isoflavonas, foi utilizado o modelo da transposição direta devido ao fato destes compostos serem resolvidos com o aumento da concentração até a faixa da concentração de 20 mg.

4.2.2. “Scale-up” - Transposição da escala analítica para uma escala preparativa

O fator da transposição direta para o sistema preparativo foi 68, conforme cálculo efetuado com a equação 16. Utilizando este fator para a massa máxima de 500 µg no sistema analítico, a carga máxima no sistema preparativo seria de 34 mg.

A vazão estimada para o sistema preparativo foi de 40 mL min⁻¹ e o tempo do programa de gradiente foi de 68 minutos, conforme as equações 17 e 18. Devido às diferenças entre os tipos de fase estacionária entre a coluna utilizada no sistema analítico e o sistema preparativo, foram feitos alguns ajustes no tempo do programa de gradiente. Assim o tempo do programa no sistema preparativo otimizado foi de 80 minutos.

O cromatograma obtido nas condições cromatográficas ajustadas para o sistema preparativo pode ser observado na figura 11. Praticamente não houve mudança entre o perfil das separações analítica e preparativa, comparando as figuras 5 e 11.

Os retângulos da figura 11 indicam as posições de início e fim das respectivas coleções do eluente durante as corridas preparativas.

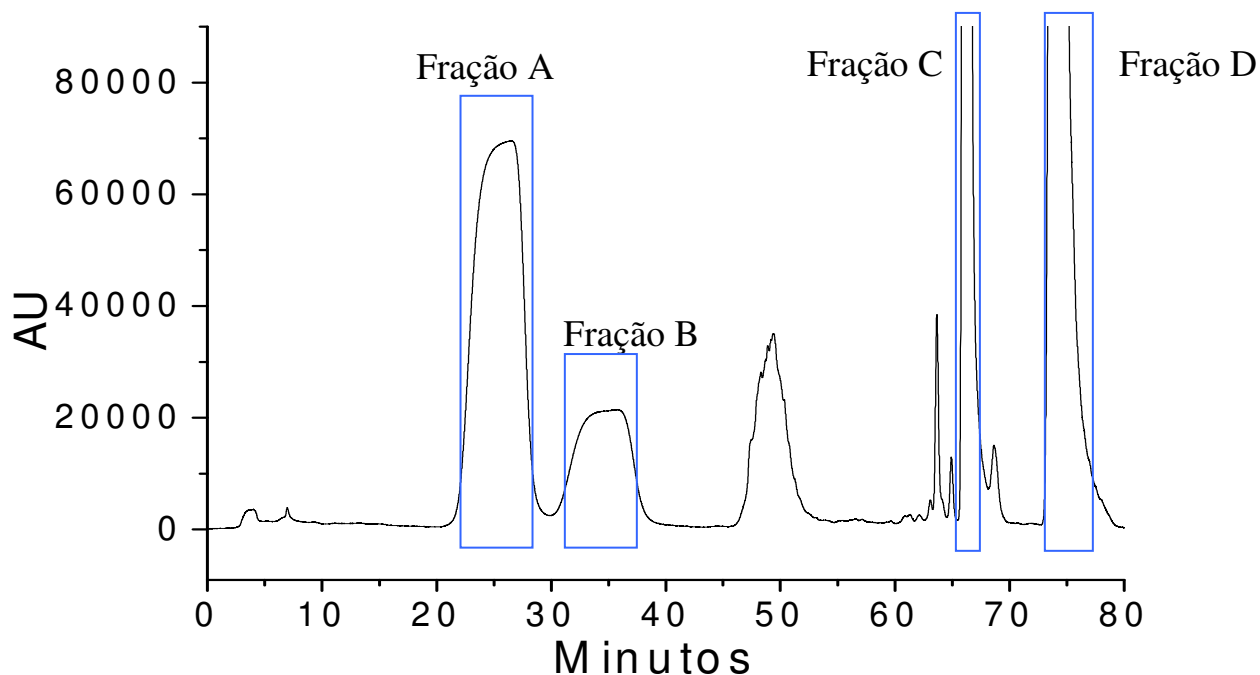


Figura 11: Cromatograma da separação das isoflavonas no sistema preparativo após a transposição de escala, com indicação das frações coletadas.

Condições cromatográficas preparativa: Coluna preparativa (25 x 250 mm) recheada com fase LiChrospher 100 RP-18, Merck, partículas de 12 μm , fase móvel: 85,9 % água + 14 % acetonitrila + 0,1 % ácido acético glacial (A) e acetonitrila + 0,1 % ácido acético glacial (B), vazão 40,0 mL min⁻¹ e programa gradiente: 100 % de A por 35 min; 0 % a 10 % de B em 6 min; 10 % a 15 % de B em 4 min, 15 % a 20 % B em 5 min; 20 % a 25 % B em 5 min; 25 % de B por 13 min; 25 % a 35 % de B em 10 min; 35 % B por 7 min; 35 % a 0 % B em 5 min, volume de injeção: 5 mL, detecção: UV, 254 nm. Temperatura ambiente.

As frações coletadas foram bem estreitas para evitar a coleta de impurezas associadas a pequenas porções de outros compostos. Este procedimento diminui o rendimento, mas aumenta a pureza do composto.

4.2.3. Caracterização das frações obtidas e identificação estrutural das isoflavonas isoladas

As frações obtidas foram coletadas individualmente em coletor de frações automático, iniciando e parando a coleta das quatro frações como indicado na figura 11. Fixou-se como 5000 microunidades de absorbância (μ AU) o fator de nível de ruído para coletar a fração. Após a coleta, as frações foram levadas individualmente a um evaporador rotativo a uma temperatura de 55 °C para evaporação da acetonitrila e ácido acético. A solução restante foi congelada em freezer à -70° C e posteriormente liofilizada. Os compostos obtidos na forma de pó foram submetidos à análise por três diferentes técnicas espectroscópicas. Após a caracterização dos compostos, foram calculadas as purezas dos produtos.

4.2.3.1. Caracterização das frações obtidas por HPLC-DAD

As frações obtidas, após liofilização, foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência. Os espectros dos compostos purificados foram obtidos na faixa de 200 a 400 nm e foram comparados com os espectros dos padrões de referência certificados e com os dados relatados de Delmont *et al.*¹⁷ e Kao e Chen⁹² para as isoflavonas. Os compostos não apresentaram impurezas espectrais, nem impurezas cromatográficas, conforme pode ser observado nas figuras 12 a 15. Nestas figuras os três espectros foram tomados no ponto máximo, no início e na cauda do pico principal para verificar a possível presença de impurezas espectrais. As similaridades indicam que não há contaminações nos picos.

Foi também realizada uma separação cromatográfica com uma fase móvel mais polar (poder de eluição mais fraco), para verificar possíveis presenças de

impurezas associadas aos compostos, através de modificações na retenção cromatográfica.

Os compostos purificados não apresentaram picos de impurezas em todas as condições cromatográficas estudadas, demonstrando que a purificação realizada no sistema preparativo foi adequada e os compostos obtidos foram similares aos padrões de referência das isoflavonas.

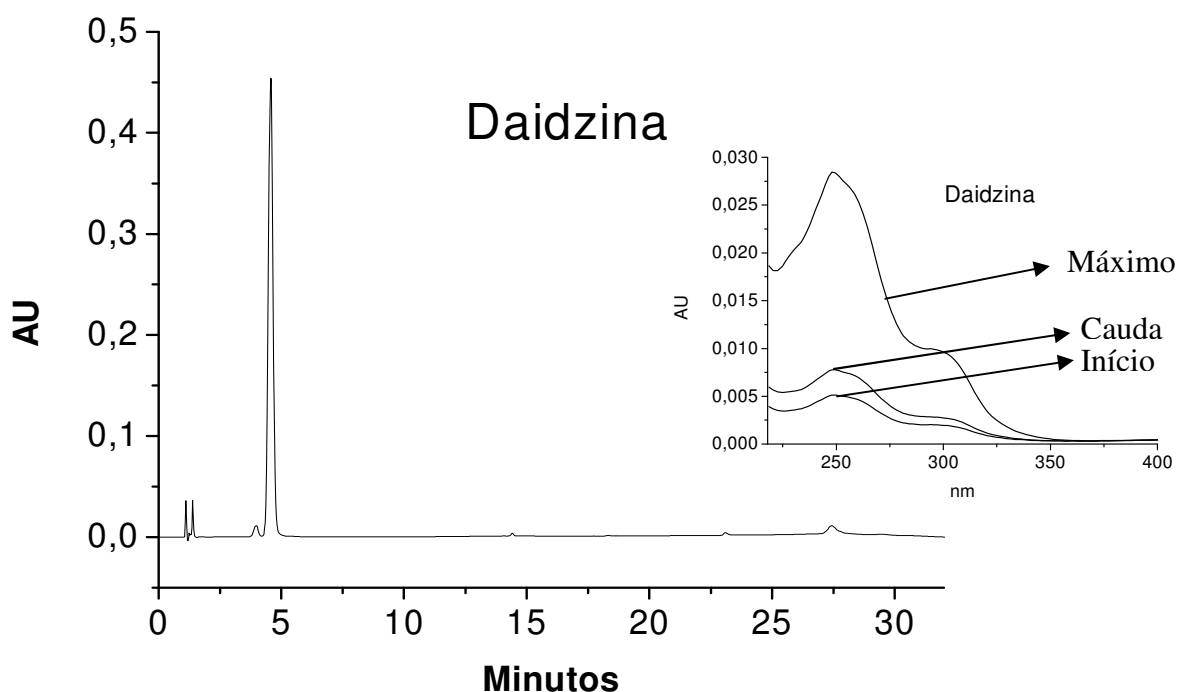


Figura 12: Análise cromatográfica do composto obtido na primeira fração na separação preparativa (Figura 11), com os respectivos espectros de absorção (início, cauda e ápice do pico) no UV-Vis. Condições cromatográficas iguais às da figura 5.

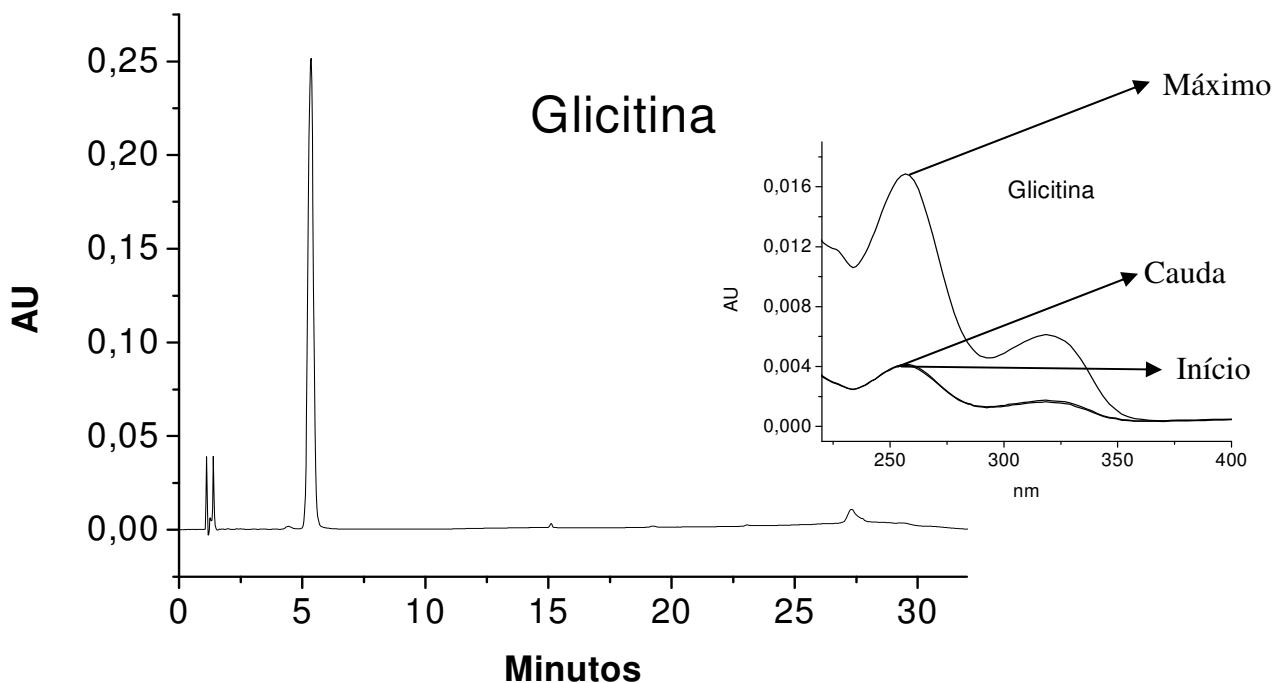


Figura 13: Análise cromatográfica do composto coletado na segunda fração na separação preparativa (Figura 11), com os respectivos espectros de absorção (início, cauda e ápice do pico) no UV-Vis. Condições cromatográficas iguais às da figura 5.

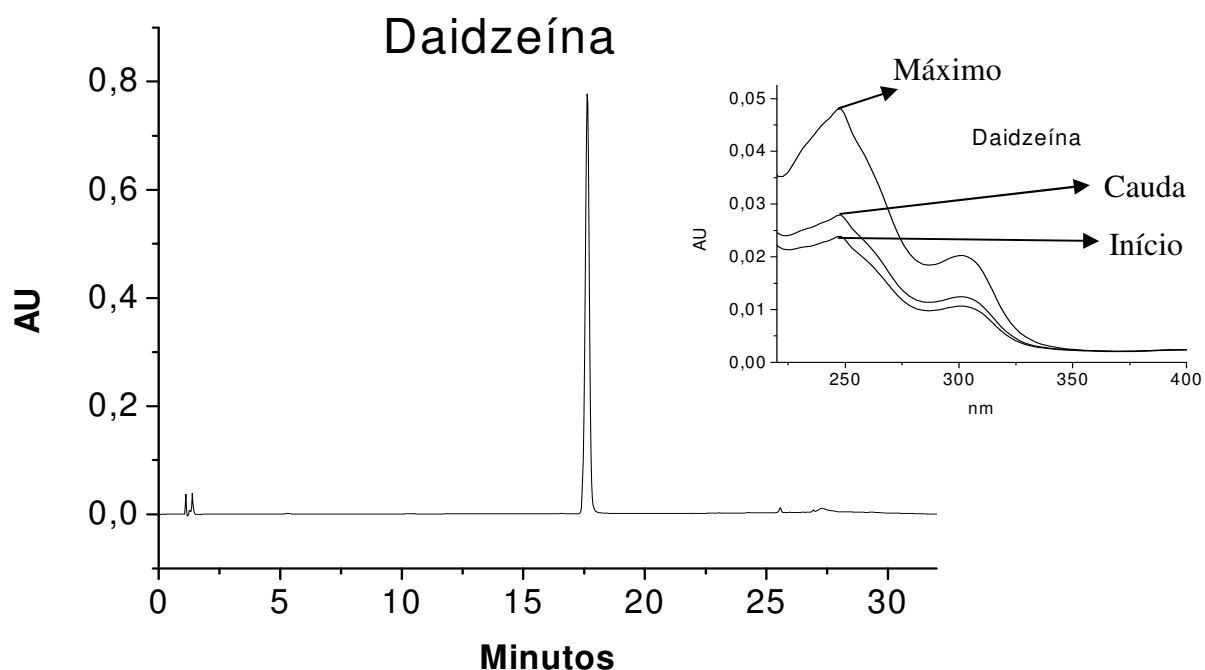


Figura 14: Análise cromatográfica do composto coletado na terceira fração na separação preparativa (Figura 11), com os respectivos espectros de absorção (início, cauda e ápice do pico) no UV-Vis. Condições cromatográficas iguais às da figura 5.

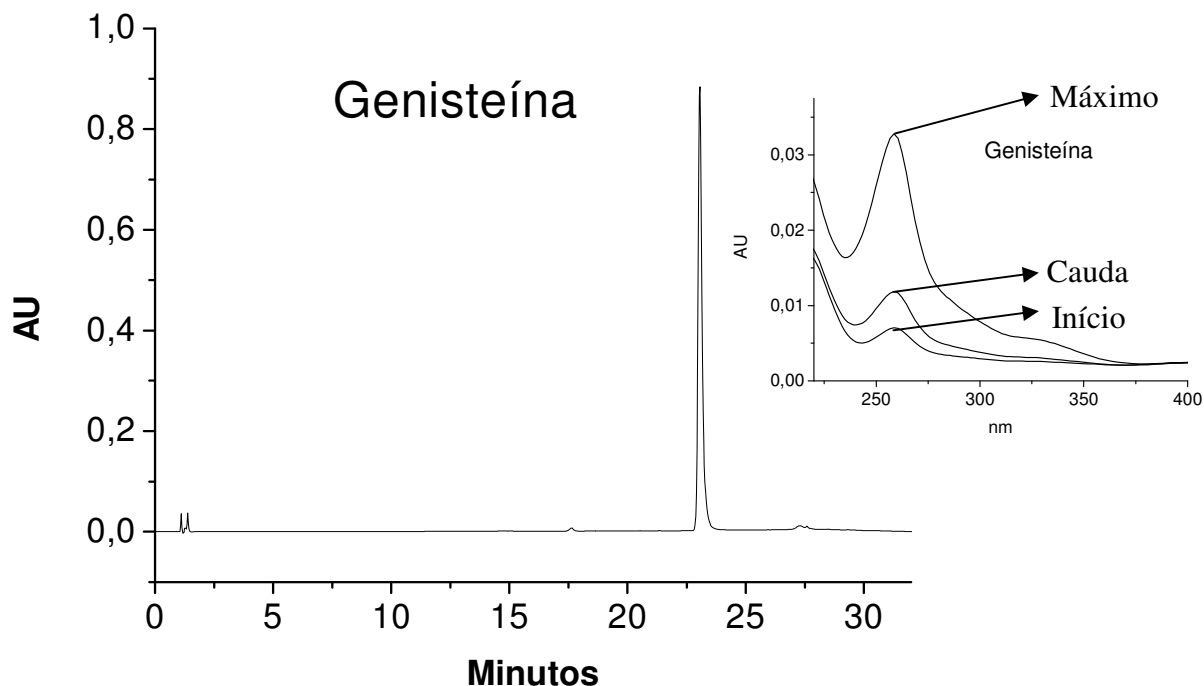


Figura 15: Análise cromatográfica do composto coletado na quarta fração na separação preparativa (Figura 11), com os respectivos espectros de absorção (início, cauda e ápice do pico) no UV-Vis. Condições cromatográficas iguais às da figura 5.

4.2.3.2. Caracterização das frações obtidas por espectrometria de massas

As frações obtidas na cromatografia líquida preparativa também foram caracterizadas pelos seus espectros de massas e comparados com os espectros dos padrões de referência.

A espectrometria de massas foi a técnica que auxiliou na confirmação da massa molar dos compostos. Como foram comparados os espectros de massas dos compostos obtidos na cromatografia preparativa com os espectros de massas dos padrões de referência foi possível concluir que as massas molares são as mesmas. Os espectros de massas por infusão direta dos padrões e amostras de cada uma das isoflavonas podem ser observados nas figuras 16 a 23.

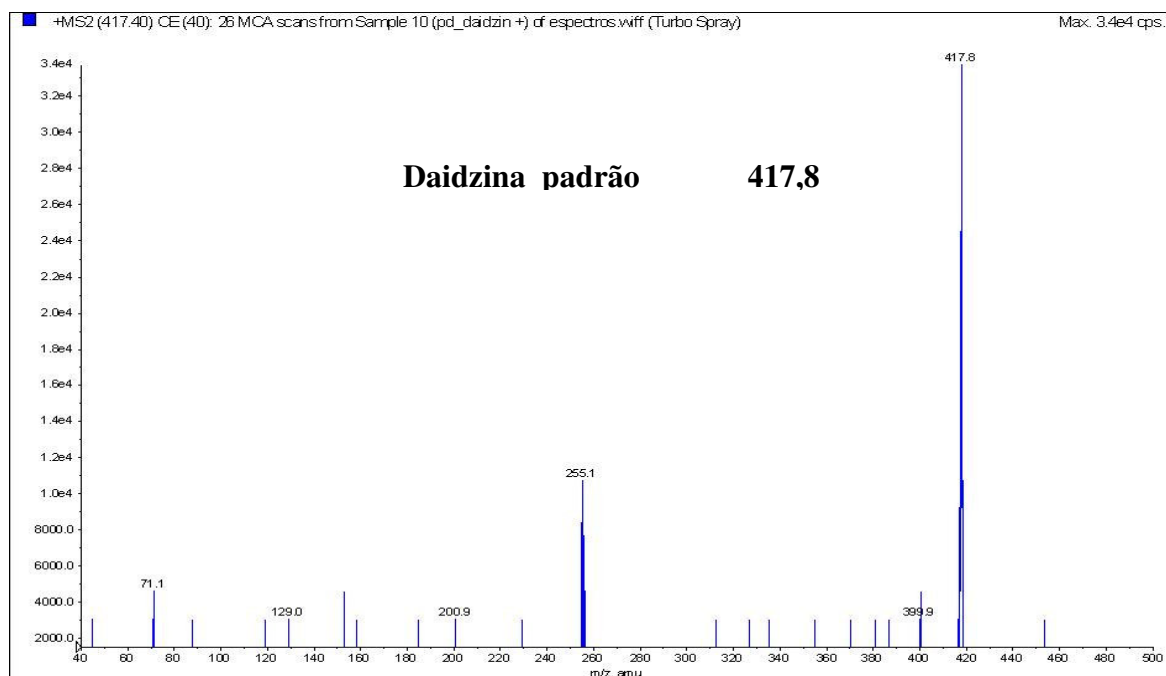


Figura 16: Espectro de massas do padrão da daidzeína, por infusão direta, modo positivo.

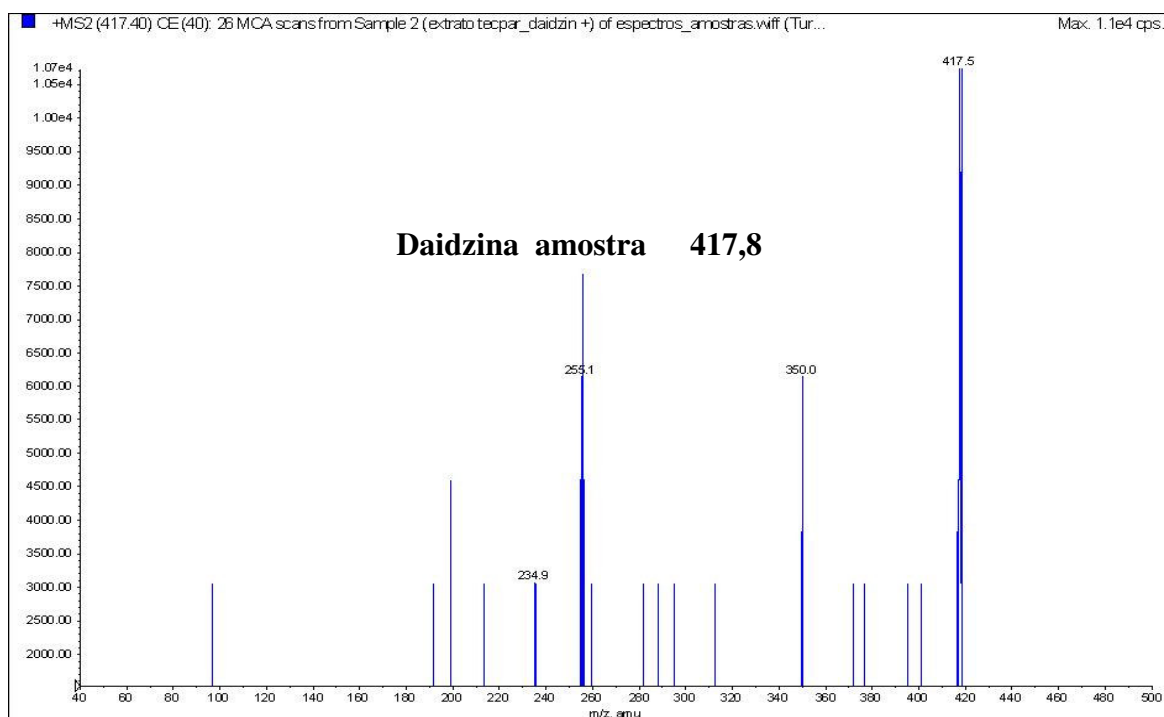


Figura 17: Espectro de massas da daidzina, obtida após separação por cromatografia preparativa por infusão direta, modo positivo.

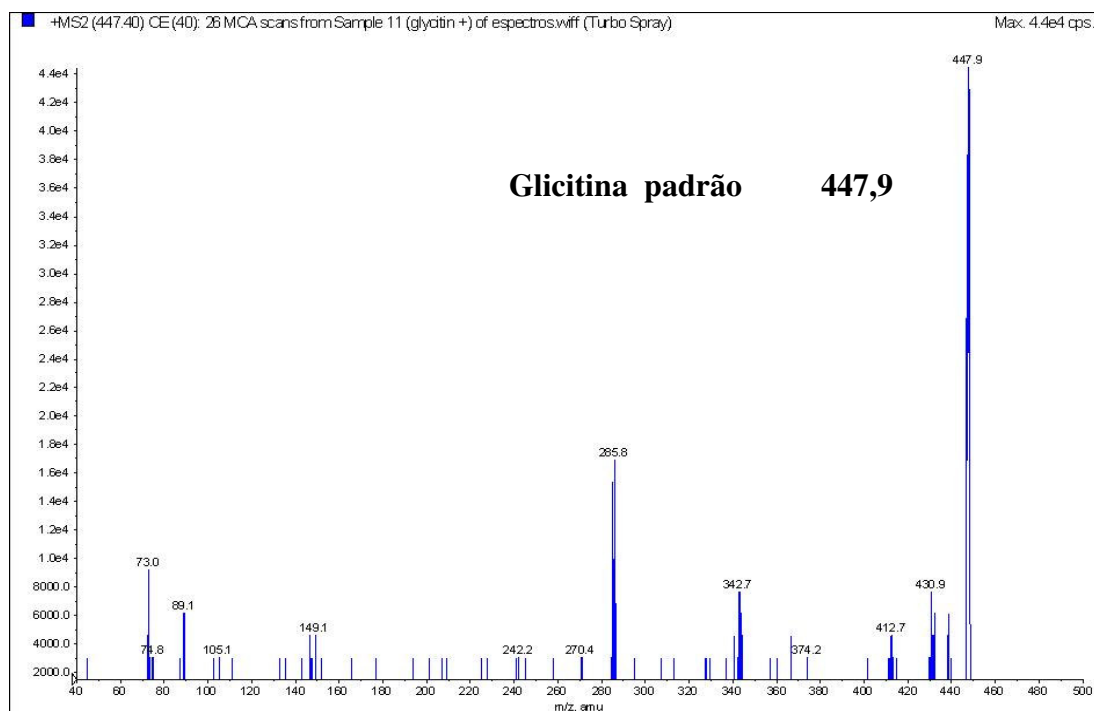


Figura 18: Espectro de massas do padrão de glicitina, por infusão direta, modo positivo.

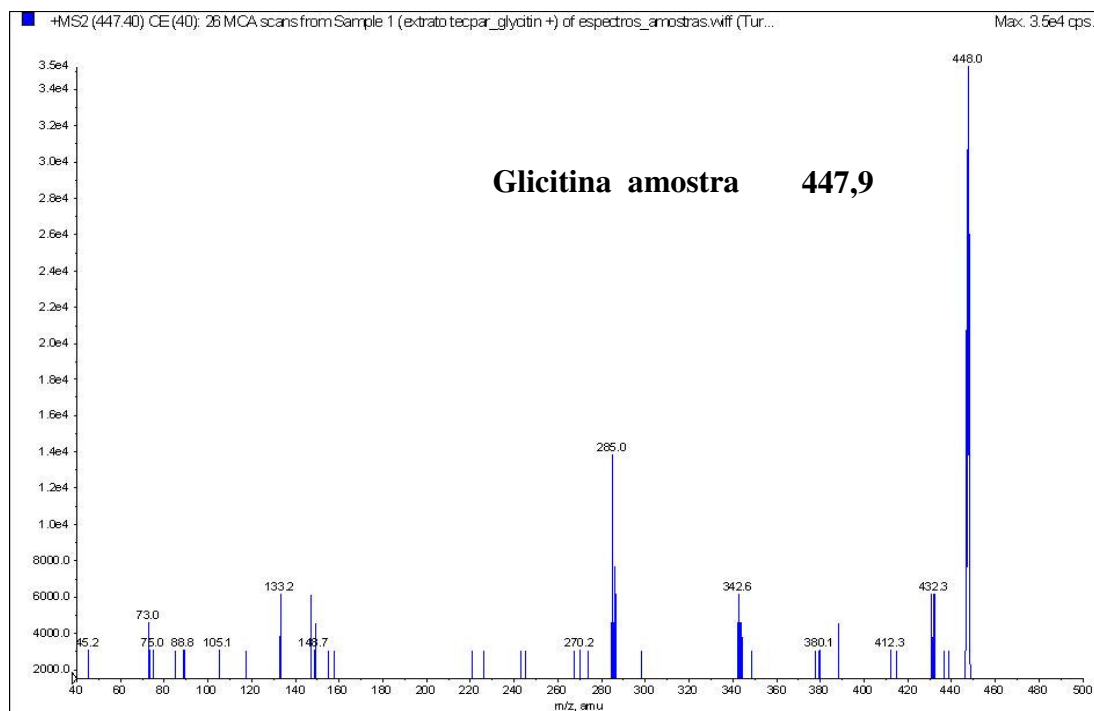


Figura 19: Espectro de massas da glicitina obtida após separação por cromatografia preparativa por infusão direta, modo positivo.

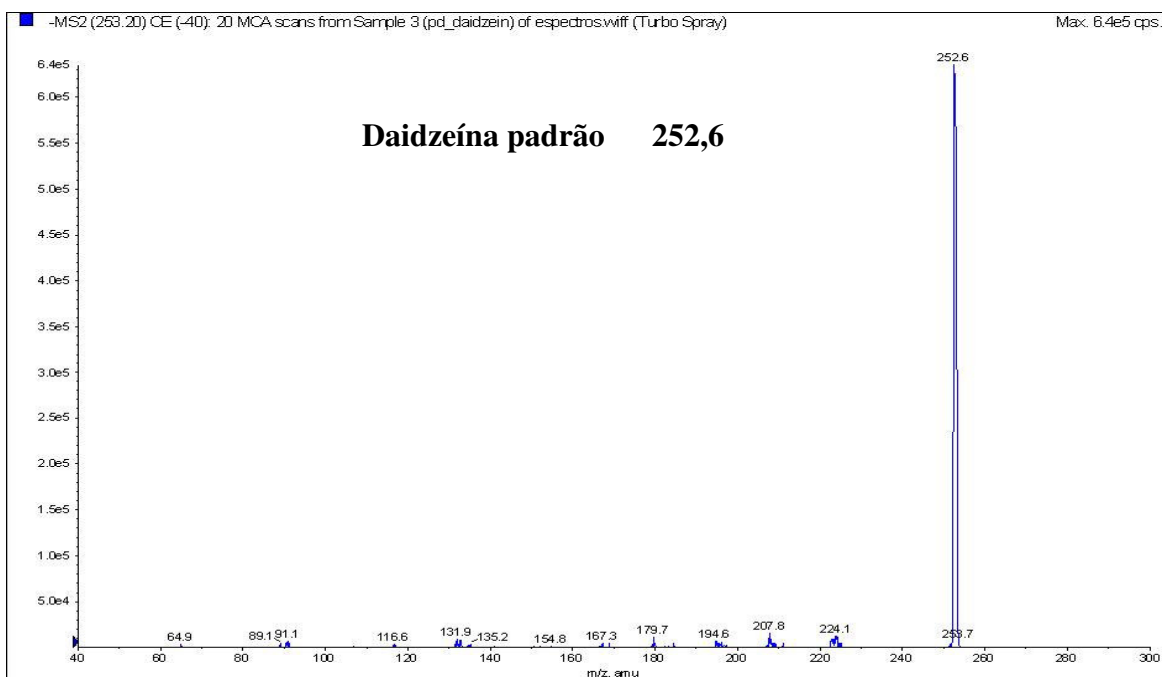


Figura 20: Espectro de massas da padrão da daidzeína, por infusão direta, modo negativo.

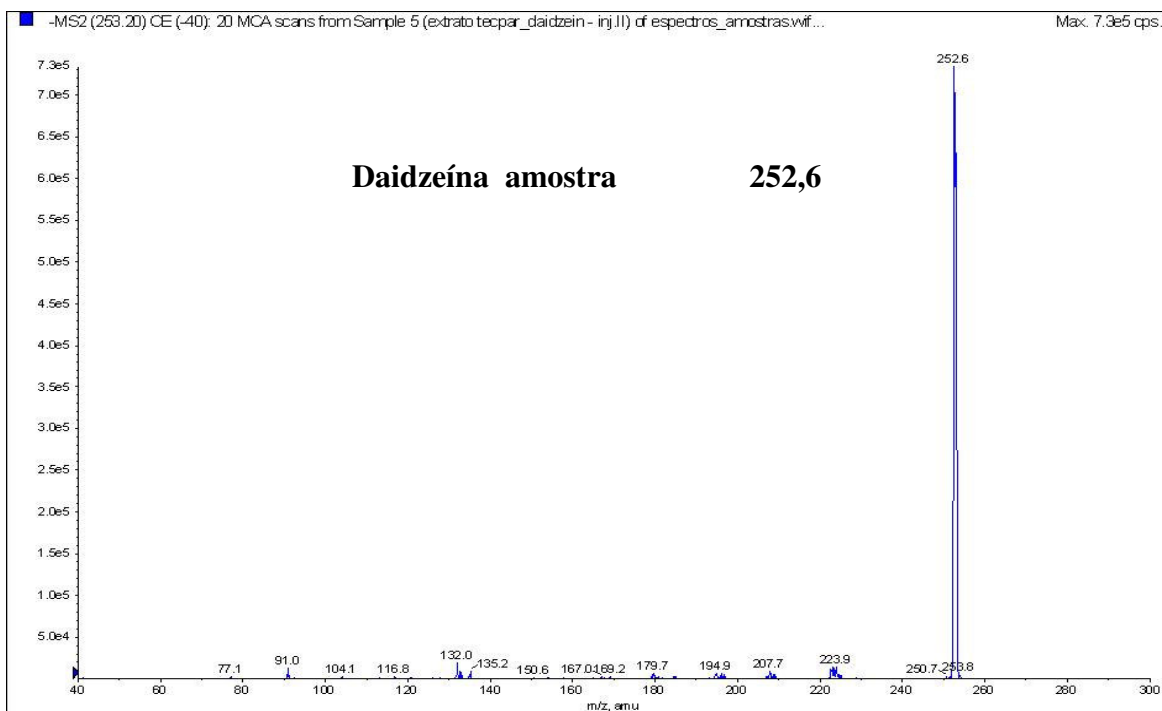


Figura 21: Espectro de massas da daidzeína obtida após separação por cromatografia preparativa por infusão direta, modo negativo.

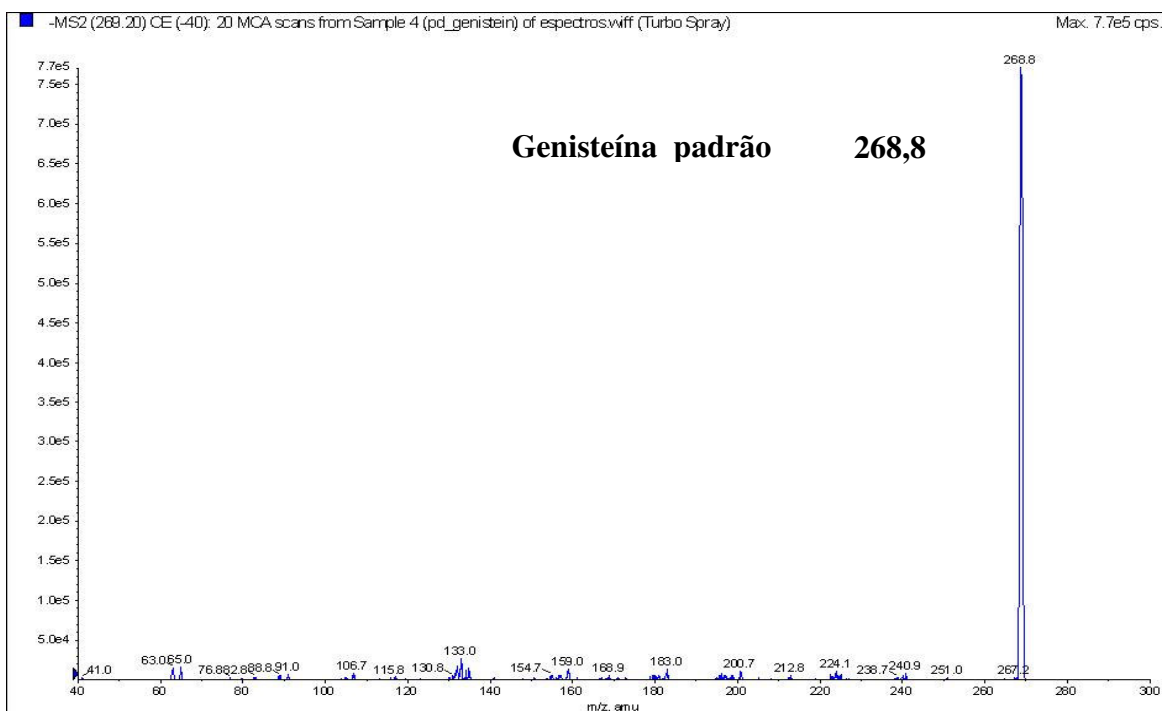


Figura 22: Espectro de massas do padrão da genisteína por infusão direta, modo negativo.

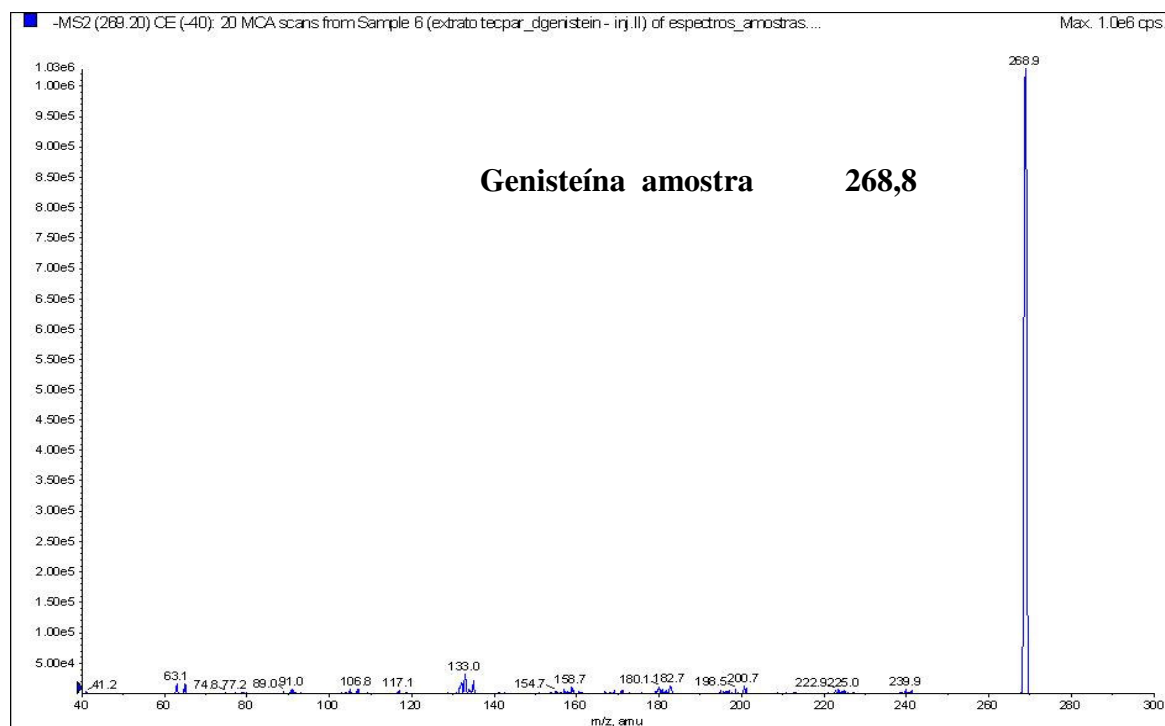


Figura 23: Espectro de massas da genisteína obtido após separação por cromatografia preparativa, por infusão direta, modo negativo.

Vários trabalhos sobre identificação e caracterização de isoflavonas por LC-MS e LC-MS/MS têm sido relatados na literatura, tanto para produtos provenientes de soja, como para grão de soja^{35,37}. Os espectros de massas foram bastante similares entre padrões e amostras, respondendo com um sinal de maior intensidade na região de massas da referida massa molar.

Os resultados obtidos na espectrometria de massas demonstraram identificações inequívocas, permitindo identificar e caracterizar a massa molar de cada composto.

4.2.3.3. Caracterização das frações obtidas por ressonância magnética nuclear

A caracterização das estruturas químicas dos quatro compostos isolados foi determinada também por NMR de ^1H e ^{13}C .

A figura 24 mostra a estrutura química da daidzina e as posições dos carbonos, identificando os hidrogênios ligados. As figuras 25 e 26 mostram os espectros de NMR de ^1H e NMR de ^{13}C obtidos para a daidzina.

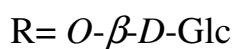
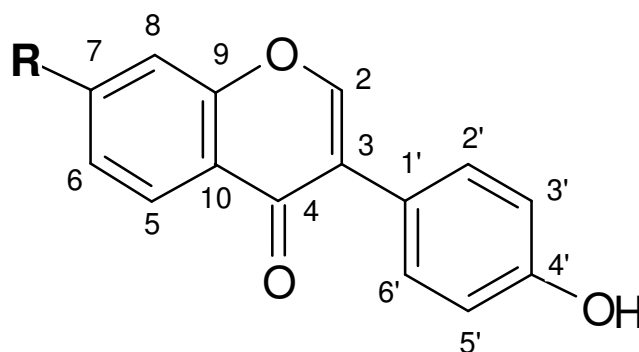


Figura 24: Estrutura química da daidzina

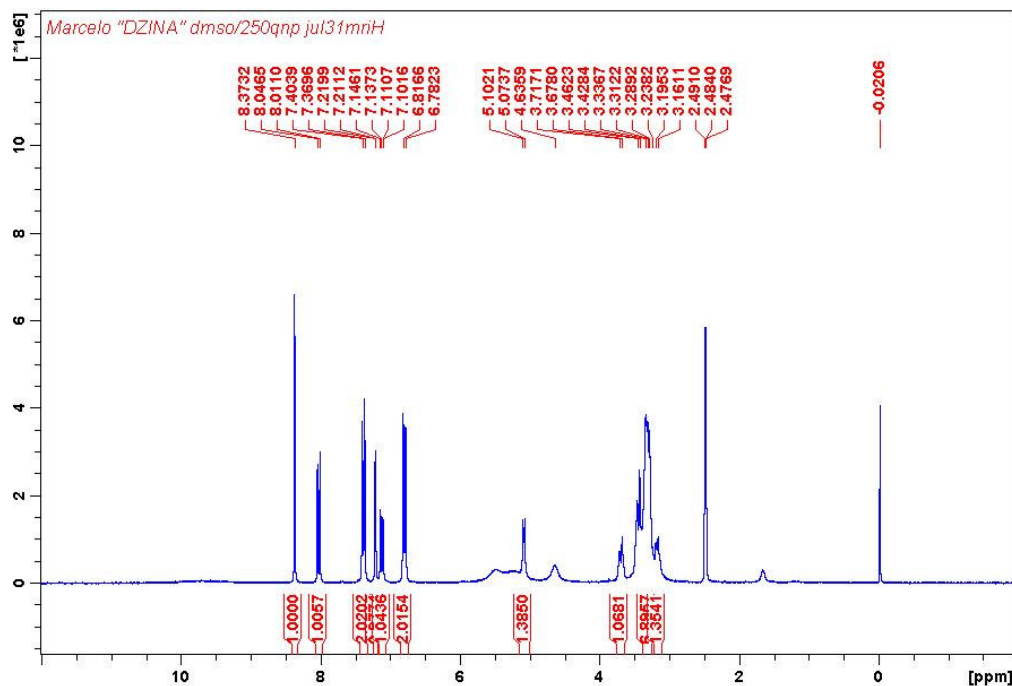


Figura 25: Espectro NMR de ^1H da fração daidzina obtida após purificação.

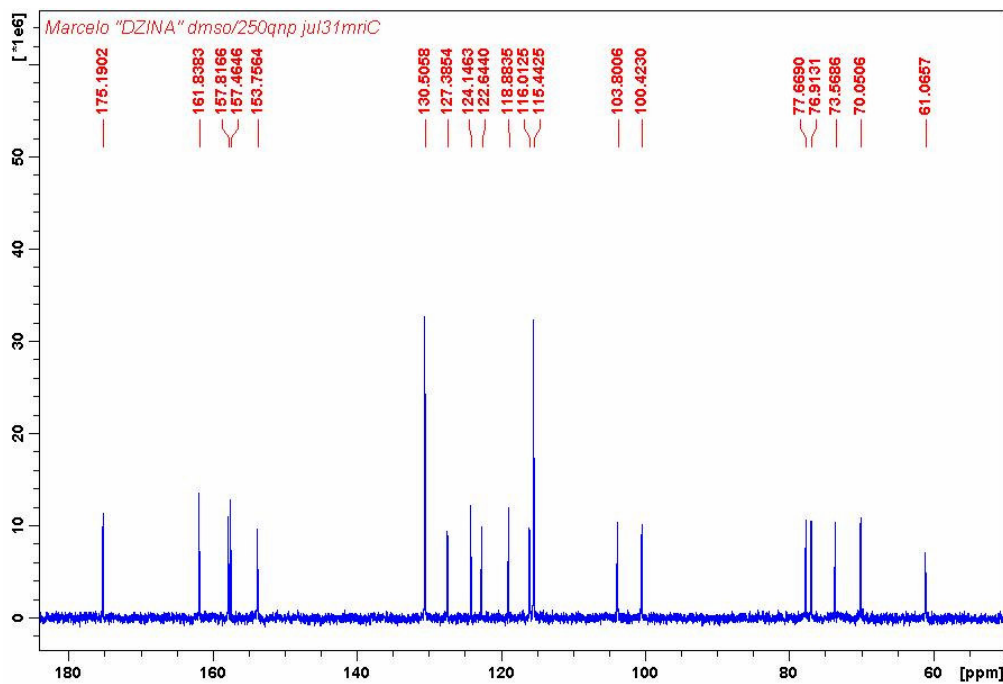


Figura 26: Espectro NMR de ^{13}C da daidzina obtida após purificação.

A tabela 9 apresenta os valores de NMR de ^1H para a isoflavona daidzina e a tabela 10 mostra os valores de NMR de ^{13}C ambos comparados com dados da literatura ⁹³. Estes valores caracterizam a estrutura química da daidzina.

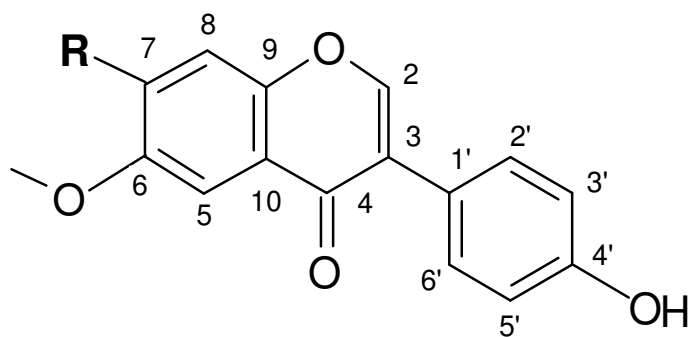
Tabela 9: Resultados de NMR de ^1H para daidzina obtidos, comparados os dados de literatura.

Posição	Daidzina (δ), (H), (J) (experimental)	Daidzina ⁹³ (δ), (H), (J) (literatura)
2	8,37, 1H, s	8,35, 1H, s
5	8,03, 1H, d, 8,88	8,05, 1H, d, 8,8
6	7,12, 1H, dd, 8,88 e 2,22	7,14, 1H, dd, 8,8 e 2,4
8	7,22, 1H, d, 2,22	7,22, 1H, d, 2,4
2', 6'	7,39, 2H, d, 8,58	7,41, 2H, d, 8,7
3', 5'	5,80, 2H, d, 8,58	6,82, 2H, d, 8,7
7-O- β -D-Glc-1(1'')	5,09, 1H, d, 7,10	5,09, 1H, d, 7,5
2	3,18, 1H, m	3,2, 1H, m
3	3,25-3,4, 1H, m	3,30-3,36, 1H, m
4	3,25-3,4, 1H, m	3,44-3,52, 1H, m
5	3,25-3,4, 1H, m	3,44-3,52, 1H, m
6-a	3,70, 1H, m	3,74, 1H, m
6-b	3,45, 1H, m	3,46, 1H, m

Tabela 10: Resultados obtidos de NMR de ^{13}C para daidzina, comparados os dados de literatura.

Posição	Daidzina (δ) em ppm (experimental)	Daidzina ⁹³ (δ) em ppm (literatura)
2	153,8	153,1
3	124,1	123,7
4	175,2	174,7
5	127,4	126,9
6	115,4	115,4
7	161,8	161,3
8	103,8	103,3
9	157,8	157,2
10	118,9	118,5
1'	122,6	122,2
2'	130,5	129,9
3'	116,0	114,9
4'	157,5	157,0
5'	116,0	115,5
6'	130,5	129,9
7-O-Glc-1(1'')	100,4	100,1
(2) 2''	73,6	73,1
(3) 3''	76,9	76,4
(4) 4''	70,1	69,6
(5) 5''	77,7	77,2
(6) 6''	61,1	60,6

A estrutura química da glicitina e as posições dos carbonos, identificando os hidrogênios ligados podem ser observados na figura 27, e os espectros de NMR de ^1H e NMR de ^{13}C nas figuras 28 e 29.



R= *O*- β -glucopyranoside

Figura 27: Estrutura química da glicitina.

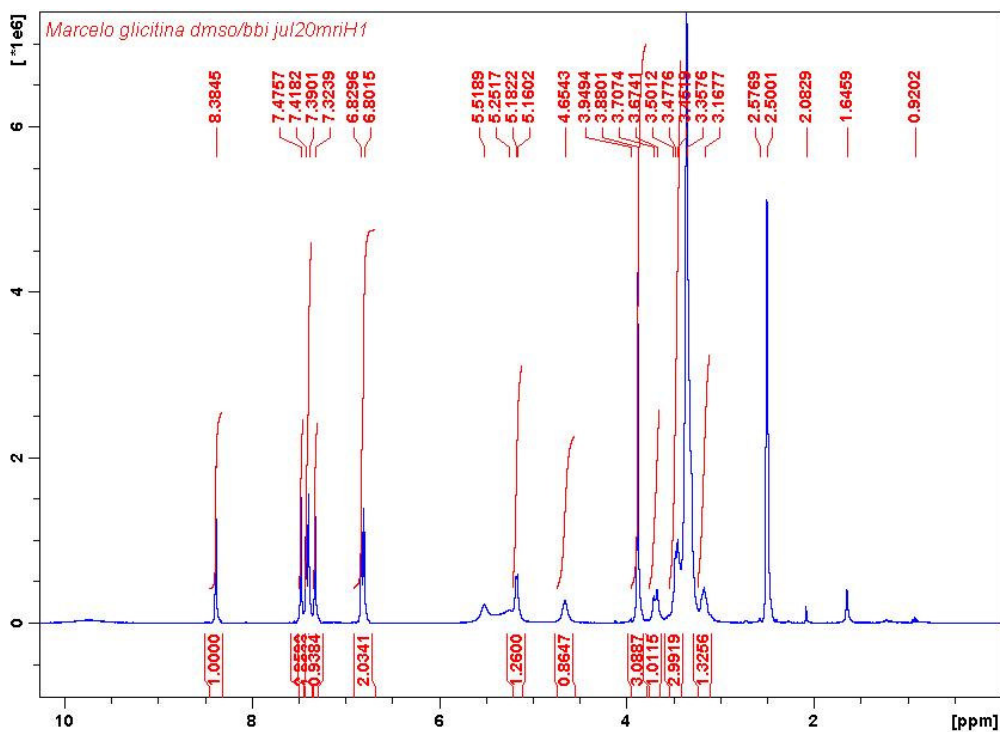


Figura 28: Espectro NMR de ¹H da glicitina obtida após purificação.

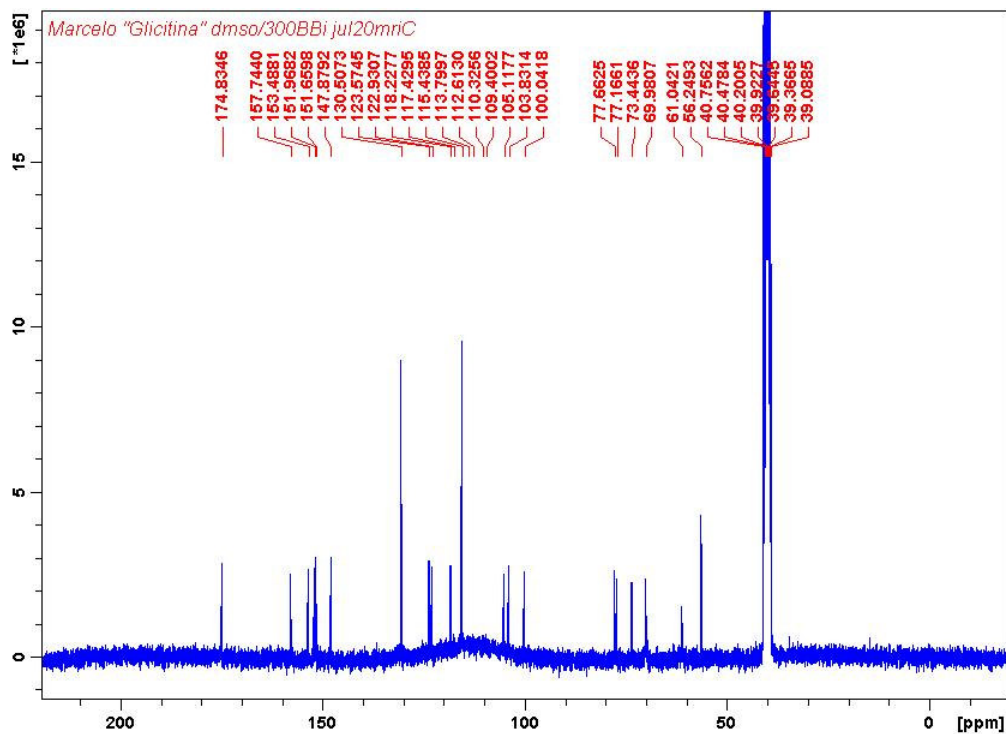


Figura 29: Espectro NMR de ^{13}C da glicitina obtida após purificação.

Na tabela 11 são apresentados os valores NMR de ^1H para a isoflavona glicitina e na tabela 12 são mostrados os valores de NMR de ^{13}C com os deslocamentos químicos (δ) em ppm, comparados com dados da literatura ⁹⁴. Estes valores caracterizam a estrutura química da glicitina.

Tabela 11: Resultados NMR de ^1H para glicitina obtidos comparados os dados de literatura.

Posição	Glicitina (δ), (H), (J) (experimental)	Glicitina ⁹⁴ (δ), (H), (J) (literatura)
2	8,38, 1H, s	8,37, 1H, s
5	7,48, 1H, s	7,48, 1H, s
8	7,32, 1H, s	7,32, 1H, s
2', 6'	7,40, 2H, d, 8,43	7,41, 2H, d, 8,6
3', 5'	6,82, 2H, d, 8,43	6,82, 2H, d, 8,6
6-OMe	3,88, 3H, s	3,88, 3H, s
7-O- β -D-Glc-1(1'')	5,17, 1H, d, 6,6	5,17, 1H, d, 7,4
2	3,29-3,26, 1H, m	3,30, 1H, m
3	3,29-3,26, 1H, m	3,30, 1H, m
4	3,17, 1H, m	3,17, 1H, m
5	3,45-3,50, 1H, m	3,46, 1H, m
6-a	3,45-3,50, 1H, m	3,43, 1H, m
6-b	3,69, 1H, m	3,70, 1H m

Tabela 12: Resultados obtidos NMR de ^{13}C para glicitina comparados os dados de literatura.

Posição	Glicitina (δ) em ppm (experimental)	Glicitina ⁹⁴ (δ) em ppm (literatura)
2	153,5	153,2
3	123,6	123,3
4	174,8	174,6
5	105,1	105,0
6	147,9	147,7
7	152,0	152,7
8	103,8	103,0
9	151,7	151,7
10	118,2	118,0
1'	123,0	122,8
2', 6'	130,5	130,3
3', 5'	115,4	115,2
4'	157,7	157,6
7-O-Glc-1(1'')	100,0	99,8
(2) 2''	73,4	73,2
(3) 3''	77,2	76,9
(4) 4''	70,0	69,8
(5) 5''	77,7	77,4
(6) 6''	61,0	60,8

A figura 30 mostra a estrutura química da daidzeína e as posições dos carbonos, identificando os hidrogênios ligados. As figuras 31 e 32 mostram os espectros de NMR de ^1H e NMR de ^{13}C obtidos para a daidzeína.

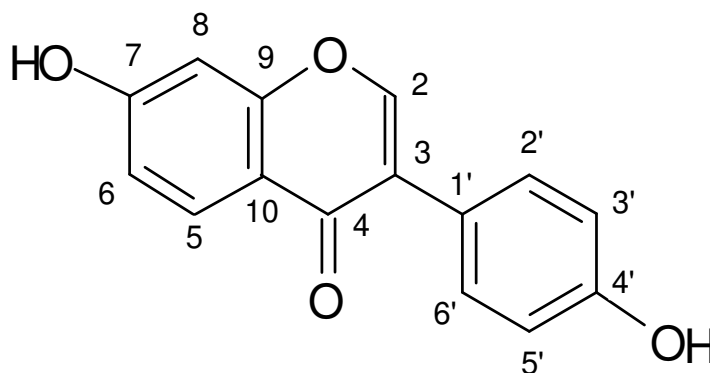


Figura 30: Estrutura química da daidzeína

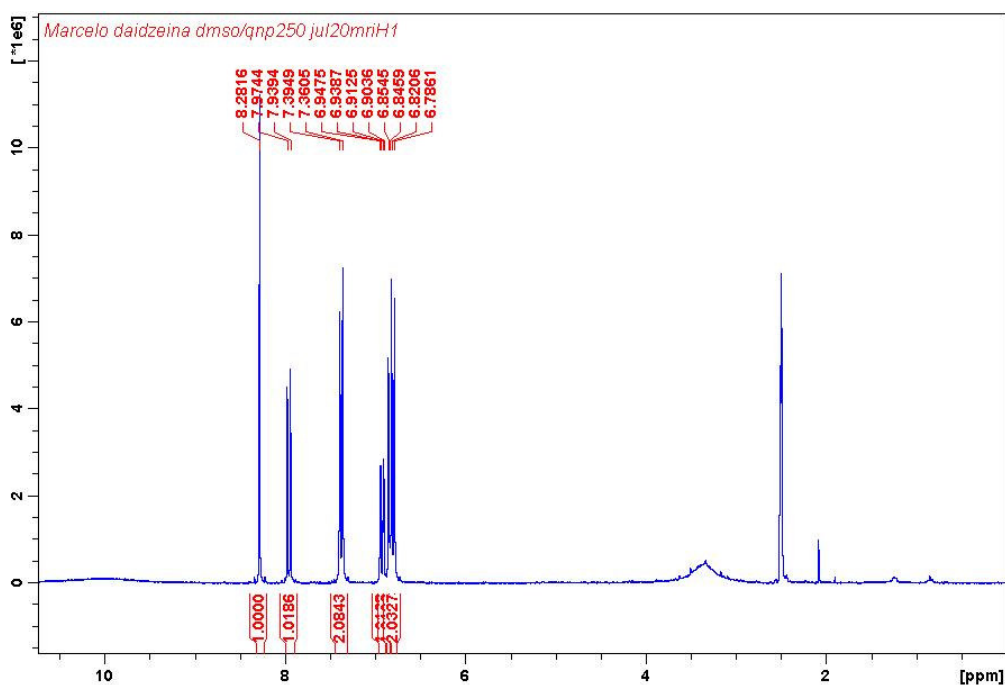


Figura 31: Espectro de NMR de ^1H da fração daidzeína obtida após purificação.

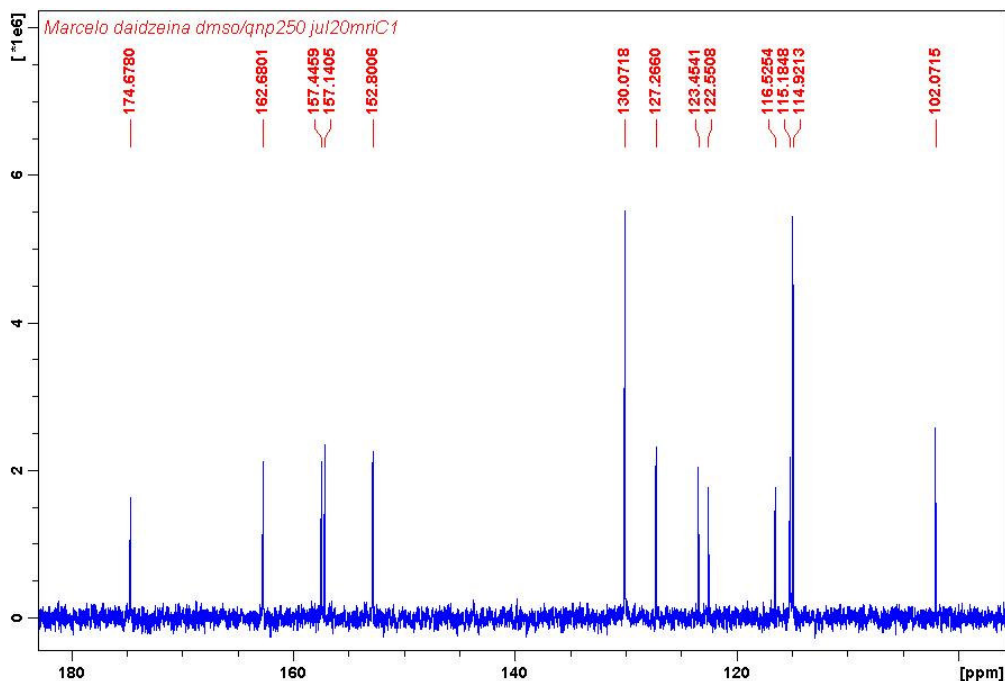


Figura 32: Espectro de NMR de ^{13}C da daidzeína obtida após purificação.

A tabela 13 apresenta os valores de NMR de ^1H para a isoflavona daidzeína, na qual se pode observar os deslocamentos químicos (δ), as integrais (H), as multiplicidades e as constantes de acoplamento (J) em Hz, comparados com dados da literatura ⁹⁵. A tabela 14 mostra os resultados de NMR de ^{13}C com os deslocamentos químicos (δ) em ppm, comparados com dados da literatura ⁹⁵. Esses valores comparativos de NMR caracterizam a estrutura química da daidzeína.

Tabela 13: Resultados obtidos de NMR de ^1H para daidzeína e comparados aos dados de literatura.

Posição	Daidzeína (experimental) (δ), (H), (J)	Daidzeína ⁹⁵ (literatura) (δ), (H), (J)
2	8,28, 1H, s	8,25, 1H, s
5	7,96, 1H, d, 8,76	7,94, 1H, d, 8,7
6	6,93, 1H, dd, 8,76 e 2,2	6,9, 1H, dd, 8,7 e 2,1
8	6,85, 1H, d, 2,2	6,83, 1H, d, 2,1
2', 6'	7,38, 2H, d, 8,63	7,36, 2H, d, 8,4
3', 5'	6,80, 2H, d, 8,63	6,77, 2H, d, 8,4

Tabela 14: Resultados obtidos de NMR de ^{13}C para daidzeína e comparados aos dados de literatura.

Posição	Daidzeína (experimental) (δ) em ppm	Daidzeína ⁹⁵ (literatura) (δ) em ppm
2	152,8	152,7
3	123,5	123,6
4	174,7	174,7
5	127,3	127,2
6	115,2	115,1
7	162,7	162,5
8	102,1	102,3
9	157,4	157,4
10	116,5	116,7
1'	122,6	122,8
2' – 6'	130,1	130,1
3' – 5'	114,9	115,0
4'	157,1	157,2

A estrutura química da genisteína e as posições dos carbonos, identificando os hidrogênios ligados podem ser observados na figura 33. Os espectros de NMR de ^1H e NMR de ^{13}C podem ser vistos nas figuras 34 e 35.

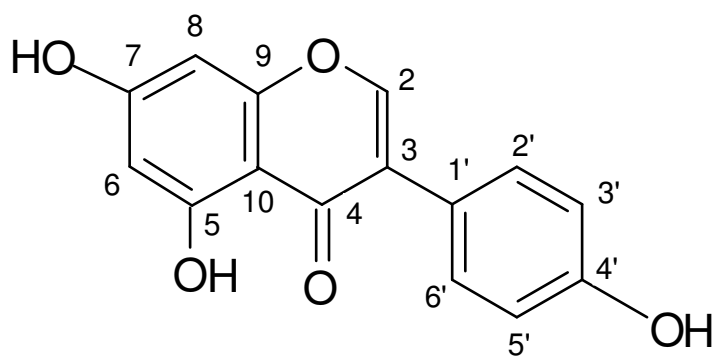


Figura 33: Estrutura química da genisteína.

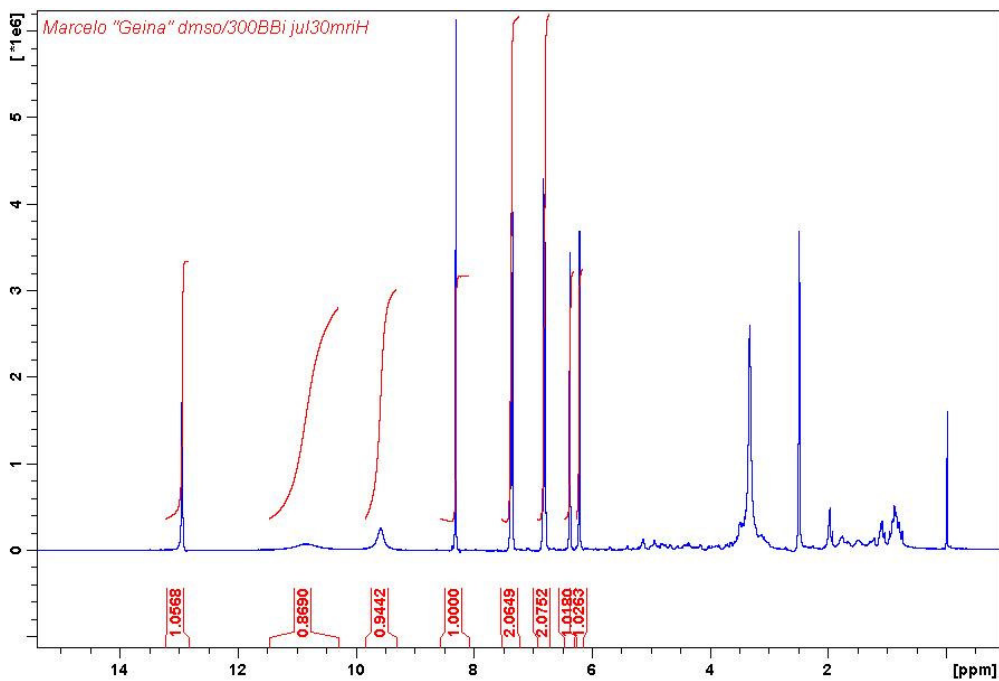


Figura 34: Espectro NMR de ^1H da genisteína obtida após purificação.

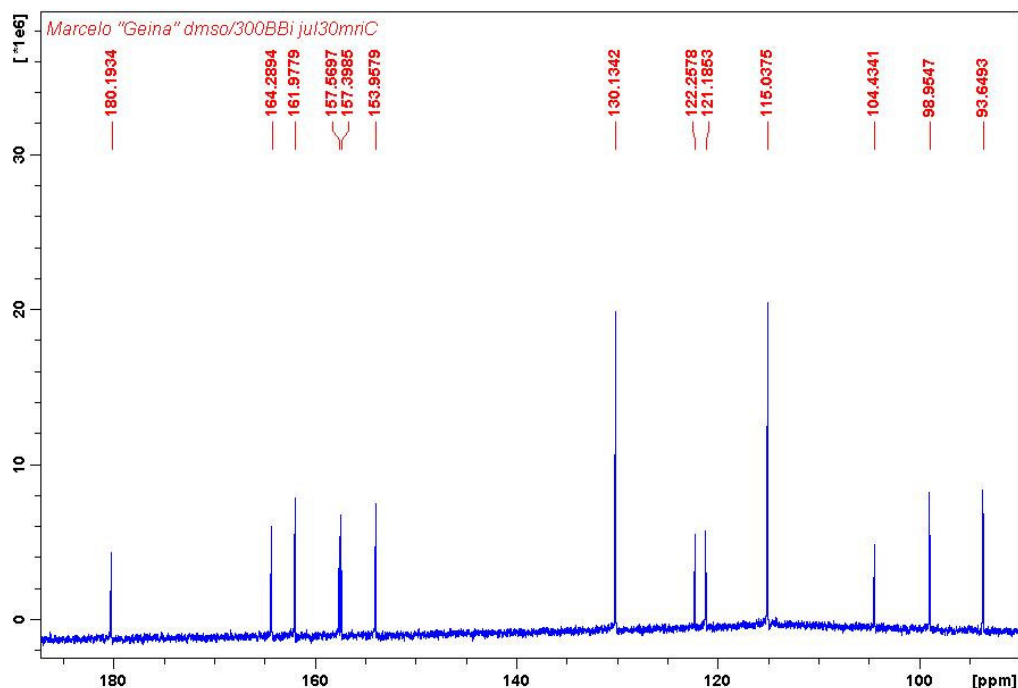


Figura 35: Espectro NMR de ^{13}C da genisteína obtida após purificação.

A tabela 15 mostra os valores NMR de ^1H para a isoflavona genisteína e a tabela 16 mostra os valores de NMR de ^{13}C , comparados com dados da literatura⁹⁶. Estes valores caracterizam a estrutura química da genisteína.

Tabela 15: Resultados de NMR de ^1H para genisteína obtidos comparados os dados de literatura.

Posição	Genisteína (δ), (H), (J) (experimental)	Genisteína ⁹⁶ (δ), (H), (J) (literatura)
2	8,30, 1H, s	8,26, 1H, s
6	6,20, 1H, d, 2,07	6,21, 1H, d, 1,95
8	6,37, 1H, d, 2,07	6,39, 1H, d, 1,95
2', 6'	7,36, 2H, d, 8,64	7,38, 2H, d, 8,2
3', 5'	6,80, 2H, d, 8,64	6,82, 2H, d, 8,2
OH-5'	12,93, 1H, s	12,98, 1H, s
OH-7'	10,85, 1H, s	10,92, 1H, s
OH-4'	9,57, 1H, s	9,60, 1H, s

Tabela 16: Resultados obtidos de NMR de ^{13}C para genisteína comparados os dados de literatura.

Posição	Genisteína (δ) em ppm (experimental)	Genisteína ⁹⁶ (δ) em ppm (literatura)
2	154,0	154,4
3	122,3	122,8
4	180,2	180,6
5	161,2	163,6
6	99,0	99,3
7	164,3	164,4
8	93,6	94,2
9	157,6	158,1
10	104,4	104,9
1'	115,0	115,5
2'	130,1	130,6
3'	122,3	122,8
4'	157,4	157,5
5'	115,0	115,5
6'	130,1	130,6

4.2.4. Pureza das frações e rendimento do processo

As purezas das isoflavonas isoladas da coluna preparativa estão apresentadas na tabela 17 e foram calculadas por cromatografia líquida de alta eficiência, comparando as áreas das frações produzidas e liofilizadas com os padrões de referência certificados separados pelo mesmo sistema cromatográfico. Posteriormente foi determinado o teor de água por Karl Fisher para expressar a pureza final com a umidade associada.

Tabela 17: Teores de pureza das isoflavonas obtidas após purificação por cromatografia preparativa.

Isoflavonas	Teor de água g/100g	Teor HPLC g/100g
Daidzina	3,6	93,1
Glicitina	7,3	87,6
Daidzeína	0,1	99,8
Genisteína	5,7	89,5

As determinações quantitativas dos rendimentos parciais e totais do processo foram obtidas, relacionando a massa de cada isoflavona, após liofilização, com o valor teórico, como indicado na tabela 18. Os rendimentos das isoflavonas obtidas pela cromatografia preparativa foram ao redor de 83 %, com purezas acima de 85 % como pode ser observado na tabela 17.

Tabela 18: Rendimento do processo após separação, secagem e pesagem das isoflavonas.

Isoflavona	Massa teórica mg	Massa obtida mg	Rendimento %
Daidzina	15,8	13,4	84,8
Glicitina	6,4	5,2	81,3
Daidzeína	48,8	40,5	83,0
Genisteína	21,0	17,8	84,7

4.2.5. Conclusões parciais

As quatro isoflavonas presentes no extrato seco foram separadas por cromatografia preparativa, obtendo compostos que apresentaram espectros na região do ultravioleta, de massas e de NMR idênticos aos espectros dos padrões. Foram feitas determinações quantitativas dos rendimentos parciais e totais do processo, relacionando a massa de cada isoflavona, após liofilização, com o valor teórico. Houve uma pequena perda no processo (16-20 %), ocorrido devido ao fatiamento estreito dos picos no processo de separação da cromatografia preparativa. Para aumentar o rendimento do processo seria necessário aumentar o tamanho das fatias, entretanto, este procedimento poderia comprometer a pureza dos compostos.

Os padrões produzidos no laboratório ficaram em torno de 80 % mais baratos que os padrões comercializados, demonstrando que o processo produtivo empregando a cromatografia líquida preparativa é viável.

5. DETERMINAÇÃO DE ISOFLAVONAS EM GRÃOS DE SOJA TRANSGÊNICA E NÃO-TRANSGÊNICA.

Para demonstrar a aplicabilidade dos padrões obtidos, foi desenvolvida um método para extração e quantificação das isoflavonas em grãos de soja transgênica e não-transgênica. Foi empregado um método simples de extração das isoflavonas com solvente aquoso e orgânico que permite a extração de todas as formas das isoflavonas presentes no grão ³⁵. Cabe lembrar que as isoflavonas contidas no grão de soja são constituídas de várias estruturas, conforme pode ser observado na figura 1, e algumas destas estão presentes em pequenas quantidades, sendo difícil a sua quantificação. Além disso, para especiar as isoflavonas nas diferentes formas seriam necessários seus respectivos padrões. Entretanto, a obtenção de todos os padrões de isoflavonas é difícil e muito cara. Para permitir uma quantificação das isoflavonas de uma maneira mais fácil, foi adicionada uma etapa de hidrólise ácida após a extração para que todas as formas glicosídicas fossem transformadas na forma aglicona para, posterior quantificação. Dois dos padrões na forma aglicona, usados para a quantificação, foram os isolados neste trabalho (capítulo 4), sendo adicionado também a gliciteína (padrão certificado de origem comercial) que era uma das isoflavonas que não estava presente no extrato seco.

5.1. Materiais e métodos

5.1.1. Equipamento analítico

O sistema cromatográfico analítico e seus acessórios, utilizado no desenvolvimento da separação e na validação, foi o cromatógrafo Merck Hitachi LaChrom descritos na seção 3.1.1.

5.1.2. Padrões de isoflavonas

Os padrões das isoflavonas foram os compostos obtidos na purificação por cromatografia líquida preparativa, daidzeína, 99,8 %, e genisteína, 89,5 %, (isoflavonas na forma aglicona). Foi também utilizado um padrão de gliciteína, 96,3 %, obtida da Chromadex, certificada internacionalmente pela USP (United Stated Pharmacopeia). Os padrões foram dissolvidos em solução de metanol:água (80:20 v/v) antes de serem incorporados nas amostras.

5.1.3. Extração e hidrólise das amostras de grão de soja

A extração de soja foi adaptada do método de Griffith e Collison ³⁵, pois este método apresentou maior rendimento na extração das isoflavonas, comparados à outros trabalhos ^{16,17}. Entretanto, este processo de extração sofreu várias adaptações experimentais até que fosse obtido um método adequada para a quantificação.

As isoflavonas extraídas do grão de soja eram constituídas de várias estruturas glicosídicas presentes em pequenas quantidades. A adição da etapa de hidrólise ácida após a extração, transformou todas as formas glicosídicas nas formas agliconas para posterior quantificação.

Para a extração das isoflavonas no grão de soja, foi pesado exatamente 1,0 g de grão de soja, moída até granulometria de 200 mesh, em um frasco com tampa rosqueada. Adicionaram-se 10 mL de acetonitrila e agitaram-se os frascos

vigorosamente. Adicionaram-se 6 mL de água deionizada e as amostras foram colocadas em banho de ultrassom por um período de 2 h, aquecidas na temperatura de 50-55 °C. Após esta etapa, as amostras foram resfriadas até temperatura ambiente e foram adicionados 4 mL de água deionizada para obter um volume total de líquido de 20 mL. Esta amostra líquida foi tampada e guardada em geladeira a 4 °C por 15 h antes da hidrólise.

Quatro mL do extrato líquido foram colocados em um tubo de ensaio com tampa rosqueável com 1 mL de HCl 37 % e o tubo de ensaio foi aquecido em um banho termostático a 80 °C por um período de 2 h para hidrólise das isoflavonas. Após a hidrólise, o tubo foi resfriado e 2 mL de uma solução 50:5:45 (v/v/v) de NH₄OH (28-30 % em água):ácido acético glacial:DMSO foram adicionados. O pH da solução final foi ajustado para obter um meio neutro. A solução final ficou com uma concentração de 20 mg/mL. Esta solução final foi filtrada em membrana de 0,45 µm antes de ser injetada no cromatógrafo.

As condições cromatográficas utilizadas para a separação das isoflavonas foram as mesmas citadas na seção 3.1.1. Estas condições foram mantidas inalteradas para observar através do cromatograma se a hidrólise transformou todas as isoflavonas presentes na forma aglicona.

5.1.4. Validação de método na determinação de isoflavonas em grão de soja por HPLC-DAD

O método analítico desenvolvido para determinação de isoflavonas em grão de soja foi validada, de acordo com os seguintes parâmetros: seletividade, precisão, exatidão, linearidade e faixa de trabalho, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e robustez e estabelecidos critérios de aceitabilidade para cada parâmetro^{79,82}. A curva analítica foi construída pelo método de adição

de padrão ⁷⁹ para eliminar os efeitos da matriz na determinação das isoflavonas, na faixa de concentração estudada.

5.1.4.1. Seletividade

Para avaliar e comprovar a seletividade na separação cromatográfica para cada um dos compostos, foram preparadas soluções padrão contendo daidzeína (56 $\mu\text{g mL}^{-1}$), gliciteína (12 $\mu\text{g mL}^{-1}$), e genisteína (37,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$) em uma solução de metanol:água (80:20 v/v) e em solução da amostra de soja fortificada com os padrões. Nos cromatogramas obtidos dos padrões e da amostra fortificada foram comparados os tempos de retenção de cada composto e seus espectros foram avaliados entre os padrões e as amostras quanto às purezas espectrais na faixa de 200 a 400 nm, para confirmar a seletividade na separação das isoflavonas frente a outros compostos presentes no extrato.

5.1.4.2. Linearidade e faixa de aplicação

Para corrigir erros quantitativos possivelmente ocasionados devido à influência da matriz, a curva analítica foi construída pelo método da adição de padrão, que consistiu na adição de diversas concentrações do padrão da substância no extrato após a hidrólise. As curvas foram comparadas com as obtidas diretamente com soluções dos padrões do analito em metanol:água 80:20 (v/v), para verificar os efeitos da matriz na quantificação das isoflavonas.

A linearidade foi verificada primeiramente obtendo-se o coeficiente de correlação linear, r , resultante da linha de regressão de cinco concentrações diferentes, para cada composto, individualmente. As concentrações utilizadas foram: 16,5, 27,5, 55,0, 82,4 e 109,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para daidzeína; 5,4, 9,0, 18,0, 27,0,

36,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para gliciteína; e 15,6, 26,0, 52,0, 77,9, 103,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para genisteína, preparados em solução metanol:água (80:20 v/v) e também adicionando os padrões ao extrato de soja a fim de verificar a influência da matriz na linha de regressão. Para confirmar a linearidade foram construídos os gráficos de linearidade conforme descritos no item 3.2.2..

5.1.4.3. *Limite de detecção e limite de quantificação*

Os limites de detecção e de quantificação foram calculados através do método baseado em parâmetros da curva analítica ⁸⁵, conforme 3.2.3.

5.1.4.4. *Precisão*

As quantidades de isoflavonas na forma aglicona foram avaliadas, simultaneamente, em seis amostras de um mesmo lote e as médias, as estimativas dos desvios padrão, os coeficientes da variação e os limites de repetitividade foram calculados para cada isoflavona, definindo assim qual a precisão do método.

Realizaram-se 3 (três) injeções de cada uma das soluções das amostras preparadas e verificou-se a dispersão de resultados repetidos da mesma amostra, sob condições definidas, para cada isoflavona, conforme ISO 5725 ⁸⁶.

Para o cálculo do limite de repetitividade (r') da precisão, utilizou-se a equação 10 que foi aplicada para cada isoflavona individualmente.

Os valores de limite de repetitividade foram utilizados no cálculo das amostras de soja transgênica e não transgênica para verificar as amplitudes entre as amostras em triplicatas.

5.1.4.5. Exatidão

Foram utilizados os padrões das isoflavonas agliconas, isolados do extrato seco, dissolvidos em solução metanol:água (80:20 v/v). Estas soluções foram adicionadas em seis amostras de soja, após a hidrólise, nas concentrações de 56 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para daidzeína; 12 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para gliciteína; 37,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para genisteína. A exatidão foi avaliada pela recuperação de acordo com a equação 11 e os resultados foram expressos em porcentagem e avaliados pelo teste t_s de Student (equação 12). Os resultados calculados para t_s foram comparados com os valores de t_s tabelados para 95 % de confiabilidade.

5.1.4.6. Robustez

Verificou-se a robustez do método para o preparo das amostras na determinação de isoflavonas grão de soja, aplicando o teste de Youden^{81,89}. Para isto foram avaliados três parâmetros importantes: o tempo de hidrólise, temperatura de hidrólise e volume de ácido clorídrico.

Realizaram-se 8 (oito) ensaios separados para determinar os efeitos da variação dos parâmetros no método.

Elaborou-se uma tabela com os fatores nominais do método representados pelo sinal (+) e as respectivas variações a serem testadas representadas pelo sinal (-) (tabela 19).

Tabela 19: Combinação ensaiada para avaliação da robustez para cada isoflavona.

Fator	Combinação ensaiada							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1) Temperatura de hidrólise	80 °C (+)	80 °C (+)	80 °C (+)	80 °C (+)	90 °C (-)	90 °C (-)	90 °C (-)	90 °C (-)
2) Tempo de hidrólise	2 h (+)	2 h (+)	3 h (-)	3 h (-)	2 h (+)	2 h (+)	3 h (-)	3 h (-)
3) Volume de HCl	1 mL (+)	2 mL (-)	1 mL (+)	2 mL (-)	1 mL (+)	2 mL (-)	1 mL (+)	2 mL (-)
Letras dos resultados	a	b	c	d	e	f	g	h

Os efeitos de cada um dos parâmetros foram calculados de acordo com as equações 13, 14 e 15 e avaliados para um critério de significância de duas vezes o CV em relação ao resultado da precisão do método.

5.1.5. Determinação de isoflavonas em grãos de soja transgênica e não-transgênica

Foram determinados os teores de isoflavonas agliconas em dois diferentes genótipos de soja comercializadas no Brasil, sendo uma não-transgênica (BRS133) e a outra transgênica tolerante ao herbicida glifosato (BRS245RR) derivada da BRS133. Ambas foram plantadas na mesma área de cultivo, região central do estado do Paraná (24°45'S e 49°58'W) durante a primavera de 2005, para reduzir as influências nos resultados geradas pelo tipo de solo e clima.

As amostras de soja BRS133, não transgênica, e a BRS245RR, transgênica, foram gentilmente cedidas pela CLASPAR – Empresa Paranaense de Classificação de Produtos (Paraná, PR, Brasil).

5.2. Resultados e discussão

Inicialmente foram injetadas as amostras de soja não transgênica após a extração sem a hidrólise para verificar quais isoflavonas estavam presentes no grão de soja. O cromatograma apresentou várias formas das isoflavonas, sendo que a daidzeína, gliciteína e genisteína (formas agliconas) estavam em pequenas quantidades. A forma malonil genisteína apresentou um pico com maior concentração e as outras formas glicosídicas apresentaram picos em pequenas quantidades.

A figura 36 apresenta o cromatograma de uma amostra de grão de soja após a extração e sem o procedimento de hidrólise. Pode-se observar que há a necessidade de um tratamento na amostra, pois vários compostos e várias formas de isoflavonas se sobrepõem no cromatograma.

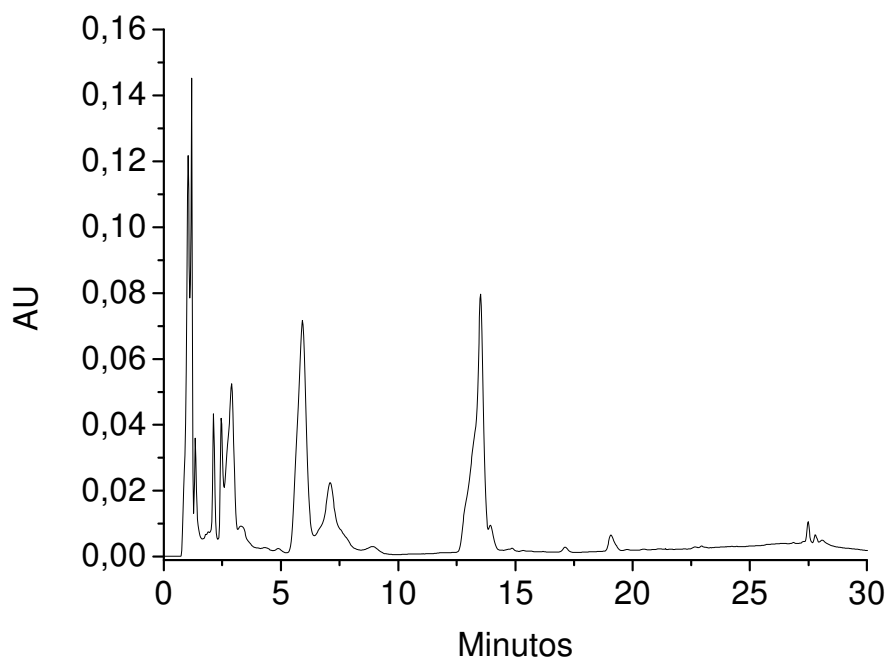


Figura 36: Cromatograma da amostra de grão de soja após extração e sem hidrólise. Condições cromatográficas iguais da figura 5.

As isoflavonas na forma aglicona, que saem em torno de 17 minutos, apareceram no cromatograma em quantidades muito pequenas, sendo difícil sua quantificação nesta concentração.

Algumas formas, como malonil e acetil, não estavam disponíveis como padrões de referência para fazer a identificação e quantificação, aparecendo no cromatograma com impurezas sobrepondo seus picos. Para conhecer a quantidade total de todas as isoflavonas presentes no grão de soja, as formas conjugadas (figura 1) foram transformadas em formas agliconas através da hidrólise ácida. A hidrólise ácida quebra a ligação entre a isoflavona e a parte glicosídica transformando todas as isoflavonas nas formas agliconas. Por outro lado, a hidrólise básica quebra as ligações do éster, removendo grupos ácidos que estão ligados à parte glicosídica da isoflavona. Somente as formas agliconas são ativas nutricionalmente ⁴, as formas malonil e acetil são usualmente convertidas nas respectivas formas agliconas dentro do organismo humano. Neste trabalho, todas as formas das isoflavonas presentes no grão de soja foram extraídas e transformadas em suas respectivas formas agliconas pela hidrólise ácida. O método de extração foi adaptado de Griffith e Collison ³⁵ e a hidrólise ácida foi realizada de acordo com Delmonte *et al.* ¹⁷. Este método tem como vantagem transformar completamente todas as isoflavonas nas formas agliconas além de utilizar um menor volume de solvente. As agliconas foram separadas por HPLC utilizando o método otimizado no capítulo 3.

5.2.1. Validação do método para determinação de isoflavonas em grãos de soja

5.2.1.1. Seletividade

A seletividade foi confirmada pela comparação dos tempos de retenção das isoflavonas com os respectivos padrões e pela pureza cromatográfica. Este procedimento consiste na comparação espectral em três pontos do pico cromatográfico (início, ápice e cauda) dos padrões incorporados nas amostras de grão de soja e com amostras após a extração e hidrólise. O cromatograma da amostra de soja com os padrões incorporados e seus respectivos espectros é mostrado na figura 37.

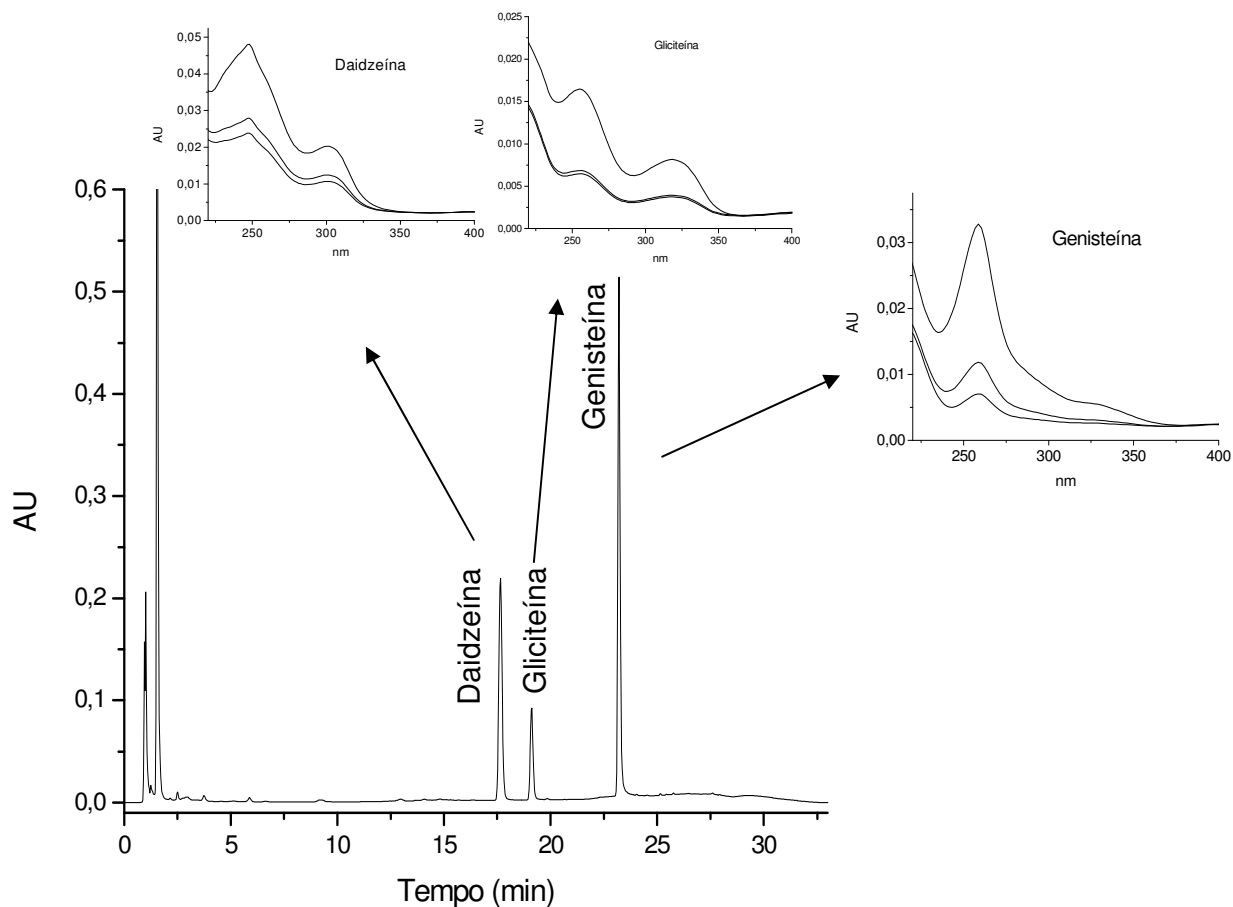


Figura 37: Cromatograma dos padrões de isoflavonas incorporados na amostra de grão de soja com a pureza espectral em três pontos do pico (início, ápice e cauda). Condições cromatográficas iguais da figura 5.

5.2.1.2. Linearidade

A linearidade das isoflavonas em função da concentração foi avaliada nas faixas de concentração de 16,5 – 109,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para daidzeína, de 5,4 – 36,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para gliciteína e de 15,6 – 103,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para genisteína. Para avaliar a influência da matriz, as curvas analíticas foram construídas pelo método de adição de padrão e comparadas com as curvas construídas a partir de soluções dos padrões das isoflavonas em metanol:água 80:20 (v/v). As curvas obtidas podem ser observadas na figura 38 e os valores estabelecidos pelas curvas estão apresentados na tabela 20 e 21.

Tabela 20: Parâmetros das curvas analíticas das isoflavonas preparadas com adição de padrão.

	Faixa de aplicação $\mu\text{g mL}^{-1}$	Coefficiente de correlação r	Coefficiente angular	Coefficiente linear	Desvio padrão do coeficiente linear	Desvio padrão da linha de regressão
Daidzeína	16,5 – 109,9	0,9971	12214	27779	9150	28886
Gliciteína	5,4 – 36,0	0,9977	18867	5181	7841	15474
Genisteína	15,6 – 103,9	0,9972	25685	28607	15949	57655

Tabela 21: Parâmetros das curvas analíticas das isoflavonas preparadas com padrões dissolvidos em metanol:água.

	Faixa de aplicação $\mu\text{g mL}^{-1}$	Coefficiente de correlação r	Coefficiente angular	Coefficiente linear	Desvio padrão do coeficiente linear	Desvio padrão da linha de regressão
Daidzeína	16,5 – 109,9	0,9986	12768	-17246	12653	24980
Gliciteína	5,4 – 36,0	0,9974	18028	-9448	5375	13371
Genisteína	15,6 – 103,9	0,9984	29225	-30158	28640	56544

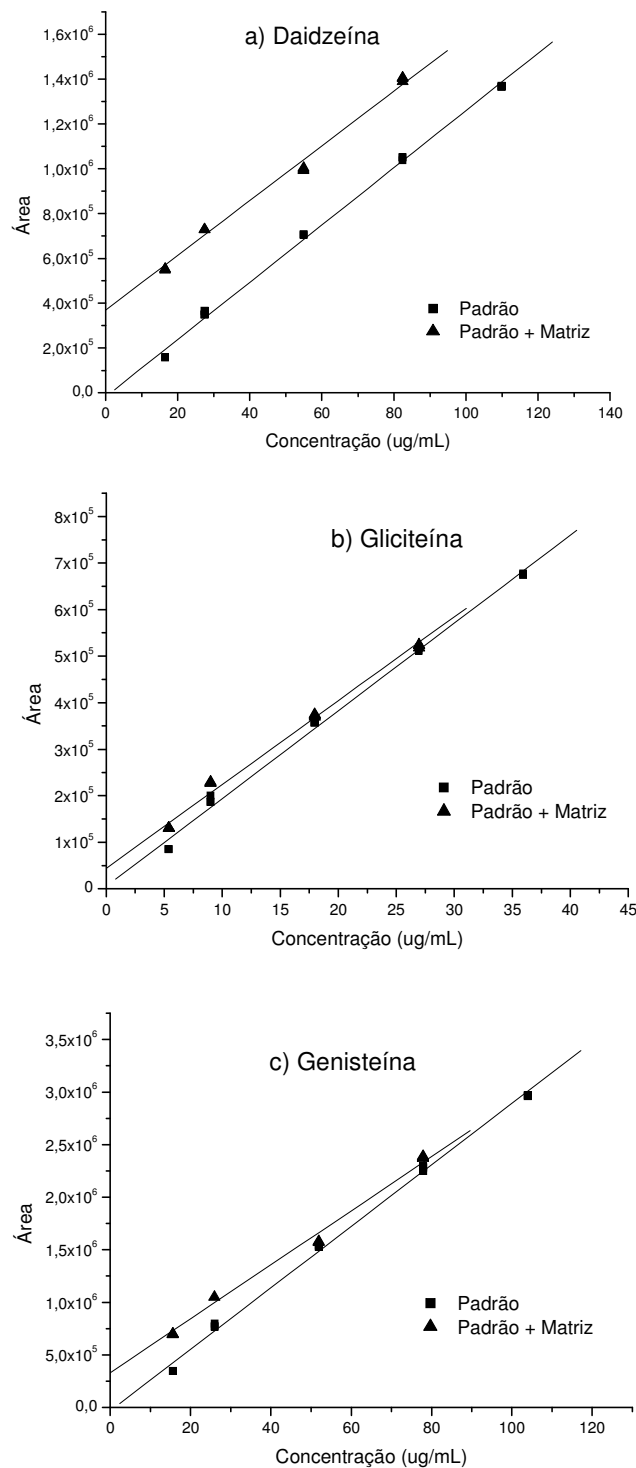


Figura 38: Curvas analíticas dos padrões dissolvidos em metanol:água 80:20 (v/v) e dos padrões incorporados em amostra de grão de soja, na faixa de concentração de 16,5 – 109,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para daidzeína, 5,4 – 36,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para gliciteína e 15,6 – 103,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para genisteína.

Todas as curvas analíticas apresentaram coeficiente de correlação maior que 0,99 para as isoflavonas. Entretanto as curvas da genisteína apresentaram coeficientes angulares menores para o método de adição de padrão comparados à curva preparada somente em solução metanol:água, indicando que há influência da matriz na quantificação. Por este motivo, para a quantificação das isoflavonas na soja, foram empregadas as curvas analíticas preparadas pelo método de adição de padrão, já que a adição de quantidades conhecidas de padrões nos extratos permite subtrair as quantidades de isoflavonas presentes na matriz da soja. Além disso, este método evita os erros que poderiam ocorrer se fossem aplicadas as curvas preparadas somente em solução metanol:água.

As curvas analíticas foram construídas com a amostra de soja não-transgênica e a mesma curva foi empregada para a quantificação das isoflavonas na soja transgênica, mas subtraindo as quantidades das isoflavonas presentes na matriz.

Para confirmar a linearidade das curvas, foram construídos os gráficos de linearidade (figura 39), os quais serviram para confirmar a dispersão dos pontos e confirmar a linearidade na faixa de trabalho da curva analítica com a matriz incorporada. Pode-se observar que todos os pontos da curva estão dentro do intervalo linear (definido com 15 % de tolerância).

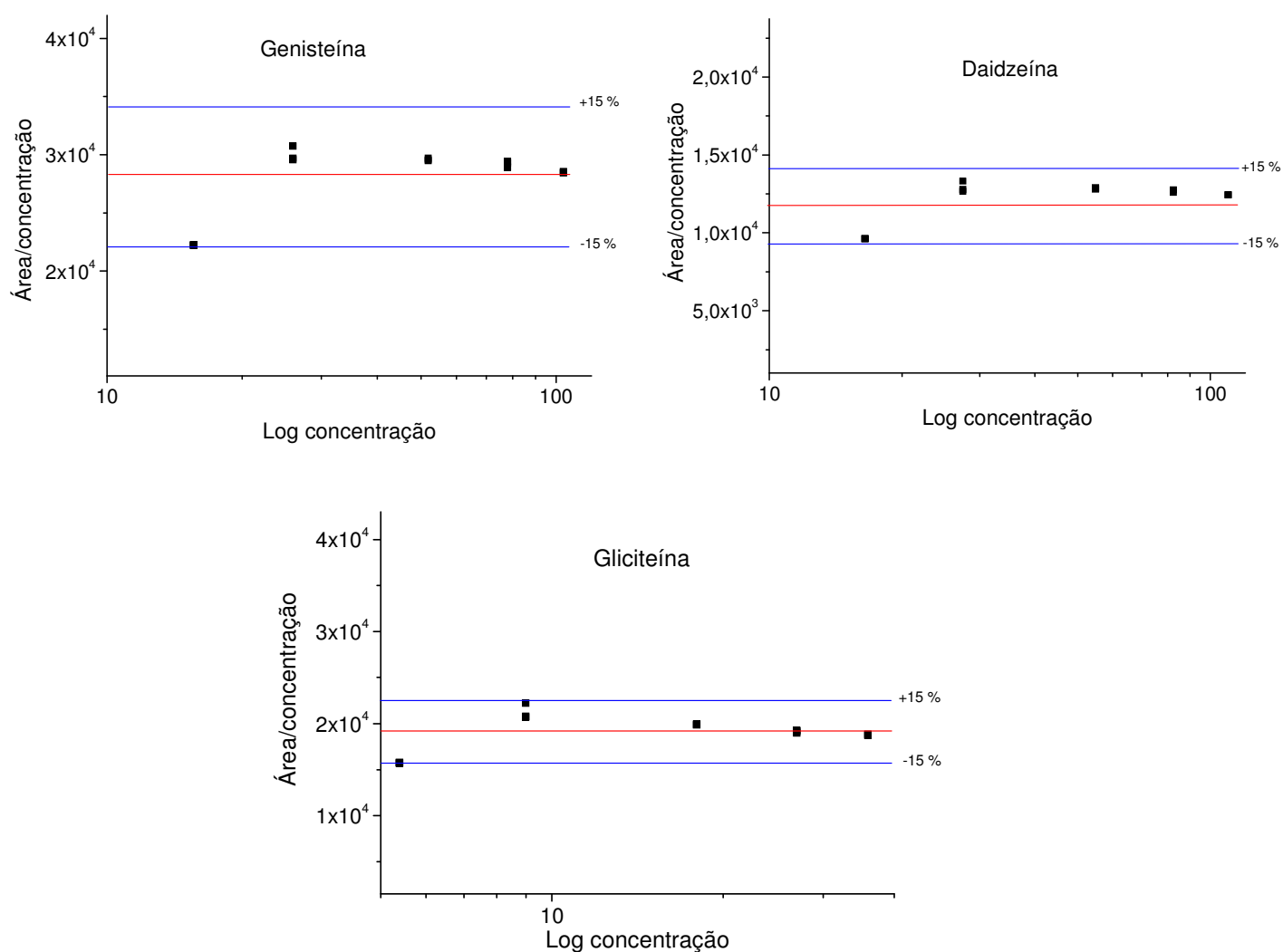


Figura 39: Gráfico da linearidade das isoflavonas agliconas daidzeína, genisteína e gliciteína, na faixa de concentração estudada.

5.2.1.3. *Limite de detecção e limite de quantificação*

Para o cálculo de LD e de LQ, foram usados os parâmetros das curvas analíticas, de acordo com as equações 7 e 8. A tabela 22 indica os valores de LD e de LQ para cada isoflavona na forma aglicona estudada, obtidos a partir das

curvas analíticas preparadas com as soluções dos padrões adicionadas aos extratos de soja.

Tabela 22: Valores de LD e LQ do instrumento e do método, determinados pelo método baseado nos parâmetros da curva analítica com adição de matriz.

Isoflavonas	LD do instrumento ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LQ do instrumento ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LD do método (mg/100 g)	LQ do método (mg/100 g)
Daidzeína	2,5	7,4	12,5	37,0
Gliciteína	0,9	2,9	4,5	14,5
Genisteína	2,0	6,1	10,0	30,5

O LD e LQ do instrumento foram obtidos através de soluções padrões, pois representam a detectabilidade do equipamento para os analitos em estudo e, por isso, são representados em unidades de massa/volume ($\mu\text{g mL}^{-1}$). Já o LD e LQ do método representam a detectabilidade do método e levam em consideração o preparo da amostra. Assim, como a solução final de amostra ficou na concentração de 20 mg mL^{-1} , para obter o valor de LD e LQ para o método (mg/100 g), os valores obtidos no instrumento foram multiplicados por cinco.

5.2.1.4. Exatidão

A exatidão foi avaliada pela recuperação (R) e expressa em termos de porcentagem das isoflavonas quantificadas em relação à quantidade acrescentada na etapa de fortificação. Os valores encontrados para a recuperação foram submetidos ao teste t_s de Student e comparados com valores tabelados. A tabela 23 apresenta os resultados da exatidão assim como os valores calculados para 95 % de confiabilidade.

Tabela 23: Valores da recuperação das isoflavonas agliconas em % e valores calculados para o test t_s de Student.

	Daidzeína	Gliciteína	Genisteína
Recuperação R (n=6) (%)	98,7	101,4	101,7
Coeficiente de variação CV (%)	1,9	3,7	4,1
$t_{\text{Calculado}}$	0,98	0,93	1,02
$t_{\text{Tabelado: (95\%)}}$	2,262	2,262	2,262

Como os valores calculados para t foram menores que os valores tabelados, demonstrou que o método apresentou exatidão dentro de um intervalo de confiança de 95 % para uma distribuição normal do t_s de Student.

5.2.1.5. Precisão

As quantidades de isoflavonas na forma aglicona foram avaliadas, simultaneamente, em seis amostras de um mesmo lote e as médias, as estimativas de desvios padrão, os coeficientes da variação e os limites do repetitividade foram calculados. Os resultados analíticos e estatísticos para cada isoflavona na forma aglicona, após a extração e a hidrólise ácida, estão na tabela 24. Os valores do limite do repetitividade permitem a avaliação de amostras rotineiras e a verificação de diferenças significativas com 95 % de confiança.

Tabela 24: Resultados estatísticos dos teores de isoflavonas agliconas de amostras de soja para determinação da precisão no nível de repetitividade.

amostras (n=6)	Daidzeína mg/100 g	Gliciteína mg/100 g	Genisteína mg/100 g
Média, \bar{x}	184,8	15,3	87,3
Estimativa do desvio padrão, s_r	3,2	0,3	1,4
Coeficiente de variação CV (%)	1,7	1,7	1,6
Limite de repetitividade r'	9,0	0,7	4,5
Limite de repetitividade r'_{CV} (%)	4,9	4,7	5,0

O método demonstrou ser preciso dentro de um intervalo de confiança de 95% para uma distribuição normal t_s de Student.

5.2.1.6. Robustez

A robustez, avaliada pelo teste de Youden ^{81,89}, permitiu ordenar a influência de cada uma das variações nos resultados finais. Estas alterações indicaram se as variações no método referentes à temperatura de hidrólise, tempo de hidrólise, e volume de ácido clorídrico, mudavam significativamente os valores obtidos para a quantificação das isoflavonas.

O teste aplicado indicou nenhum efeito significativo entre as circunstâncias analíticas estabelecidas para o método e para as variações nos parâmetros da hidrólise, dentro do critério de duas vezes o CV do método. A tabela 25 mostra os resultados de % de recuperação para os diferentes ensaios e a tabela 26 apresenta os resultados expressos como coeficiente de variação (%) para cada isoflavona obtidos nos ensaios do teste de Youden e obtidos na avaliação da precisão do método

Tabela 25: Resultado expressos em % de recuperação das combinações ensaiadas na avaliação da robustez para cada isoflavona.

Isoflavonas	COMBINAÇÃO ENSAIADA							
	a	b	c	d	e	f	g	h
Daidzeína	98,8	98,5	99,2	99,3	98,8	98,3	98,7	99,9
Gliciteína	100,3	99,2	100,1	100,2	98,9	99,1	100,2	100,1
Genisteína	98,9	99,5	99,8	99,1	100,2	99,7	100,1	98,9

Tabela 26: Comparação entre os efeitos avaliados no teste de Youden com a precisão do método expressos como coeficiente de variação (%) para cada isoflavona aglicona.

	Efeito dos parâmetros			
	CV do método (%)*	Temperatura de hidrólise	Tempo hidrólise	Volume HCl
Daidzeína	1,7	0,1	2,7	0,5
Gliciteína	1,7	1,5	3,1	0,9
Genisteína	1,6	1,3	0,4	1,8

* Coeficiente de variação obtido na avaliação da precisão do método (tabela 24).

Como os efeitos estudados não apresentaram valores maiores que duas vezes o CV em relação aos resultados encontrados na precisão do método, o método demonstrou ser robusto frente às variações avaliadas.

5.2.2. Teores das isoflavonas nas variedades transgênica e não-transgênica

Atualmente há uma grande polêmica sobre o uso de soja transgênica e não-transgênica na alimentação. Os produtos transgênicos são ainda uma realidade muito recente, não havendo literatura consolidada sobre seu uso ou relação dos teores de compostos nas diferentes variedades. Sabe-se que as alterações genéticas nos organismos geram modificações no seu metabolismo e,

conseqüentemente, em todos elementos que constituem este ser. A literatura não apresenta até o momento quantificação de isoflavonas em sojas transgênicas comparadas com sojas não transgênicas. Garci-Villalba *et al.*⁹⁷ usaram eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massas para identificar os principais componentes encontrados em grãos de soja transgênica e não transgênica plantados em uma mesma região e época do ano. Em geral, os mesmos compostos foram encontrados nas duas variedades. Entretanto, o foco daquele trabalho foi a identificação e comparação entre os perfis obtidos nas sojas transgênica e não-transgênica, sem ser realizada qualquer quantificação destes compostos.

A literatura ainda não apresenta valores para as formas agliconas totais presentes na soja transgênica, mas os teores para isoflavonas aglicona em soja não-transgênica, entre 0,1 a 0,4%, são próximos aos encontrados neste trabalho¹⁶. A tabela 27 mostra os resultados obtidos de experimentos realizados de uma amostragem laboratorial de seis amostras independentes com duas variedades de soja. As quantidades de isoflavonas agliconas totais (daidzeína, gliciteína e genisteína) na soja transgênica (BRS245RR) e não-transgênica (BRS133), plantadas em uma mesma região (norte do estado do Paraná) e no mesmo período do ano (agosto de 2006) foram de: 228,2±13,8 mg/100g e 283,5±10,7 mg/100g, respectivamente.

Tabela 27: Resultados obtidos em mg/100g das amostras de soja transgênica e não-transgênica.

	Soja Transgênica (BRS245RR)			Soja Não-transgênica (BRS133)		
	\bar{x} (n=6)	s	CV (%)	\bar{x} (n=6)	s	CV (%)
Daidzeína	145,7	8,3	5,7	180,6	7,1	4,0
Gliciteína	15,4	0,9	6,0	15,6	0,7	4,7
Genisteína	67,2	5,3	7,9	87,3	4,1	4,7
Total isoflavonas	228,2	13,2	5,8	283,5	10,2	3,6

Pode-se observar através dos cromatogramas (figura 40a e 40b) e na tabela 27, que as quantidades das isoflavonas daidzeína e genisteína foram maiores para a soja não-transgênica. É importante esclarecer que estes resultados não garantem uma identificação de uma determinada variedade, apenas apresentam os resultados dos teores das isoflavonas encontradas.

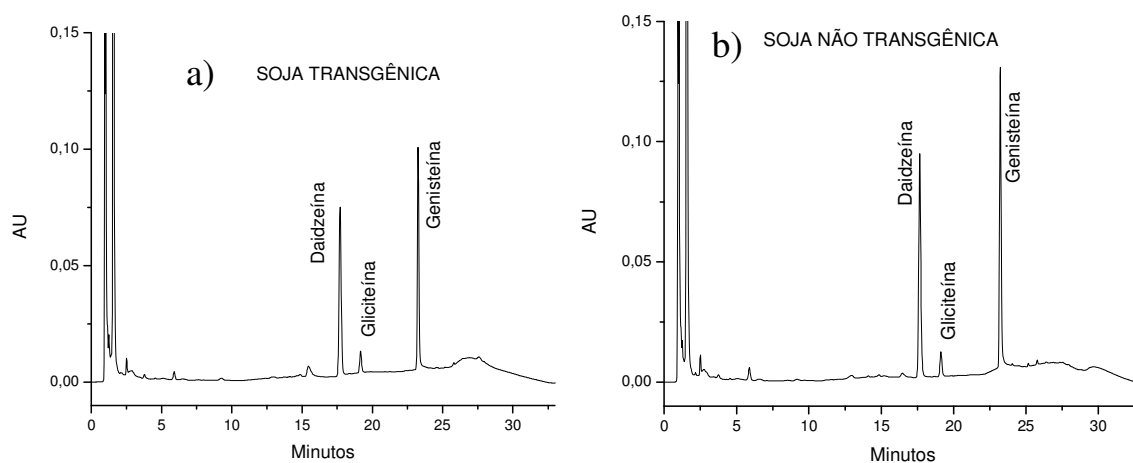


Figura 40: Cromatogramas das amostras de soja transgênica (a) e não-transgênica (b). Condições cromatográficas iguais as da figura 5.

5.3. Conclusões parciais

Com relação ao método utilizado para extração das isoflavonas da soja, este foi adaptado do método de Griffith e Collison ³⁵, o qual emprega uma pequena quantidade de solvente. Após a extração, as isoflavonas foram hidrolisadas em meio ácido. A extração e hidrólise das amostras de grão de soja foram também realizadas segundo método oficial da AOAC ⁴⁸, que utiliza extração com metanol em meio aquoso e hidrólise alcalina. Este método não foi muito eficiente, apresentando teores de isoflavonas menores que os encontrados pelo método aplicado neste trabalho.

A sequência extração-hidrólise-HPLC-DAD aplicada aqui, apresentou resultados estatisticamente aceitáveis para determinação de isoflavonas aglicona em grãos de soja, como foi observado pelos resultados da validação do método.

Foi confirmado através das curvas analíticas com adição de padrão, que há um efeito da matriz na quantificação das isoflavonas.

As quantidades totais de isoflavonas nas variedades transgênica e não-transgênica em grão de soja cultivadas em condições climáticas e de solo similares foram distintas. Entretanto, outros componentes presentes no grão de soja precisam ser determinados quantitativamente, assim como devem ser estudadas plantas oriundas de outras regiões, antes que seja possível apresentar uma conclusão definitiva sobre as diferenças efetivas de isoflavonas entre grãos de soja transgênica e não-transgênica.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foram desenvolvidos e validados dois métodos para determinação de isoflavonas em soja. Um dos métodos consistiu na determinação de isoflavonas em extrato seco de soja, sendo que esta pode ser utilizada no controle de qualidade da matéria prima e dos produtos a base de extrato seco de soja. Este método também serviu como suporte para a modelagem matemática na transposição para a escala preparativa na purificação das isoflavonas.

O método desenvolvido usando a cromatografia líquida preparativa foi eficiente (rendimento médio de 85 %) para purificação das isoflavonas presentes no extrato seco de soja padronizado, comprovando que a técnica pode ser utilizada na produção de padrões de isoflavonas.

A transposição de escala analítica para preparativa foi obtida em condições de equilíbrio linear (equilíbrio termodinâmico e isoterma linear) para a mistura de quatro isoflavonas. No entanto, nem todos os compostos apresentaram um comportamento linear quando a separação cromatográfica foi realizada em concentrações preparativas. A daidzeína e a glicitina apresentaram perfil da isoterma de Langmuir somente até uma determinada massa, sendo que, para produção de maiores quantidades de cada composto, é necessário um estudo das isotermas de adsorção individuais para estabelecer o limite de sobrecarga de injeção.

As isoflavonas purificadas e obtidas por cromatografia líquida preparativa são muito similares aos padrões de referência comercializados e reconhecidos internacionalmente. Verificou-se pela caracterização dos compostos, feito a partir dos espectros obtidos pelo detector de absorbância por arranjo de diodos e por espectrometrias de massas e de ressonância magnética nuclear, que os teores

dos compostos obtidos apresentaram pureza de: 93,11 % para daidzina, 99,8 % para daidzeína, 89,47 % para genisteína e 87,66 % para glicitina. O rendimento do processo produtivo de padrões de isoflavonas foi de 84,8 % para daidzina, 81,3 % para glicitina, 83,0 % para daidzeína e 84,7 % para daidzeína, levando em consideração as perdas no processo e os cortes das fatias durante a separação das isoflavonas no processo preparativo, permitindo assim seu uso como padrões em análises cromatográficas rotineiras. Estes padrões produzidos demonstraram ser 80 % mais baratos que os padrões de referência comercialmente disponíveis, sendo o processo viável para produção destes padrões.

Os padrões obtidos com a purificação foram empregados na quantificação de isoflavonas em amostras de soja transgênica e não-transgênica. O método analítico desenvolvido e validado para determinação de isoflavonas agliconas em grãos de soja demonstrou ser simples, eficiente e econômica, uma vez que é possível transformar todas as formas glicosídicas, que estão em pequenas quantidades na soja, na forma aglicona, diminuindo o custo das análises por utilizar somente três dos padrões de isoflavonas.

Aplicando o método para a determinação das isoflavonas agliconas em grão de soja transgênica e não-transgênica cultivadas sob mesmas condições climáticas e de solo, determinou-se que tanto as quantidades individuais quanto o total das isoflavonas agliconas foram diferentes. Entretanto, outros estudos devem ser realizados a fim de que possa obter conclusões definitivas sobre as diferenças quantitativas entre estes dois tipos de soja.

7. REFERÊNCIAS

1. Souci, S.W.; Fachmann, W.; Kraut, H.; Food Composition and Nutrition Tables. Stuttgart: Medpharm Scientific Publishers, **1994**.
2. Knight, D. C.; Eden, J. A.; A review of the clinical effects of phytoestrogens, *Obstet. Gynecol.*, 87, **1996**, 897.
3. Pascual-Teresa, S.; Hallund, J.; Talbot, D.; Schroot, J.; Willians, C.M.; Bugel, S.; Cassidy, A.; Absorption of isoflavones in humans: effects of food matrix and processing. *J. Nutr. Biochem*, 17, **2006**, 257.
4. Ferrari, R.A.; Demiate, I.M.; Soybean isoflavones – a short review, *Biol. Health Sci.*, 7, **2001**, 39.
5. Izumi, T.; Nasu, A.; Kataoka, S.; Tokutake, S.; Obata, A.; Tobe, K.; An efficient preparation of acetyl isoflavone glucoside, *Chem. Pharm. Bull.*, 45, **1997**, 1593.
6. Adlercreutz, H.; Honjo, H.; Higashi, A.; Fotsis, T.; Hamalainen, E.; Hasegawa, T.; Okada, H.; Urinary excretion of lignans and isoflavone phytoestrogens in Japanese men and women consuming a traditional diet. *Am. J. Clin. Nutr.*, 54, **1991**, 1093.
7. Clarkson, T. B.; Anthony, M. S.; Hughes, C. L.; Estrogenic soybean isoflavones and chronic disease, *Trends Endocrinol. Metabol*, 6, **1995**, 11.
8. Watanabe, S.; Koessel, S.; Colon cancer: an approach from molecular epidemiology, *J. Epidemiol.*, 3, **1993**, 47.
9. Severson, R. K.; Nomura, A.Y.M.; Grove, J. S.; Stemmerman, G. N.; A prospective study of demographics and prostate cancer among men of Japanese ancestry in Hawaii, *Cancer Res.*, 49, **1989**, 1857.
10. Anderson, J.J.B.; Anthony, M.S.; Cline, J.M.; Washburn, S.A.; Garner, S.C.; Health potential of soy isoflavones for menopausal women, *Public Health Nutr.*, 2, **1999**, 489.
11. Kurzer, M.S.; Hormonal effects of soy isoflavones: studies in premenopausal and postmenopausal women. *J. Nutr.*, 130, **2000**, 660.
12. Nain, M.; Gestetner, B.; Zilkah, S.; Soybean isoflavones: characterization, determination, and antifungal activity, *J. Agric. Food Chem.*, 22, **1974**, 806.
13. Rostagno, M.A.; Palma, M.; Barroso, C.G.; Solid-phase extraction of soy isoflavones, *J. Chromatogr. A*, 1076, **2005**, 110.

14. Bowey, E.; Adlercreutz, H.; Rowland, I.; Metabolism of isoflavones and lignans by the gut microflora: study in germ-free and human flora associated rats, *Food Chem. Toxicol.*, 41, **2003**, 631.
15. Izumi, T.; Piskula, M.K.; Osawa, O.; Obata, A.; Tobe, K.; Saito, M.; Bataoba, S.; Kubota, Y.; Kikuchi, M.; Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in high amounts than their glucosides in humans, *J. Nutr.*, 130, **2000**, 1695.
16. Lee, Y.; Kim, J.; Zheng, J.; Row, K.H.; Comparisons of isoflavones from Korean and Chinese soybeans and processed products, *Biochem. Eng. J.* 36, **2007**, 49.
17. Delmonte P.; Perry P.; Rader J.I.; Determination of isoflavones in dietary supplements containing soy, red clover and kudzu: Extraction followed by basic or acid hydrolysis, *J. Chromatogr. A*, 1107, **2006**, 59.
18. Stürtz, M.; Lander, V.; Schmid, W.; Winterhalter, P.; Preparative isolation of isoflavones from soy and red clover, *Mol. Nutr. Food Res.*, 50, **2006**, 356.
19. <<http://www.ambientebrasil.com.br/composer.php3?base=./agropecuarioindex.html&conteúdo=./agropecuario/produtosorg.html#produ>> acessado em 07/06/2008.
20. <<http://revistagloborural.globo.com/GloboRural/0,6993,EEC354950-1641,00.html>> acessado em 06/06/2008.
21. <<http://www.agirazul.com.br/123/noticias/000000a3.htm>> acessado em 06/06/2008.
22. <http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=294&cod_pai=17> acessado em 06/06/2008.
23. de Amarante Jr., O. P.; dos Santos, T. C. R.; Brito, N. M.; Ribeiro, M. L.; Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação, *Quim. Nova*, 25, **2002**, 589.
24. <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/CultivodoFeijaoComumRO/daninhas.htm>> acessado em 06/06/2008.
25. <<http://www.abiove.com.br/>> acessado em 06/06/2008.
26. <http://www.greenpeace.org/raw/content/brasil/documentos/transgenicos/greenpeacebr_040830_transgenicos_documento_soja_china_port_v1.pdf> acessado em 06/06/2008.

- 27.<<http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2004/julho/bn.2004-11-25.1804002449/?searchterm=soja%20transgênica>> acessado em 06/06/2008.
- 28.Pizzutti, I.R.; Validação de métodos multirresíduos de extração e desenvolvimento de método de purificação por GPC para análise de resíduos de pesticidas em soja utilizando GC-MS, GC-MS/MS e LC-MS/MS, **Tese de Doutorado em Química**, UFSM, Santa Maria, RS, **2006**.
- 29.<<http://www.idec.org.br/noticia.asp?id=45175706>> acessado em 07/06/2008.
- 30.<http://www.paginarural.com.br/noticias_detalhes.asp?subcategoriaid=74&id=20438> acessado em 07/06/2008.
- 31.<<http://www.ecoagencia.com.br/index.php?option=content&task=view&id=868&Itemid=2>> acessado em 21/09/2005.
- 32.Boye, J.I., Protein-polyphenol interactions in fruit juices, *Recent Res. Devel. Agric. Food Chem.*, 3, **1999**, 85.
- 33.Frank, A.A.; Custer, L.J., Cerna, C.M.; Narala, K.K., Quantitation of phytoestrogens in legumes by HPLC. *J. Agric. Food Chem.*, 42, **1994**, 1905.
- 34.Abassi, P.A.; Graham, M.Y.; Graham, T.L.; Effects of soybean genotype on the glyceollin elicitation competency of cotyledon tissues to *Phytophthora sojae* glucan elicitors, *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 59, **2001**, 95.
- 35.Griffith A.P.; Collison, M.W.; Improved methods for the extraction and analysis of isoflavones from soy-containing foods and nutritional supplements by reversed-phase high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 913, **2001**, 397.
- 36.Penalvo, J.L.; Nurmi, T.; Adlercreutz, H.; A simplified HPLC method for total isoflavones in soy products, *Anal. Food Chem*, 87, **2004**, 297.
- 37.Klejdus, B.; Mikelová, R.; Adam V.; Zehnálek, J.; Vacek, J.; Kizek, R.; Kubán, V.; Liquid chromatographic-mass spectrometric determination of genistein and daidzin in soybean food samples after accelerated solvent extraction with modified content of extraction cell, *Anal. Chim. Acta*, 517, **2004**, 1.

38. Achouri, A.; Boye, J.I.; Belanger, D.; Soybean isoflavones: Efficacy of extraction conditions and effect of food type on extractability, *Food Res. Int.*, 38, **2005**, 1199.
39. Wiesman, H.C.; Clarke, D.B.; Barnes, K.A.; Bowey, E.; Isoflavone aglycone and glucoconjugate of high- and low-soy U.K. foods used in nutritional studies, *J. Agric. Food Chem.*, 50, **2002**, 1404.
40. Barnes, S.; Kirk, M.; Coward, L., Isoflavones and their conjugates in soy foods: extraction conditions and analysis by HPLC-MS, *J. Agric. Food Chem.*, 42, **1994**, 2466.
41. Liggins, J.; Bluck, L.J.C.; Coward, W.A.; Bingham, S., Extraction and quantification of daidzein and genistein in food, *Anal. Biochem*, 264, **1998**, 1.
42. Liggins, J.; Bluck, L.J.C.; Runswick, S.; Atkinson, C.; Coward, A.; Bingham, S., Daidzein and genistein content of fruits and nuts, *J. Nutr. Biochem.*, 11, **2000**, 326.
43. Franke, A.A.; Cluster, L.J.; Cerna, C.M.; Narala, K.K., Quantitation of phytoestrogens in legumes by HPLC, *J. Agric. Food Chem.*, 42, **1994**, 1905.
44. Hutabarat, L.S.; Mulholland, M. Greenfield, H., Development and validation of an isocratic high-performance liquid chromatography method for quantitative determination of phytoestrogens in soya bean, *J. Chromatogr. A*, 795, **1998**, 377.
45. Wang, H., & Murphy, P. A., Mass balance study of isoflavones during soybean processing, *J. Agric. Food Chem.*, 44, **1996**, 2377.
46. Rostagno, M.A.; Araújo, J.M.A.; Sandi, D., Supercritical fluid extraction of isoflavones from soybean flour, *Food Chem.*, 78, **2002**, 111.
47. Rostagno, M.A.; Palma, M.; Barroso, C.G., Pressurized liquid extraction of isoflavones from soybeans, *Anal. Chim. Acta*, 522, **2004**, 169.
48. Rijke, E.; Out, P.; Niessen, W.M.A.; Arise, F.; Gooijer, C.; Brinkman, U.A.T.; Analytical separation and detection methods for flavonoids, *J. Chromatogr. A*, 1112, **2006**, 31.
49. Official Methods of Analysis, 17th ed., Method 2001.10, AOAC International, Gaithersburg, MD, 2000, (Chapter 45.4.14).

50. Coward, L.; Smith, M.; Kirk, M.; Barnes, S.; Chemical modification of isoflavones in soyfoods during cooking and processing, *Am. J. Clin. Nutr.*, **68**, **1998**, 1486.
51. Klump, S. P. A.; McDonald, J. L.; Ballam, J. M.; Determination of isoflavones in soy selected foods containing soy by extraction, saponification, and liquid chromatography: collaborative study., *JAOAC Int.*, **84**, **2001**, 1865.
52. Setchell, D. R. K.; Brown, N. M.; Zimmer-Nechemias, L.; Brashear, W.T.; Wolfe, B. E.; Kirschner, A. S.; Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.*, **76**, **2001**, 447.
53. Wang, H. J.; Murphy, P. A.; Isoflavone content in commercial soybean foods. *J. Agric. Food Chem.*, **42**, **1994**, 1674.
54. Wiseman, H. C.; Clarke, D. B.; Barnes, K. A.; Bowey, E.; Isoflavone aglycones and glucoconjugates of high- and low-soy U.K. foods used in nutritional studies. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, **2002**, 1404.
55. Eldridge, A. C.; High-performance liquid chromatography separation of soybean isoflavones and their glucosides. *J. Chromatogr. A*, **234**, **1982**, 494.
56. Murphy, P. A.; Separation of genistin, daidzin and their aglucones, and coumesterol by gradient high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, **211**, **1981**, 166.
57. Farmakalidis, E.; Murphy, P. A.; Semi-preparative high performance liquid chromatographic isolation of soybean isoflavones. *J. Chromatogr. A*, **295**, **1984**, 510.
58. Murphy, P. A.; Song, T.; Buseman, G.; Barua, K.; Isoflavones in soy-based infant formulas. *J. Agric. Food Chem.*, **45**, **1997**, 4635.
59. Franke, A. A.; Hankin, J. H.; Yu, M. C.; Maskarinec, G.; Low, S. H.; Custer, L. J.; Isoflavone levels in soy foods consumed by multiethnic populations in Singapore and Hawaii. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, **1999**, 977.
60. Hsieh, H. C.; Kao, T. H.; Chen, B. H.; A fast HPLC method for analysis of isoflavones in soybean. *J. Liq. Chromatogr. and Rel. Technol.*, **27**, **2004**, 315.

- 61.Kao, T. H.; Chen, B. H.; An improved method for determination of isoflavones in soybean powder by liquid chromatography, *Chromatographia*, 56, **2002**, 423.
- 62.Song, T.; Barua, K.; Buseman, G.; Murphy, P. A.; (1998). Soy isoflavones analysis: quality control and a new internal standard. *Am. J. Clin. Nutr.*, 68, **1998**, 1474.
- 63.César, I.C.; Braga, F.C.; Soares, C.D.V.; Nunan, E.A.; Pianetti, G.A.; Condessa, F.A.; Barbosa, T.A.F.; Campos, L.M.M.; Development and validation of a RP-HPLC method for quantification of isoflavone aglycones in hydrolyzed soy dry extracts, *J. Chromatogr. B*, 836, **2006**, 74.
- 64.Mazzei, J.L.; d'Avila, L.A., Chromatographic models as tools for scale-up of isolation of natural products by semi-preparative HPLC, *J. Liq. Chromatogr. and Rel. Technol.*, 26, **2003**, 177.
- 65.Guiochon, G.; Preparative liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, 965, **2002**, 129.
- 66.Jönsson, J.; Nomenclature for non-linear chromatography, *Pure Appl. Chem.*, 68, **1996**, 1591.
- 67.Heuer, C.; Hugo, P.; Mann, G.; Seidel-Morgenstern, A., Scale-up in preparative chromatography, *J. Chromatogr. A*, 752, **1996**, 19.
- 68.Van Deemter, J.J.; Zuiderweg, F.J.; Klinkenberg, A.; Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography, *Chem. Eng. Sci.*, 5, **1956**, 271.
- 69.Kaltenbrunneer, O.; Jungbauer, A.; Yamamoto, S.; Prediction of the preparative chromatography performance with a very small column; *J. Chromatogr. A*, 760, **1997**, 41.
- 70.Seshadri, S.; Deming, S.N.; Simulation of component interactions in high-performance liquid chromatography, *Anal. Chem.*, 56, **1984**, 1567.
- 71.Czok, M.; Guiochon, G.; The physical sense of simulation models of liquid chromatography: propagation through a grid or solution of the mass balance elution, *Anal. Chem.*, 62, **1990**, 189.
- 72.Liu, H.M.; Kaczmarek, K.; Cavazzini A.; Modeling of preparative reversed-phase HPLC of insulin, *Biotechnol. Prog.*, 18, **2002**, 796.
- 73.Guiochon, G.; Felinger, A.; Shirazi D.G.; Katti A.M.; Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chromatography, 2nd edition, Elsevier, (San Diego, CA) – **2006**.

- 74.Ma, Z.; Guiochon, G.; Whole-column computer simulation in nonlinear liquid chromatography. The traveling characteristics of the concentration waves of a binary mixtures, *Anal. Chem.*, 62, **1990**, 2330.
- 75.Levin, S.; Consideration in Scaling Up a Chromatographic Run. Bio-Log Fórum, 1997. <http://www.forumsci.co.il/hplc/prep/index.htm> acessado em 10/07/2007.
- 76.Jageland, P.; Magnusson, J.; Bryntesson, M.; Optimisation of industrial-scale high-performance liquid chromatography applications using a newly developed software, *J. Chromatogr. A*, 658, **1994**, 497.
- 77.Gu, T.; Mathematical modeling and scale up of liquid chromatography. Berlin: Springer-Verlag Telos, **1995**.
- 78.Felinger, A.; Guiochon, G., Comparing the optimum performance of the different modes of preparative liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, 796, **1998**, 59.
- 79.Ribani, M.; Bottoli, C.B.G.; Collins, C.H.; Jardim, I.C.S.F.; Melo, L.F.C.; Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos, *Quim. Nova*, 27, **2004**, 771.
- 80.United States Pharmacopeia (USP) Convention, US Pharmacopeia 30, NF 25, Rockville, **2007**.
- 81.Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO), Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008, **2003**.
- 82.Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), *Resolução RE nº 899 de 29/05/2003*.
- 83.Huber, L.; Validation of analytical methods: review and strategy, *LC-GC Int.*, 11, **1998**, 96.
- 84.Cassidy, R.; Janoski, M.; Is your calibration curve linear?, *LC-GC*, 10, **1992**, 692.
- 85.Ribani, M.; Collins, C.H.; Bottoli, C.B.G.; Validation of chromatographic methods: Evaluation of detection and quantification limits in the determination of impurities in omeprazole, *J. Chromatogr. A*, 1156, **2007**, 201.
- 86.International Standards Organization – ISO 5725-6, Accuracy (trueness and precision) of Measurement Methods and Results - Use in Practice of

- Accuracy Values, International Organization for Standardization, Geneva, **1994**.
87. Miller, J.C.; Miller, J.N.; Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry, 4th ed., Chichester: Ellis Horwood, **2002**.
 88. Eurachem Working Group, *The Fitness for Purpose of Analytical Methods, A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*, **1998**.
 89. Youden, W.J.; Steiner E.H. *The Association of Official Analytical Chemists*, Washington, DC, **1975**.
 90. Lee, S.J.; Yan, W.; Ahn, J.K.; Chung, I.M.; Effects of year, site, genotype and their interactions on various soybeans isoflavones, *Field Crops Res.*, **81**, **2003**, 181.
 91. Nicoud, R.M.; Sedel-Morgenstern, A.; Adsorption isotherms: experimental determination and application to preparative chromatography, *Isolation Purification*, **2**, **1996**, 165.
 92. Kao, T.H.; Chen, B.H.; An improved method for determination of isoflavones in soybean powder by liquid chromatography, *Chromatographia*, **56**, **2002**, 423.
 93. Hirahura, K.; Morita, M.; Nakajima, K.; Sugama, K.; Takagi, K.; Niitsu, K.; Ikeya, Y.; Maruno, M.; Okada, M.; Phenolic glucosides from the root of *Pueraria Lobata*, *Phytochemistry*, **46**, **1997**, 921.
 94. Park, H.; Park, J.; Moon, J.; Lee, K.; Jung, W.; Oh, S.; Lee, H.; Isoflavone glycosides from the flowers of *Pueraria thunbergiana*, *Phytochemistry*, **51**, **1999**, 147.
 95. Chang, T.; Ding, H.; Tai, S.S.; Wu, C.; Mushroom tyrosinase effects of isoflavones isolated from soygerm koji fermented with *Aspergillus oryzae* BCRC 32288, *Food Chem.*, **105**, **2007**, 1430.
 96. Wang, H.; Nair, M.G.; Strasburg, G.M.; Booren, A.M.; Gray, J.I.; Antioxidant polyphenols from tart cherries (*Prunus cerasus*), *J. Agric. Food Chem.*, **47**, **1999**, 840.
 97. García-Villalba, R.; León, C.; Dinelli, G.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A.; Garcia-Canãs, V.; Cifuentes, A.; Comparative metabolomic study of transgenic versus conventional soybean using capillary electrophoresis-time-of-flight mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, **1195**, **2008**, 164.