

MÉTODO DE VALIDAÇÃO E SEPARAÇÃO DE ISOFLAVONAS PRESENTES EM MELAÇO DE SOJA

VALIDATION METHOD AND SEPARATION OF ISOFLAVONES FROM SOY MOLASSES

Daniel Mantovani¹, Aline Takaoka Alves Baptista², Charleston de Oliveira Bezerra³,
Driano Rezende⁴, Luis Fernando Cusioli⁵, Paulo Fernando Soares⁶

- 1 Pós-doutorando em Engenharia Urbana. UEM, 2017. daniel26mantovani@gmail.com.
- 2 Pós-doutoranda em Engenharia Química. UEM, 2017. alinetakaoka_17@hotmail.com.
- 3 Mestrando em Engenharia Química. UEM, 2017. charleston10@gmail.com.
- 4 Graduando Faculdade de Educação e Meio Ambiente, 2017. drirezende@gmail.com.
- 5 Mestrando em Engenharia Química. UEM, 2017. [luiscucioli@gmail.com](mailto:luisкусиоli@gmail.com).
- 6 Doutorado em Engenharia Civil. USP, 2001. Coordenador, Pós-Graduação em Engenharia Urbana, UEM. pfsoares@gmail.com.

Recebido em: 04/10/2017 - Aprovado em: 07/06/2018 - Disponibilizado em: 15/06/2018

RESUMO: As isoflavonas atuam no organismo humano com efeitos fisiológicos de forma benéfica tornando os alimentos que contém isoflavonas em formas funcionais ao organismo. Assim, neste trabalho foi desenvolvido um método de análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) bem como, separação e quantificação de isoflavonas presentes no melaço de soja. A validação do método foi baseada pela linearidade, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) com estabelecimentos de critérios de análise para aceitação da metodologia proposta. Os resultados obtidos na separação dos isômeros de isoflavonas bem como a quantificação trouxeram melhorias relacionadas ao tempo de retenção de cada isômero estudado e separação dos compostos. Com relação ao método aplicado ao longo do estudo este apresentou resultados pertinentes para utilização e expansão do método proposto focado nos compostos de isoflavonas formas glicosídicas e agliconas presentes no melaço de soja.

PALAVRAS-CHAVE: Isoflavonas. Melaço de soja. Validação.

ABSTRACT: Isoflavones act in the human body with physiological effects in a beneficial way making foods containing isoflavones in functional forms to the body. Thus, in this work a high efficiency liquid chromatography (HPLC) analysis method was developed, as well as, separation and quantification of isoflavones from in soybean molasses. The validation of the method was based on linearity, limit of detection (LD) and limit of quantification (LQ) with establishments of analysis criteria for acceptance of the proposed methodology. The results obtained in the separation of the isoflavone isomers as well as the quantification brought improvements related to the retention time of each studied isomer and separation of the compounds. In relation to the method applied throughout the study, it presented relevant results for the use and expansion of the proposed method focused on the isoflavone compounds glycosidic forms and aglycones from soybean molasses.

KEYWORDS: Isoflavones. Soy molasses. Validation.

1 INTRODUÇÃO

A soja *Glycine max* (L.) Merrill é uma planta de grande diversidade genética e morfológica e se apresenta na natureza com tamanhos de grão, cores e composição química variados, dependendo do cultivar plantado e fatores climáticos (HOECK *et al.*, 2000). A área cultivada com soja é de 33,8 milhões de hectares, a maior entre todas as grandes culturas produzidas no Brasil, com uma produção estimada de aproximadamente 110,44 milhões de toneladas para a safra 2016/2107 (CONAB, 2018). Grande parte dessa produção é destinada à fabricação do farelo de soja para incorporação como ingrediente majoritário na alimentação animal, gerando 33 milhões de toneladas deste produto entre 2016/2017, bem como o desenvolvimento de derivados especiais com altas concentrações proteicas utilizados na alimentação humana por apresentar compostos benéficos à saúde como as isoflavonas (MAPA, 2017).

Entretanto, a produção nacional de melaço de soja segundo Pastore, Bicas e Marostica (2013), foi estimada em 11,2 milhões de toneladas, que é tratado como um resíduo agroindustrial obtido do processamento do grão de soja na produção de (farináceos proteicos) alimentos utilizados especialmente para a alimentação humana (SIQUEIRA *et al.*, 2008). Assim, a obtenção do melaço de soja provém do processo da extração hidroalcoólica (60 a 70% de etanol) dos carboidratos a partir do farelo de soja desengordurado para a obtenção de um concentrado rico em carboidratos e com a presença de isoflavonas com valores médios de 60% e 2 g.L⁻¹ do total de sólidos solúveis na forma de xarope marrom escuro (BARNES; KIRK; COWARD, 1994; JOHNSON; MYERS; BURDEN, 1992). Apenas 34,8% dos 25 carboidratos presentes no melaço de soja são formas digeríveis pelo organismo dos monogástricos (humano, frango, suíno) por conterem em sua composição sacarose, glicose, frutose e galactose. No entanto, 25,2% são formas não

digeríveis utilizadas na alimentação de ruminantes (bovino, caprinos entre outros), representadas formas rafinose e estaquiose (QUERSHI; LOLAS; BLASCHEK, 2001).

No Brasil, grande parte do volume de soja produzida segue para a produção do farelo de soja e seus derivados, que darão seguimento a produção de proteínas texturizadas, farelos concentrados e isolados proteicos de soja. Assim, grande parte das pesquisas realizadas é focada nos teores presentes nos derivados de soja e seus constituintes de grande potencial energético e fonte funcional como é o caso das isoflavonas formas glicosídicas e agliconas para posterior alimentação humana (MANTOVANI *et al.*, 2011).

A ingestão diária de isoflavonas nas formas agliconas (daidzeína, genisteína e gliciteína) que garantem efeitos benéficos atribuídos aos seguintes fatores: Atividade antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e anticarcinogênica (BEER *et al.*, 2005; DELMAS; JANNIN; LATRUFFE, 2005). O órgão fiscalizador *Food and Drug Administration* (FDA, 1999) responsável pela regulamentação de alimentos, concedeu o certificado *Generally Recognized as Safe* (GRAS) ao consumo de isoflavonas, mediante a adição de quantidades suficientes para obtenção do efeito desejado relacionados à proteção de doenças. Assim, agências regulamentadoras voltadas à saúde como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2010) cita o consumo diário de isoflavonas dia de 25 mg/dia.

As isoflavonas fazem parte de uma ampla variedade de compostos fenólicos pertencente ao grupo dos flavonóides de baixa massa molar, denominados metabólitos secundários, os quais são produzidos pelas leguminosas em teores que variam de 0,1 a 0,5 mg.g⁻¹ (COWARD *et al.*, 1993; GENOVESE; LAJOLO, 2001). A Figura 1 apresenta as estruturas das isoflavonas da soja nas formas glicosídicas (daidzina, genistina e glicitina) e agliconas (daidzeína, genisteína

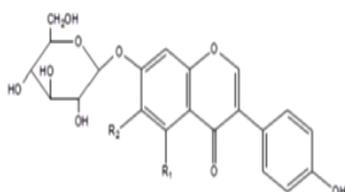
e gliciteína), sendo que as primeiras estão presentes em maiores concentrações no grão de soja, porém apresentam menor atividade biológica em relação às formas não glicosídicas (PARK *et al.*, 2001; SONG *et al.*, 1998).

Figura 1 - Estrutura das isoflavonas glicosiladas (I) e não glicosiladas (II) presentes no melão de soja

Isoflavonas glicosiladas

(I)

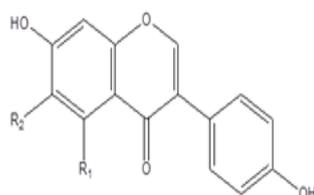
R1	R2	Composto
H	H	Daidzina
OH	H	Genistina
H	OCH ₃	Gliciteína



Isoflavonas agliconas

(II)

R1	R2	Composto
H	H	Daidzeína
OH	H	Genisteína
H	OCH ₃	Gliciteína



Fonte - SONG *et al.*, 1998.

Os compostos de isoflavonas estão biodisponíveis especialmente nos vegetais representadas pela família da leguminosa (soja) com mais de 98% de sua composição na forma de compostos glicosídicos, demais leguminosas apresentam valores insignificantes em nível de isoflavonas biodisponíveis (LIGGINS *et al.*, 2000).

Entretanto, a presença de isoflavonas biodisponíveis especialmente para a soja, Hoeck e colaboradores. (2000) relataram sobre as variações dos teores relacionados aos fatores cultivar utilizado, local de

plantio, clima e tipo de solo, concluindo que os teores de isoflavonas presentes no grão de soja, sofrem influência direta destes fatores com redução drástica relacionada a presença destes compostos. Já Li-jun e colaboradores (2004) e Wang e Murphy (1994) focaram o estudo voltado aos processos industriais que elevam as perdas dos teores de isoflavonas nos derivados de soja, destacando tempo de processo na obtenção dos derivados, processo de extração de proteínas, formulação, preparo de produtos, hidrólise enzimática e fermentativa, com observação de diferenças consideráveis nos teores e distribuição de isoflavonas em ambos os processos.

Entretanto, os passos para realização da separação e quantificação dos compostos de isoflavonas, é relacionada a métodos que envolvem basicamente a eluição com o uso de gradiente e mistura de fase móvel com metanol ou acetonitrila acidificado com ácido acético, ácido fórmico, ácido fosfórico ou ácido sulfúrico, todos diluídos (SHAO *et al.*, 2011). Nesse sentido, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) apresenta uma certa vantagem sobre os métodos por Cromatografia a Gás (CG), especial pela determinação dos grupos de isoflavonas glicosídicas e agliconas que podem ser separados e quantificados sem a necessidade da derivatização, processo no qual necessita de reagentes específicos para realizar o arraste do composto de interesse para separação e quantificação (KLEDJUS *et al.*, 2004).

Segundo Ribani e colaboradores (2004) os procedimentos relacionados à validação de métodos analíticos são amparados por duas agências credenciadas pelo governo brasileiro: ANVISA e Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). Esses órgãos são responsáveis pela formatação de procedimentos focados na validação de métodos analíticos, conforme a resolução ANVISA RDC 166/17 de 07/2017 e INMETRO DOQ-CGCRE 008 de 07/2011.

O presente trabalho visou o desenvolvimento de um método de quantificação e separação dos compostos de isoflavonas formas glicosídicas e agliconas presentes no melaço de soja, com utilização da técnica CLAE, para obter um perfil de separação e quantificação com base na aplicação das equações envolvendo a linearidade, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) a fim de estabelecer critérios de análise para aceitação da metodologia proposta.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

A matéria prima melaço de soja foi adquirido da empresa IMCOPA - Importação, Exportação e Indústria de Óleos Ltda, localizada na cidade de Araucária - Paraná.

2.1 EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DAS ISOFLAVONAS

O procedimento utilizado para obter as isoflavonas do melaço de soja foi desenvolvido ao longo do estudo. Assim, com base no perfil do melaço de soja que apresenta na média concentração de (70 a 72 °Brix) para comercialização, utilizou-se a extração líquido-líquido para evitar perdas das isoflavonas por lixiviação. Nesse sentido, iniciou-se o processo de extração das isoflavonas formas agliconas e glicosídicas, presentes no melaço de soja com o desengorduramento, mediante a pesagem de 300 g dispostas em frascos tipo Becker com posterior adição de hexano (1:4 m/v), e agitação magnética (IKA modelo HS 7) por 30 min., em temperatura de 25 °C, seguindo a centrifugação a 7.000 x g por 20 min.

Posterior à centrifugação, a massa do precipitado desengordurado foi submetida à secagem em rotaevaporador (IKA, modelo RV 10 Control), com temperatura de banho controlada em 40 °C até a obtenção de uma massa seca, sem presença de água

e solvente metanol. Assim, com a obtenção da massa seca obtida a partir do precipitado contendo compostos de isoflavonas. Nesse sentido, posterior à obtenção do processo de extração líquido-líquido, a amostra foi levada para realização das análises por CLAE mediante a filtração em microfiltros de Politetrafluoretileno (PTFE) com porosidade 0,22 µm (Millipore, São Paulo, Brasil).

2.1.1 PADRÕES DE ISOFLAVONAS UTILIZADOS

Foram utilizados padrões com grau analítico cromatográfico, glicitina, genistina, daidzeína, gliciteína e genisteína todos com pureza acima de 95%. Os padrões foram adquiridos do Instituto de Tecnologia do Paraná (Tecpar, Curitiba, Brasil). As diluições dos padrões foram realizadas com a inclusão da solução metanol:água 80/20 v/v em concentrações que variam na ordem de 0,200 a 0,001 µg.mL⁻¹.

2.1.2 CONDIÇÕES DE ANÁLISE CROMATOGRÁFICA POR CLAE

O método utilizado para realização das análises referente às separações e quantificações dos compostos de isoflavonas foi baseado no estudo realizado por Ribani e colaboradores (2004). Nesse sentido, o desenvolvimento do estudo foi focado pela técnica cromatográfica CLAE, equipamento composto por bomba quaternária (Shimadzu, modelo LC-10ADVP), controlador de sistema (Shimadzu, modelo SCL-10AVP), detector UV-Vis (Shimadzu, modelo SPD-10AV) monitorado em 254 nm, equipado com injetor manual Rheodyne volume de injeção de 10 µL, degaseificador (Shimadzu, modelo DGU-14A) e software Shimadzu CLASS-VP® Release (Versão 6.14 SP1). A análise foi conduzida utilizando como fase móvel A: água ultrapura + 0,1% de ácido acético glacial (pH 3,5) e B: acetonitrila + 0,1% de ácido

acético e vazão constante ao longo da corrida com 1 mL/min e coluna (ODS Hypersil, 5 µm, 4,6 x 250 mm) com fase móvel e temperatura de coluna em forno (Shimadzu, modelo CTO-10AS) a 30 °C. A programação do gradiente referente a fase móvel foi 14% de B por 8 min, 50% de B entre 25 a 30 min e retornando para valores de 14% de B, entre 33 a 35 min.

2.2 VALIDAÇÃO

2.2.1 SELETIVIDADE

A Anvisa (2017) relata que a seletividade é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. Nesse sentido, o presente estudo adquiriu compostos formados por isômeros de isoflavonas formas agliconas e glicosídicas em concentrações distintas, conforme concentrações: daidzina (8 µg.mL⁻¹), glicitina (4 µg.mL⁻¹), genistina (1 µg.mL⁻¹), daidzeína (8 µg.mL⁻¹), gliciteína (4 µg.mL⁻¹) e genisteína daidzeína (µg.mL⁻¹) todos dissolvidos em solução metanol:água 80:20 v/v.

Entretanto, a concentração inicial do extrato seco de melão de soja, foi padronizado com a concentração de 1 mg.mL⁻¹ para obtenção do perfil referente à identificação dos tempos de retenção envolvendo a corrida cromatográfica do melão de soja, conforme método descrito no ítem 2.1.2.

2.2.2 LINEARIDADE

Segundo o INMETRO DOQ-CGCRE 008 de 07/2011, linearidade é a capacidade de produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração de analito, em uma dada faixa de concentração.

Portanto, foi realizado o perfil da linearidade mediante a construção da curva de calibração relacionada para

cada padrão preparado. Dessa forma, para demonstrar a presença da linearidade para cada um dos compostos analisados, utilizou-se a equação linear com o objetivo de obter um coeficiente de correlação (r) igual ou maior que 0,99 (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2007). Assim, as concentrações utilizadas foram: 200, 100, 40, 30, 8 e 4 µg.mL⁻¹ para daidzina; 100, 50, 20, 10, 4 e 2 µg.mL⁻¹ para glicitina; 50, 25, 10, 5, 2 e 1 µg.mL⁻¹ para genistina e 200, 100, 40, 20, 8 e 4 µg.mL⁻¹ para demais isoflavonas daidzeína, gliciteína e genisteína. Todos os compostos foram dissolvidos em solução metanol:água 80:20 v/v. Os resultados referentes aos cálculos da média, desvio-padrão, coeficiente de variação, bem como a análise de variância estão dispostos na Tabela 1 em Resultados e Discussão.

2.2.3 LIMITES DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

O limite de detecção (LD) é estimado com base na relação de 3 vezes o ruído da linha de base, em relação à menor concentração detectável do analito (ANVISA, 2017), conforme Equação 1. A partir dos dados referentes à obtenção da curva de calibração provindo dos padrões de isoflavonas foi determinada a menor concentração, com valores referentes ao coeficiente de correlação (r) igual ou maior que 0,99. Dessa forma, os limites de quantificação (LQ) foram determinados a partir das curvas da linearidade conforme Equação 2.

$$LD = \frac{DPa \times 3}{IC} \quad (1)$$

$$LQ = \frac{DPa \times 10}{IC} \quad (2)$$

em que LD = limite de detecção, DPa = desvio padrão do intercepto com o eixo y, IC = inclinação da curva, 3σ = relação sinal-ruído, LQ : limite de quantificação, 10σ = relação sinal-ruído.

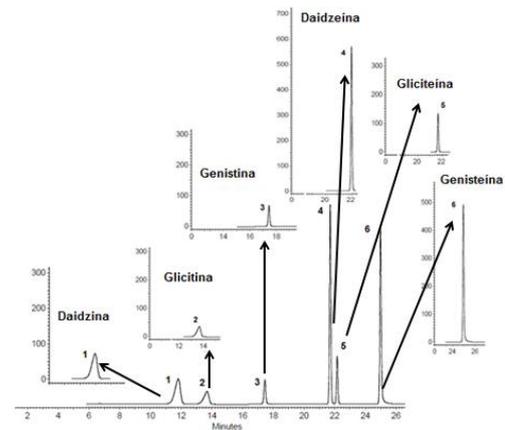
Em seguida, as soluções foram injetadas em concentrações determinadas com seus respectivos picos referentes a cada composto analisado.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao determinar o procedimento voltado à identificação e quantificação dos isômeros de isoflavonas, grandes dificuldades foram enfrentadas especialmente pela composição química que o melão de soja, que contém 34,6% de carboidratos, 3,2% de proteínas, 3,1% de gordura, 4,2% de minerais e aproximadamente 2 g.L^{-1} de isoflavonas (BARNES; KIRK; COWARD, 1994), apesar da literatura não destacar a identificação e quantificação de isoflavonas provindas do melão de soja, por apresentar quantidades de baixa significância industrial.

Para isso, foi realizado um procedimento voltado à extração das isoflavonas estabelecido por Mantovani (2013), a fim de evitar maiores interferências na identificação e quantificação das isoflavonas durante as análises realizadas por CLAE. As condições cromatográficas utilizadas na quantificação das isoflavonas foram condicionadas a estudos com diversas variações da fase móvel com o uso do gradiente, utilizando acetonitrila e água acidificada. Diante dos fatores abordados, a Figura 2 apresenta a melhor condição obtida para separação das isoflavonas, realizadas separadamente e indicada por seta.

Figura 2 - Cromatograma representando a separação das isoflavonas.



Fonte - Próprio autor.

3.1 SELETIVIDADE

O uso da seletividade segundo a norma da ANVISA (2017) é aplicado a dois parâmetros distintos, o primeiro é a análise qualitativa seguida pela quantitativa. O estudo voltado a separação e identificação das isoflavonas e seus isômeros foram estudados com base no parâmetro quantitativo, por haver, contaminantes diversos nas amostras de extrato seco, obtidas a partir da matéria prima melão de soja. Nesse sentido, a Tabela 2 apresenta valores voltados aos graus de liberdade (df) entre 1 a 4 para todos os isômeros de isoflavonas avaliadas, representadas pelo estudo da análise de variância, indicando a confiabilidade do resultado obtido no quesito seletividade.

3.1.1 LINEARIDADE VERSUS CURVA DE CALIBRAÇÃO

A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica na busca de resultados (variável dependente y) diretamente proporcional à concentração do analito (variável independente x) dentro de um intervalo específico (ANVISA, 2017). Dessa forma, foi utilizado como suporte de validação metodológica a RDC

166/17 de 07/2011 que descreve como critério mínimo aceitável (r) com valor maior ou igual a 0,99. O valor de (r) determina a estimativa da qualidade da curva, e quanto mais próximo de 1,0 menor será a dispersão dos pontos experimentais com menor incerteza dos coeficientes de regressão (RIBANI; COLLINS; BOTTOLI, 2007).

Os resultados estatísticos aplicados no estudo foram realizados mediante a aplicação do software StatSoft®

Statistica (versão 8, 2007). Nesse sentido, os valores plotados na Figura 3 apresentam os resultados obtidos com relação ao perfil de concentrações, médias e coeficiente de variação sem haver pontos fora do intervalo de confiança bem como definição da faixa de concentração, obtidas a partir de análises por cromatografia CLAE.

Figura 3 - Curvas dos padrões de isoflavonas versus concentração

Daidzina $\mu\text{g/mL}$						
Concentração	0,2	0,1	0,04	0,03	0,008	0,004
Média	1851757	937794	351704	180307	71543	38274
dp	22722	9234	6228	1483	519	959
CV %	1,2	1,0	1,8	0,8	0,7	2,5
Glicitina $\mu\text{g/mL}$						
Concentração	0,1	0,05	0,02	0,01	0,004	0,002
Média	860524	436781	155799	75785	28951	14398
dp	11558	5189	3210	1010	330	215
CV %	1,3	1,2	2,1	1,3	1,1	1,5
Genistina $\mu\text{g/mL}$						
Concentração	0,05	0,025	0,01	0,005	0,002	0,001
Média	608688	294316	114774	55190	21509	10593
dp	4808	4122	1216	942	354	308
CV %	0,8	1,4	1,1	1,7	1,6	2,9
Daidzeína $\mu\text{g/mL}$						
Concentração	0,2	0,1	0,04	0,02	0,008	0,004
Média	3595803	1772467	704286	340822	134972	70280
dp	40357	25815	11421	5077	1176	983
CV %	1,1	1,5	1,6	1,5	0,9	1,4
Gliciteína $\mu\text{g/mL}$						
Concentração	0,2	0,1	0,04	0,02	0,008	0,004
Média	860012	422581	167366	81826	35103	16639
dp	8750	6913	3100	1486	1113	674
CV %	1,0	1,6	1,9	1,8	3,2	4,1
Genisteína $\mu\text{g/mL}$						
Concentração	0,2	0,1	0,04	0,02	0,008	0,004
Média	3564636	1715278	684581	346514	153779	76541
dp	33466	39693	13292	5778	357	865
CV %	0,9	2,3	1,9	1,7	0,2	1,1

dp = desvio padrão.

CV% = Coeficiente de variação.

Fonte - Próprio autor.

Na construção de uma curva analítica, quase sempre é observada a presença de interferências provindas de matrizes a serem quantificadas posteriormente. No entanto, o valor obtido durante o estudo focado na linearidade comprova a não ocorrência da interferência analítica na quantificação das isoflavonas. Assim, erros contidos na análise e seus ajustes somente são observados com o uso da variância que busca fornecer resultados menos

tendenciosos (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2007).

A análise de variância foi aplicada para todas as curvas de calibração referentes as isoflavonas, conforme apresentado na Figura 4, apresenta o valor P do modelo bem inferior ($p < 0,05$) com significância estatística. Os outros parâmetros obtidos na análise de variância apenas corroboram a robustez estatística do modelo matemático proposto.

Figura 4 - Análise de variância

Daidzina					
	SS	df	MS	F	P
Modelo	29007,54	1	29007,54	13718,42	0,00
Resíduo	8,457984	4	2,114496		
Glicitina					
	SS	df	MS	F	P
Modelo	7249,857	1	7249,857	6999,061	0,00
Resíduo	4,143331	4	1,035833		
Genistina					
	SS	df	MS	F	P
Modelo	1813,409	1	1813,409	79743,14	0,00
Resíduo	0,090963	4	0,022741		
Daidzeína					
	SS	df	MS	F	P
Modelo	29014,21	1	29014,21	64956,47	0,00
Resíduo	1,786687	4	0,446672		
Gliciteína					
	SS	df	MS	F	P
Modelo	29007,54	1	29007,54	13718,42	0,00
Resíduo	8,457984	4	2,114496		
Genisteína					
	SS	df	MS	F	P
Modelo	29014,52	1	29014,52	78492,12	0,00
Resíduo	1,478595	4	0,369649		

SS = (Soma quadrática dos quadrados) df = (Grau de liberdade), MS = (Média dos quadrados).

Fonte - Próprio autor.

Os cálculos relacionados às Equações 1 e 2 são baseadas no LD e LQ, todos utilizados perante obtenção dos parâmetros das curvas analíticas referente às isoflavonas. Assim, concentrações referentes às isoflavonas obtidas do melão de soja foram calculadas por médias, desvios padrões, coeficientes de variação e limites de repetibilidade conforme valores apresentados na Tabela 3, parâmetros utilizados para obter valores referentes à capacidade de detecção das isoflavonas formas glicosídicas e agliconas nas concentrações e intervalos entre 200 e 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ representando linearidade, exatidão e precisão.

Tabela 3 - Limites de detecção e quantificação

Isoflavonas	LD ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
Daidzina	0,90	3,01
Glicitina	0,20	0,66
Genistina	0,47	1,59
Daidzeína	1,24	4,14
Gliciteína	0,89	2,98
Genisteína	1,39	4,64

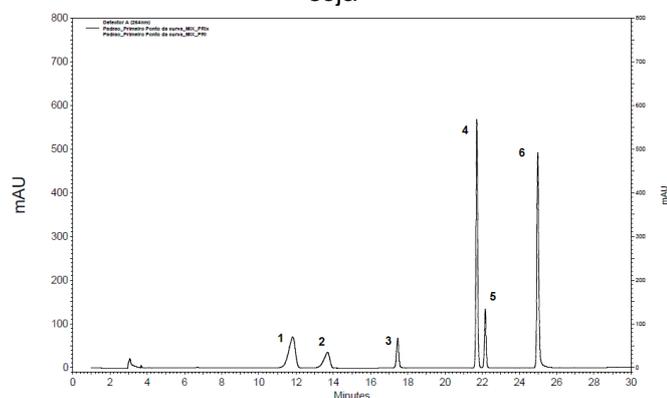
Fonte - Próprio autor.

3.2 PERFIL CROMATOGRÁFICO DAS AMOSTRAS DE MELAÇO DE SOJA

O método de separação das isoflavonas provindas do melão de soja formas glicosídicas e agliconas, posterior ao método de extração líquido-líquido, foi eficiente quando relacionado à identificação, separação e quantificação, não havendo interferentes que afetassem sua resolução. Nesse sentido, o perfil cromatográfico voltado à separação das isoflavonas é:

1 - daidzina, 2 - glicitina 3 - genistina, 4 - daidzeína, 5 - gliciteína e 6 – genisteína, conforme apresentado na Figura 5.

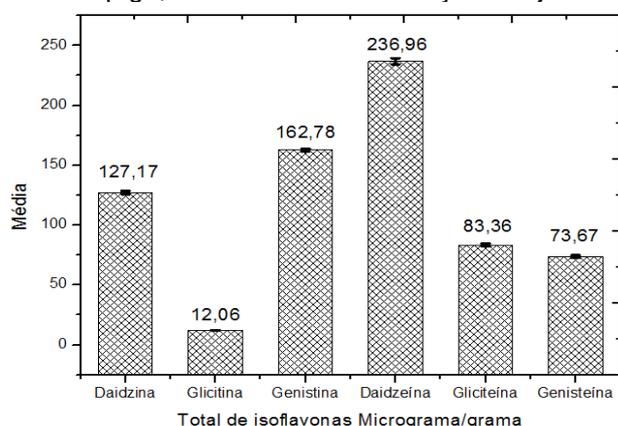
Figura 5 - Cromatograma da amostra 1 do melaço de soja



Fonte - Próprio autor.

Assim, a quantificação dos teores de isoflavonas referente ao perfil cromatográfico da amostra 1 do melaço de soja, formas glicosídicas e agliconas, antes da retirada dos carboidratos pelo método de extração líquido-líquido, é apresentado na Figura 6 com teores de isoflavonas totais quantificados em em μg^{-1} .

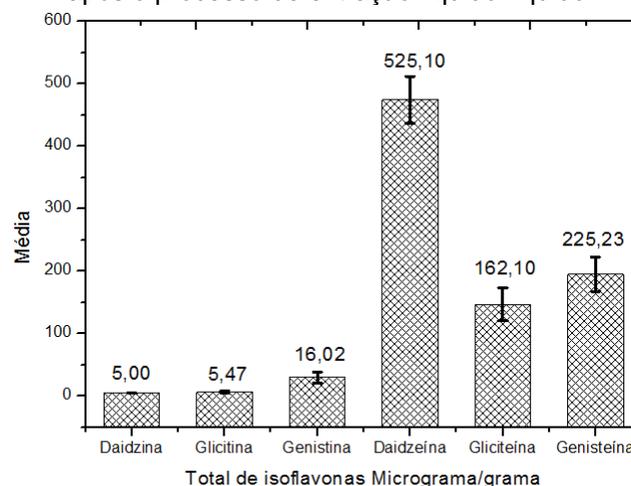
Figura 6 - Concentração média de isoflavonas, em μg^{-1} , das amostras de melaço de soja



Fonte - Próprio autor.

Entretanto, com a aplicação do procedimento voltado para extração do teor de carboidratos contidos no melaço de soja comercial, mediante a extração líquido-líquido, estudada por Mantovani (2013), é observada a mudança do perfil conforme demonstrado na Figura 7 sobre os teores de isoflavonas formas glicosídicas como a daidzina, glicitina e genistina chegou à redução de 95,8, 55,0 e 83,7% com aumento representativo de 50,0, 43,0 e 62,2% para as formas agliconas daidzeína, gliciteína.

Figura 7 - Conteúdo de isoflavonas totais em μg^{-1} após o processo de extração líquido-líquido



Fonte - Próprio autor.

4 CONCLUSÕES

O uso da cromatografia líquida de alta eficiência para a identificação, separação e quantificação de diversos compostos é viável mediante a um processo antecessor para evitar a presença de contaminantes que visam dificultar a análise. Assim, o desenvolvimento de uma técnica de validação especialmente para compostos provenientes de resíduos agroindustriais, como é o caso do melaço de soja, proporcionou melhorias no quesito identificação, separação e quantificação das isoflavonas formas glicosídicas e agliconas.

REFERÊNCIAS

- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Perguntas frequentes sobre alimentos**, 2010. Disponível em http://portal.anvisa.gov.br/perguntas_frequentes_alimentos. Acesso em: 04 de jun 2018.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 166**, 24/07/2017. Guia para validação de métodos analíticos, Julho, 2017.
- BARNES, S.; KIRK, M.; COWARD, L. Isoflavones and their conjugates in soy foods - extraction conditions and analysis by HPLC Mass-Spectrometry. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 42, p. 2466-2474, 1994.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, E. R. **Como fazer experimentos**. 3º Ed., Editora Unicamp, Campinas/SP, 2007.
- BEER, D. *et al.* Antioxidant activity of South African red and white cultivar wines: Free radical scavenging. **Food Chemistry**, v. 90, p. 569-577, 2005.
- CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**, v. 5, n. 4, safra 2017/2018, quarto levantamento, janeiro de 2018.
- COWARD, L. *et al.* Genistein, daidzein, and their b-glycoside conjugates: antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, p. 1961-1967, 1993.
- DELMAS, D.; JANNIN, B.; LATRUFFE, N. Resveratrol: Preventing properties against vascular alterations and ageing. **Molecular Nutrition Food Research**, v. 49, p. 377-395, 2005.
- FDA Isoflavone research. **U.S. Food and Drug Administration**. Federal Register: v. 64, 206, October 26, 1999.
- GENOVESE M. I.; LAJOLO, M. F. Determinação de isoflavonas em derivados de soja. **Revista Ciência e tecnologia de alimentos**, v. 21, p. 3-5, jan/abr, 2001.
- HOECK, J. A. *et al.* Influence of genotype and environment on isoflavone contents of soybean. **Crop Science**, v. 40, p. 48-51, 2000.
- INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO); **Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos**, DOQ-CGCRE-008, 2011.
- JOHNSON, L. A.; MYERS, D. J.; BURDEN, D. J. Soy Protein's History, Prospect in Food, Feed. **Inform**, v. 3, p. 429-444, 1992.
- KLEDJUS, B. *et al.* Determination of isoflavones in soybean food and human urine using liquid chromatography with electrochemical detection. **Journal Chromatography B**, v. 806, p.101-111, 2004.
- LIGGINS, J. *et al.* Daidzein and genistein content of fruits and nuts. **Journal of Nutrition Biochemistry**, v. 11, p. 326-331, 2000.
- LI-JUN, Y. *et al.* Changes in isoflavone contents and composition of sufu (fermented tofu) during manufacturing. **Food Chemistry**, v. 87, p. 587-592, 2004.
- MANTOVANI, D. **Estudo da recuperação e hidrólise de isoflavonas e carboidratos obtidos a partir do melão de soja**. 144 f. 2013. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, 2013.
- MANTOVANI, D. *et al.* Presença de isoflavonas glicosídicas em resíduo industrial e sua bioconversão enzimática para transformação em compostos isoflavonas agliconas. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v.5, p. 606-617, 2011.
- MAPA (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento). **Projeções do Agronegócio 2016/2017**. Brasília, 2017.
- PASTORE, G. M.; BICAS, J. L.; MAROSTÍCA JR, M. R. **Biotecnologia de Alimentos**. Ed. 12, Editora Atheneu, São Paulo, SP, 2013.
- PARK, Y. K. *et al.* Enrichment of isoflavone aglycones in extracted soybean isoflavones by heat and fungal β -glucosidase. **Food and Science Industry**, v. 34, p. 14-19, 2001.
- QUERSHI, N.; LOLAS, A.; BLASCHEK, H. P. Soy molasses as fermentation substrate for production of butanol using *Clostridium beijerinckii* BA101. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 290-295, 2001.

RIBANI, M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, 27 (5), p. 771-780, 2004.

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, **Journal of Chromatography**, v. 1156, p. 201/28-208, 2007.

SHAO, S. *et al.* Systematic evaluation of pre-HPLC sample processing methods on total and individual isoflavones in soybeans and soy products. **Food Research International**, v.44, p.2425-2434, 2011.

SONG, T. *et al.* Soy isoflavones analysis: quality control and a new internal standard. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 68, p. 1474S-1479S, 1998.

SIQUEIRA, P. F. *et al.* Production of bio-ethanol from soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae* at laboratory, pilot and industrial scales. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 8156-8163, 2008.

WANG, H.; MURPHY, P. A. Isoflavone composition of American and Japanese soybeans in Iowa. Effects of variety, crop year, and location. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 1674-1677, 1994.