

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP
Faculdade de Ciências – Departamento de Química

Júlio Gabriel Sanches de Camargo

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE PREPARO DE AMOSTRA E
DETERMINAÇÃO DE VARIÁVEIS COM EFEITOS IMPORTANTES NA
SEPARAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Glycine max*
 (“SOJA”) POR CLAE-DAD, UTILIZANDO CONCEITOS DE QUÍMICA
VERDE.**

Bauru

2017

Júlio Gabriel Sanches de Camargo

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE PREPARO DE AMOSTRA E
DETERMINAÇÃO DE VARIÁVEIS COM EFEITOS IMPORTANTES NA
SEPARAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Glycine max*
("SOJA") POR CLAE-DAD, UTILIZANDO CONCEITOS DE QUÍMICA
VERDE.**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso de Licenciatura em
Química da Universidade Estadual
Paulista "Júlio de Mesquita Filho", como
requisito para obtenção do título de
Licenciado em Química.

Orientador Prof^o Dr. Daniel Rinaldo

JÚLIO GABRIEL SANCHES CAMARGO

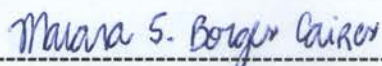
**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE PREPARO DE AMOSTRA E
DETERMINAÇÃO DE VARIÁVEIS COM EFEITOS IMPORTANTES NA
SEPARAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *GLYCINE MAX* ("SOJA")
POR CLAE-DAD, UTILIZANDO CONCEITOS DE QUÍMICA VERDE.**

Aprovação: 15/02/2017

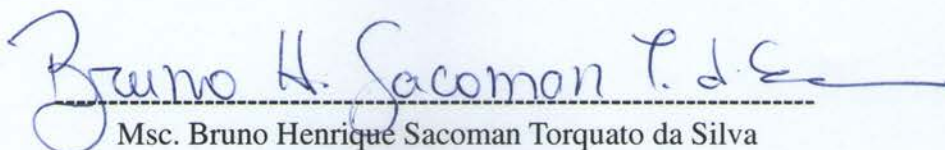
Trabalho de conclusão de curso apresentado
como requisito parcial para obtenção do título
de Licenciado em Química.
Universidade Estadual Paulista "Júlio de
Mesquita Filho"



Prof. Dr. Daniel Rinaldo
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"



Msc. Maiara Stefanini Borges Caires
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"



Msc. Bruno Henrique Sacoman Torquato da Silva
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que ajudaram para que esse trabalho pudesse ter sido realizado, em especial ao meu orientador pela confiança depositada em mim e aos meus colegas de IC que sempre me ajudaram durante minhas análises.

Agradeço ao professor Valdecir pelo uso do CLAE.

Agradeço imensamente a todos os amigos que eu fiz durante o curso, principalmente aos meus ex-colegas de turma que viraram mais do que irmãos pra mim.

Agradeço a minha namorada, Isabela Balão, por compartilhar comigo momentos tão importantes na minha vida e ser uma companheira incrível.

“O principal objetivo da educação é criar pessoas capazes de fazer coisas novas e não simplesmente repetir o que outras gerações fizeram.”

(Jean Piaget)

RESUMO

Em nenhum momento de todo o desenvolvimento da ciência o assunto sustentabilidade foi tão discutido como nos dias atuais. Atualmente, diversos pesquisadores vem estudando novas formas de redução, e até de eliminação dos resíduos tóxicos provenientes de processos industriais e comerciais, visando proteger o meio ambiente. Com o avanço desses estudos, a produção de fitofármacos vem ganhando espaço no que diz respeito a sustentabilidade, já que os mesmos são obtidos diretamente da natureza. Observa-se, na literatura, diversos trabalhos relatando as atividades farmacológicas dos extratos de plantas medicinais. Mas esses processos ainda não são considerados verdadeiramente sustentáveis, pois, grande parte dos trabalhos encontrados sobre investigações fitoquímicas, faz uso de solventes/reagentes considerados tóxicos, gerando assim, resíduos que necessitam de um alto custo para serem recuperados, além de trazerem riscos a vida do analista. A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é empregada na maioria dos estudos fitoquímicos, porém, esses estudos utilizam solventes tóxicos, tais como acetonitrila e metanol. Diante do contexto apresentado, este trabalho visa desenvolver um novo método de preparo de amostra para análises por CLAE e a determinação dos fatores cromatográficos de maior importância na separação dos metabólitos secundários de *Glycine max* (“Soja”) por CLAE-DAD. Os resultados qualitativos desse trabalho, mostraram que os fatores com maior influência na separação dos constituintes da soja foram a proporção de EtOH inicial e final para uma melhor resolução dos picos e para um maior fator GCFR foi a proporção inicial de EtOH. Os cromatogramas obtidos nas fr 1:9, 1:1 e 7:3 mostraram que os métodos de extração utilizados, tem se mostrado eficazes na separação dos ácidos fenólicos, como o ácido gálico e o ácido hidróxidobenzóico, também permitiu a identificação de alguns flavonóides. A partir dos cromatogramas obtidos na triagem de variáveis, foi possível observar que o experimento 3 foi o que obteve um maior número de picos e um bom fator GCFR. Com esses resultados, será possível propor um ótimo método de extração dos metabólitos secundários de *Glycine max*.

Palavras-Chave: *Glycine max*; sustentabilidade; CLAE; extrato; química verde.

ABSTRACT

In no time of science development the subject sustentability was discussed so much as the current days. Nowadays, a lot of reserchers are studing new ways to reduce, or even eliminate the toxic residues from industrial and comercial processes, aiming to protect the environment. With the advance of this studies, the production of phytopharmaceuticals is gaining space in terms of sustentability since they are obtained from nature. It is observed, on literature, a lot of works relating the pharmacological activity of medicinal plants extracts. But this processes are not consider truly sustainable because most of the work founded about phitochemicals investigation uses solvents and reagents that are consider toxics, generating residues that requires hight cost to be recover, besides to bring risk to the life of the analyst. The High Performance Liquid Chromatography (HPLC) is used in most phytochemicals studies, but this studies uses toxic solvents as acetonitrile and methanol. Given the present context, this work aims to develop a new method to prepare the sample for analysis by HPLC and determination of the most important chromatografic factors in the separation of the secondary metabolites of Glycine max ("Soy") by HPLC-DAD. The qualitative results of this study showed that the factors with the greatest influence on separation of the soy constituents were the initial and final EtOH ratio for better peaks resolution and for a higher GCFR factor was the initial ratio of EtOH. The chromatograms obtained in fr. 1: 9, 1: 1 and 7: 3 show that the extraction methods used, the time taken to separate phenolic acids, such as gallic acid and hydroxide-benzoic acid, also allowed for the identification of some flavonoids. From the chromatograms obtained in the sorting of variables, it was possible to observe the experiment 3 which obtained the highest number of peaks and a good GCFR factor. With the results, it is possible to propose a great method of extraction of the secondary metabolites of Glycine max.

Keywords: *Glycine max*; sustentability; HPLC; extract; green chemistry.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fatores (variáveis) e níveis estabelecidos na triagem para desenvolvimento do método de eluição verde por CLAE de <i>G. max</i>	22
Tabela 2. Planejamento fatorial fracionário com 2 níveis e 5 fatores (2V5-1) para análises de G. max.	22
Tabela 3. Rendimento do EHA dos grãos de <i>G. max</i> coletados.....	24
Tabela 4. Planejamento experimental de dois níveis e cinco fatores de um fatorial fracionário 2V5-1 e as respostas obtidas para cada análise do EHA dos grãos de <i>G. max</i>	32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Soja (<i>Glycine max</i>), folhas, vagens verdes, vagem madura, grãos.....	12
Figura 2. Isoflavonas glicosiladas de soja.....	13
Figura 3. Esquema resumido da preparação do extrato hidroalcoólico dos grãos de <i>G. max</i>	20
Figura 4. Esquema resumido do preparo de amostra dos grãos de <i>G. max</i>	21
Figura 5. Cromatograma da fr. 1:9 do clean-up do EHA dos grãos de <i>G. max</i> . Sistema CLAE-DAD; coluna analítica de fase reversa C18 <i>XBridge</i> (150 x 4,6 mm) com pré coluna (4x3 mm, 5µm); Solvente A: H ₂ O + 0,5% AcOH; Solvente B: EtOH. Gradiente de 5-100% de B em 60 min; vazão de 1,00 mL min ⁻¹ ; λ=254nm.....	25
Figura 6. Espectros ultravioletas dos picos majoritários da fr. 1:9 do <i>clean-up</i> do EHA dos grãos de <i>G. max</i>	26
Figura 7. Cromatograma da fr. 1:1 do <i>clean-up</i> do EHA dos grãos de <i>G. max</i> . Sistema CLAE-DAD; coluna analítica de fase reversa C18 <i>XBridge</i> (150 x 4,6 mm) com pré coluna (4x3 mm, 5µm); Solvente A: H ₂ O + 0,5% AcOH; Solvente B: EtOH. Gradiente de 5-100% de B em 60 min; vazão de 1,00 mL min ⁻¹ ;.....	27
Figura 8. Espectros ultravioletas dos picos majoritários da fr. 1:1 do <i>clean-up</i> do EHA dos grãos de <i>G. max</i>	28
Figura 9. Cromatograma da fr. 100% EtOH do <i>clean-up</i> do EHA dos grãos de <i>G. max</i> . Sistema CLAE-DAD; coluna analítica de fase reversa C18 <i>XBridge</i> (150 x 4,6 mm) com pré coluna (4x3 mm, 5µm); Solvente A: H ₂ O + 0,5% AcOH; Solvente B: EtOH. Gradiente de 5-100% de B em 60 min; vazão de 1,00 mL min ⁻¹ ; λ=254nm.....	29
Figura 10. Cromatograma da fr. 7:3 do segundo método de <i>clean-up</i> avaliado para o EHA dos grãos de <i>G. max</i> . Sistema CLAE-DAD; coluna analítica de fase reversa C18 <i>XBridge</i> (150 x 4,6 mm) com pré coluna (4x3 mm, 5µm); Solvente A: H ₂ O + 0,5% AcOH; Solvente B: EtOH. Gradiente de 5-100% de B em 60 min; vazão de 1,00 mL min ⁻¹ ; λ=260nm.....	30
Figura 11. Esquema representativo de preparo e análise do EHA dos grãos de <i>G. max</i>	31
Figura 12. Cromatogramas da triagem de variáveis de <i>G. max</i> dos experimentos 1 ao 8; λ=260nm....	33
Figura 13. Cromatogramas da triagem de variáveis de <i>G. max</i> dos experimentos 9 ao 16; λ=260nm..	34
Figura 14. Gráfico normal dos valores dos efeitos calculados para a resposta Número de Picos.....	35
Figura 15. Gráfico normal dos valores dos efeitos calculados para a resposta GCFR (x=1).....	35

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Função-resposta GCFR (<i>Green Chromatographic Fingerprint Response</i>).....	23
--	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1 Plantas medicinais.....	11
1.2 Soja.....	12
1.3 Química verde.....	15
1.4 Quimiometria.....	17
2. OBJETIVO.....	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
3.1. Reagentes utilizados.....	19
3.2. Obtenção do material vegetal.....	19
3.3. Preparação dos extratos.....	19
3.4. Preparo de amostra (<i>clean-up</i>) do extrato hidroalcoólico dos grãos de <i>G. max</i>	20
3.5. Análises por CLAE.....	21
3.6. Triagem das variáveis.....	22
4. DESENVOLVIMENTO, RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
4.1. Rendimento do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Glycine Max</i>	24
4.2. Avaliação do <i>clean-up</i> dos grãos de <i>G. max</i> por CLAE-DAD.....	24
4.3. Identificação dos parâmetros cromatográficos de maior interferência na separação dos metabólitos secundários presentes no EHA dos grãos de <i>G. max</i> por CLAE-DAD utilizando etanol e água como fase móvel (Triagem de variáveis).....	30
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	37
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38

1. INTRODUÇÃO

1.1 Plantas medicinais

Plantas com poderes curativos já estão em nossa sociedade desde o aparecimento da espécie humana na terra. Desde cedo, as pessoas perceberam que algumas plantas tinham o “poder” de tratar ferimentos e combater doenças, além do uso de algumas espécies como fonte de alimento (BADKE et al., 2011).

Essa cultura de se utilizar plantas para combater doenças se perpetua em muitas sociedades tradicionais, pois algumas plantas possuem mais de um princípio ativo, tornando o seu uso de fundamental importância a estas sociedades. Grande parte dessa vegetação é encontrada em seu habitat, que atualmente anda perdendo seu espaço devido ao aumento da população, sendo algumas plantas cultivadas em ambientes modificados, a fim de uma melhor produção (LOPES et al. 2005).

Em contra partida, os avanços ocorridos no meio científico, principalmente no âmbito das ciências da saúde, fez surgir novos métodos de tratamento de doenças. Um desses novos métodos consiste na administração de medicamentos industrializados, que foram introduzidos no cotidiano das pessoas, através de campanhas publicitárias que prometiam curar diversas doenças. No entanto, mesmo com os altos incentivos ao uso destes novos medicamentos, grande parte da população ainda faz uso de plantas como complementação dos cuidados a saúde (BADKE et al., 2011).

A organização mundial de Saúde (OMS) apresenta uma estimativa de que 80% da população mundial utiliza recursos provenientes das medicinas populares, com o intuito de suprir as necessidades de assistências médicas privadas (WHO, 2011).

Muitas espécies medicinais brasileiras não possuem comprovação científica, o que pode levar o indivíduo a adquirir plantas que podem apresentar certa toxicidade e reações indesejadas ao seu organismo. Através de estudos laboratoriais findos e com a eficácia medicinal da planta comprovada, a mesma pode ser comercializada como um medicamento fitoterápico. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2002) define que:

“Fitoterápicos são medicamentos obtidos a partir de plantas medicinais. Eles são obtidos empregando-se exclusivamente derivados de droga vegetal (extrato, tintura, óleo, cera, exsudato, suco, e outros). Não é objeto de registro como medicamento fitoterápico, planta medicinal ou suas partes, após processos de

coleta, estabilização e secagem, podendo ser íntegra, rasurada, triturada ou pulverizada.”

Os medicamentos fitoterápicos são em geral de baixo custo e por conta disso são utilizados pelo Sistema Único de Saúde (SUS) e aprovados pela ANVISA. Diante deste fato, podemos considerar tais medicamentos seguros e eficazes para a população.

Em 2009, o Ministério da Saúde divulgou uma lista contendo 71 plantas medicinais, e denominou a como Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do SUS (Rennisus). A lista apresenta as principais plantas medicinais que apresentam grande potencial de geração de novos medicamentos para o Sistema Único de Saúde (SUS). Sua finalidade é a orientação de pesquisas e estudos que possam auxiliar na elaboração de uma relação de fitoterápicos que ficaram à disposição da população, para que possam fazer uso dos mesmos com segurança e eficácia, no combate de determinadas doenças (BIBLIOTECA..., 2015).

1.2 Soja

Uma das espécies que compõe a Rennisus é a soja (*Glycine max*). A soja pertence à família *Fabaceae*, sendo conhecida como feijão-da-China, feijão soja, *soya* (espanhol), *soy* e *soybean* (inglês), *sojabohne* (Alemão), dentre outros nomes populares (Figura 1).

Figura 1. Soja (*Glycine max*), folhas, vagens verdes, vagem madura, grãos.

Fonte: Carlini, 2015.



A soja chegou ao Brasil por volta do ano de 1882, e desde então sua importância para o agronegócio só cresceu, atingindo na década de 70 o patamar de principal cultura do agronegócio brasileiro, passando de 15 milhões de toneladas produzidas no ano de 1979. Atualmente o Brasil segue como segundo maior produtor de soja no mundo, com uma produção que gira em torno dos 85,656 milhões de toneladas segundo a CONAB, perdendo

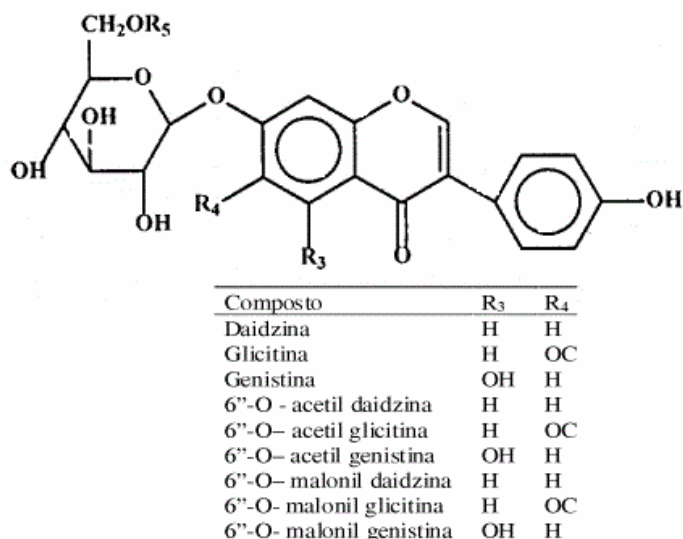
apenas para os Estados Unidos, que detêm uma produção de 89,507 milhões de toneladas, segundo a USDA (EMPRESA..., 2015).

A família *Fabaceae* tem cerca de 650 gêneros e aproximadamente 18 mil espécies, representando uma das maiores famílias de Angiospermas e também uma das principais, do ponto de vista econômico. No Brasil, ocorrem cerca de 200 gêneros e 1.500 espécies que tem como característica a presença de frutos em forma de vagem (embora haja exceções) e engloba desde espécies arbóreas até espécies herbáceas anuais, muitas de grande importância econômica e principalmente alimentar (soja, feijão, entre outras) (AGEITEC..., 2017).

A *Glycine max* é nativa do sudeste da Ásia, e faz parte da cultura oriental há quase dois milênios. Existem aproximadamente 2500 variedades de soja que apresentam características totalmente diferentes, como tamanhos, tipos, cores e teores de isoflavonas diversos, de acordo com o tipo de solo e clima. Uma característica muito importante, é que a mesma possui todos os aminoácidos essenciais, e o conteúdo de proteínas em seus grãos, é muito abundante, podendo chegar a 40% (KAWAGA, 1995).

A soja apresenta pequenas quantidades de carotenoides e saponinas, alguns derivados fenólicos, dentre eles podemos destacar as isoflavonas, que são representadas pelas formas glicosídicas da genisteína e daidzeína, acompanhadas de outras isoflavonas em menor proporção (Figura 2). Essas isoflavonas apresentam em sua estrutura um anel fenólico com a estrutura similar à dos nossos hormônios esteroides, como o estrogênio e corticoides (DA SILVA et al., 2009).

Figura 2. Isoflavonas glicosiladas de soja.



Fonte: Lui, 2003.

As isoflavonas, compostos derivados dos flavonoides, exercem propriedades antivirais contra uma ampla gama de vírus, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Em concentrações que variam de 3,7 mM a 370 mM das isoflavonas, incluindo a genisteína, observa-se uma eficácia na redução da infectividade de uma variedade de vírus que afetam os seres humanos e animais, dentre eles, podemos destacar os adenovírus, vírus da herpes simples, vírus da imunodeficiência humana, vírus causador da síndrome reprodutiva e respiratória de suínos e o rotavírus. A eficácia no uso de isoflavonas e flavonoides que atuam na infectividade de vírus *in vitro* depende da dose de administração e a combinação das isoflavonas utilizadas (ANDRES; DONOVAN; KUHLENSCHMIDT, 2009). Além do uso antiviral, as isoflavonas de soja são muito utilizadas na melhora da qualidade de vida de mulheres na pós-menopausa (GUIDONI; FIGUEIREDO; SILVA, 2007).

Com estas informações, é possível observar que a *Glycine max* é uma espécie qualificada para o desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos.

Para que um medicamento, fitoterápico ou não possua eficácia, é necessário realizar um controle quali e quantitativo rígido de sua composição química. No caso dos fitoterápicos, esse controle deve ser ainda mais rígido devido as diferentes quantidades de metabólitos produzidos pela planta em diferentes épocas do ano e ambientes geográficos.

Esse controle pode ser realizado por análises cromatográficas que permitam identificar e quantificar as substâncias presentes no extrato.

Vários estudos relatam o perfil cromatográfico de *Glycine max*, em que são separados e identificados os compostos majoritários registrados nos cromatogramas. Dos estudos consultados, o trabalho de Hong e col. (2011) é o que apresentou maior número de substâncias separadas e identificadas. Os autores relatam a identificação de 15 isoflavonas no perfil de *G. max*, obtido por CLAE-DAD-EM, utilizando água e MeOH como fase móvel. Dos vários trabalhos por CLAE de *G. max* consultados, muitos utilizaram solventes altamente tóxicos, como por exemplo, acetonitrila. Outros, inclusive o de Hong e col. (2011), utilizaram metanol que, embora seja menos tóxico do que a acetonitrila, pode causar cegueira permanente e até morte em pessoas com alta exposição (METHANOL...,2011).

1.3 Química verde

Esses solventes descartados nas análises geram grandes quantidades de resíduos tóxicos e, conseqüentemente necessitam de altos custos com tratamento, além de proporcionar riscos a saúde do analista.

O principal objetivo da maioria dos estudos de plantas medicinais é a comprovação científica ou refutação dos relatos etnofarmacológicos, e com isso, proporcionar alternativas naturais (sustentáveis e de baixo custo) para o tratamento de determinadas doenças. Entretanto, podemos observar que estudar fitoterápicos utilizando solventes tóxicos nos remete a uma situação contraditória. Essa contradição, tem levado diversos pesquisadores a uma busca exaustiva para desenvolver novas estratégias de estudo nas áreas da química de um modo geral, como discorre Stanley (2013):

“Hoje está óbvio que, dentro do possível, são necessários sistemas inerentemente não poluentes e sustentáveis. Sentidas pela primeira vez no século XIX, as soluções para esse imperativo são baseadas em um sistema conhecido como química verde. A química verde é definida como a prática da química e a condução da produção de maneira sustentável, segura e não poluente, com consumo mínimo de materiais e energia ao mesmo tempo em que pouco ou nenhum resíduo é gerado. Em uma palavra, a química verde é a química sustentável.”

Conhecida também como “química limpa”, a química verde é a ciência que baseada em 12 princípios, tem como principal objetivo desenvolver meios capazes de diminuir os impactos causados ao meio ambiente, reduzindo ou até mesmo eliminando substâncias tóxicas

geradas pelas indústrias e em alguns tipos de comércios. Tais princípios foram introduzidos por Anastas e Warner (1998):

1. Prevenir a formação de subprodutos;
2. Economia de átomos;
3. Sínteses com compostos de menor toxicidade;
4. Desenvolvimento de compostos seguros;
5. Evitar o uso de solventes e auxiliares;
6. Diminuir a energia gasta durante um processo químico;
7. Utilização de substâncias recicladas;
8. Diminuição de derivativos;
9. Uso de catalisadores;
10. Desenvolvimento de compostos para degradação;
11. Controlar a formação de compostos tóxicos para a prevenção da poluição;
12. Uso de substâncias seguras para evitar acidentes tais com explosões e incêndios;

Os estudos envolvendo plantas medicinais, de um modo geral, envolvem diversos procedimentos, tais como: coleta do material vegetal, preparação dos extratos, fracionamento dos extratos e identificação dos metabólitos secundários.

Dentre os procedimentos supracitados, a extração e o fracionamento, tem uma grande relevância no sentido da aplicação da química verde, pois estas duas etapas utilizam maiores quantidades de solventes orgânicos.

Chemat e colaboradores (2012) descrevem seis princípios para o estudo verde de plantas medicinais:

1. Seleção de recursos vegetais renováveis;
2. Uso de compostos de baixa ou nenhuma toxicidade, bem como água ou agrosolventes;
3. Redução do consumo de energia fazendo uso de tecnologias alternativas;
4. Prevenir a formação de subprodutos e produzir co-produtos;
5. Redução de etapas básicas no processo, as chamadas operações unitárias;
6. Obtenção de extratos vegetais sem contaminantes, biodegradáveis e não desnaturados.

No processo de fracionamento das amostras, podemos destacar o uso de diversas técnicas cromatográficas, dentre elas, a que ganha maior destaque, é a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Essa técnica emprega pequenas colunas preenchidas de substâncias químicas, que exercem forças sobre uma solução que é eluída através dessa

coluna sobre altas pressões. Apresenta capacidade de realizar separações e análises quantitativas de matrizes complexas, como os extratos vegetais em um curto período de tempo, com alta resolução, eficiência e sensibilidade. Esse processo consiste na partição dos componentes de uma mistura entre a fase móvel e a fase estacionária. Na CLAE a fase estacionária é constituída de partículas sólidas empacotadas em uma coluna, a qual é atravessada pela fase móvel. As forças físicas e químicas que atuam entre a coluna e a fase móvel são responsáveis pela separação dos constituintes da amostra (SKOOG, D. A. & LEARY, J. J, 1992)

Nessa técnica o principal solvente utilizado no fracionamento é a acetonitrila, devido a suas características únicas, tais como a dissolução de uma ampla gama de solutos, baixa acidez, reatividade química mínima, baixa absorbância na região do ultravioleta e compatibilidade com a espectrometria de massas. Contudo, o mesmo apresenta toxicidade elevada podendo ser fatal se aspirado, inalado ou absorvido pela pele, pois afeta o sistema cardiovascular, sistema nervoso central, fígado e rins.

Com o objetivo de auxiliar os pesquisadores a substituir solventes e/ou reagentes tóxicos por solventes e/ou reagentes menos ou não tóxicos em processos químicos ou não, foram publicadas, pelo *Green Institute* da *American Chemical Society* e *Pfizer*, guias com classificações de solventes quanto as suas toxicidades e essas classificações foram nomeadas como “ACSGCI – *Green Solvent Selection Guide*” e a “*Pfizer Medicinal Chemistry – Solvent Selection Guide*”.

1.4 Quimiometria

Diante dos fatos apresentados, o desenvolvimento de metodologias cromatográficas verdes, visando o controle de qualidade de extratos e/ou fitoterápicos por CLAE, pode ser considerado uma estratégia interessante, uma vez que a desvantagem na utilização de solventes nocivos ao meio ambiente é sanada, havendo então, um máximo aproveitamento da técnica sem causar danos ao meio ambiente e a saúde do analista.

Aliada a essa técnica, podemos usar a quimiometria, aonde aplica-se um planejamento experimental como uma estratégia rápida e racional para o desenvolvimento de métodos cromatográficos, em que é possível identificar quais variáveis possuem efeitos significativos na separação dos compostos presentes em uma matriz vegetal. Essa técnica consiste inicialmente, na utilização de um planejamento fatorial fracionário para uma triagem de variáveis (parâmetros cromatográficos) que, estatisticamente, permitem identificar quais são significativas nas análises por CLAE e, posteriormente com outros planejamentos como: fatorial com-

pleto, planejamento de composto central, Doehlert. Determinando assim os valores considerados ideais e experimentalmente viáveis para cada uma dessas variáveis (GUARDIA, 1999).

Com o uso do planejamento fatorial é possível:

1. Observar interações sinérgicas ou antagônicas entre as variáveis;
2. Prever a resposta do sistema em estudo em uma condição que não foi testada na prática;
3. Conhecer antecipadamente quantos experimentos deverão ser realizados para alcançar determinado objetivo; e
4. Gerar menos resíduos químicos (talvez matemáticos também), o que contribui para os princípios de química verde e economia de tempo. (BEACH, CUI & ANASTAS 2009, ZHENG et al. 2013 e TOBISZEWSKI et al. 2013)

2. OBJETIVO

Desenvolver um método de preparo de amostra e determinar os parâmetros cromatográficos significativos na separação dos metabólitos secundários do extrato hidroalcoólico dos grãos (EHA) de *Glycine Max* por CLAE, utilizando etanol e água como fase móvel.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reagentes utilizados

Solventes PA

Ácido Acético Glacial (AcOH, Synth[®]), Água ultrapura e Etanol 95% (EtOH, Synth[®])

Solventes grau HPLC

EtOH 95% (EtOH) (Vetec[®])

3.2. Obtenção do material vegetal

Os grãos de *Glycine Max* foram adquiridos comercialmente em um varejo da cidade de Bauru.

3.3. Preparação dos extratos

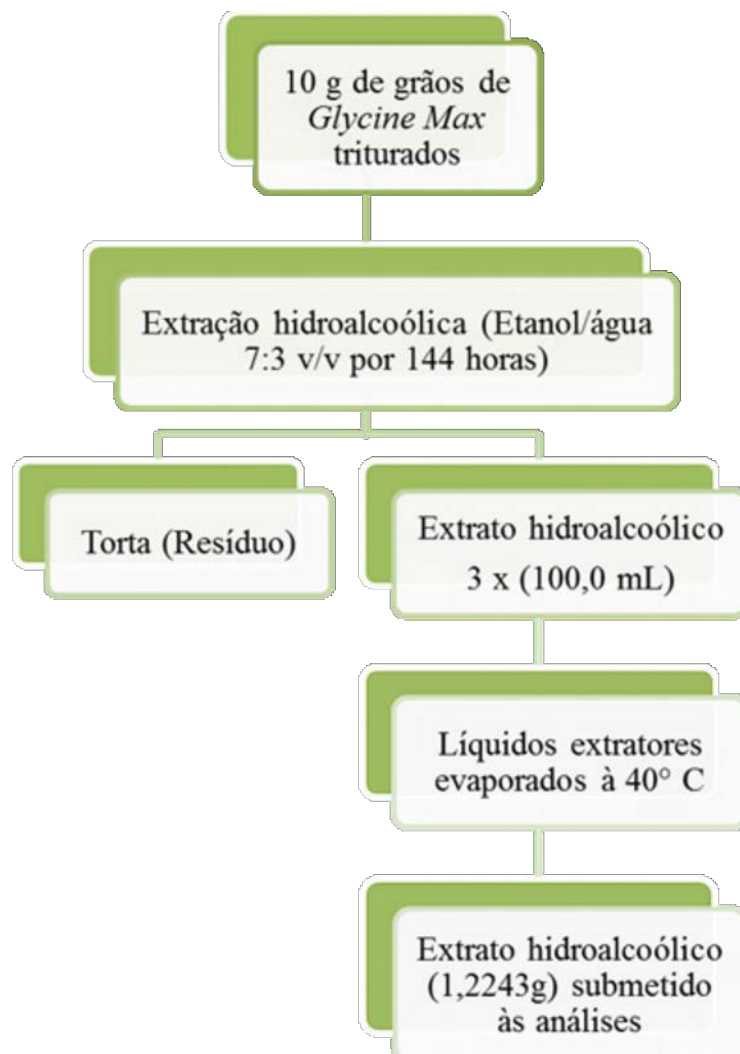
Os grãos de soja foram triturados em um triturador industrial Vithory[®] TR006 e guardados em um recipiente devidamente fechado e ao abrigo da luz.

O material triturado foi utilizado para a preparação do EHA, em que 10g do pó foi imerso em 100,0 mL de uma mistura extratora de EtOH/H₂O (7:3, v/v) na proporção de 1:10 (material vegetal/mistura extratora) durante 144 horas. A mistura extratora foi substituída a cada 48 horas.

Após a extração, os líquidos extratores foram evaporados em um evaporador rotativo sob pressão reduzida (Buchi[®], modelo R 215) a 40° C.

O extrato foi transferido para um recipiente de vidro tarado e deixado em estufa a 40° C até a completa remoção da H₂O, resultando em 1,2243 g de massa do EHA. O EHA foi armazenado em freezer para posteriores análises. O esquema resumido está representado na Figura 3.

Figura 3. Esquema resumido da preparação do extrato hidroalcoólico dos grãos de *G. max*.



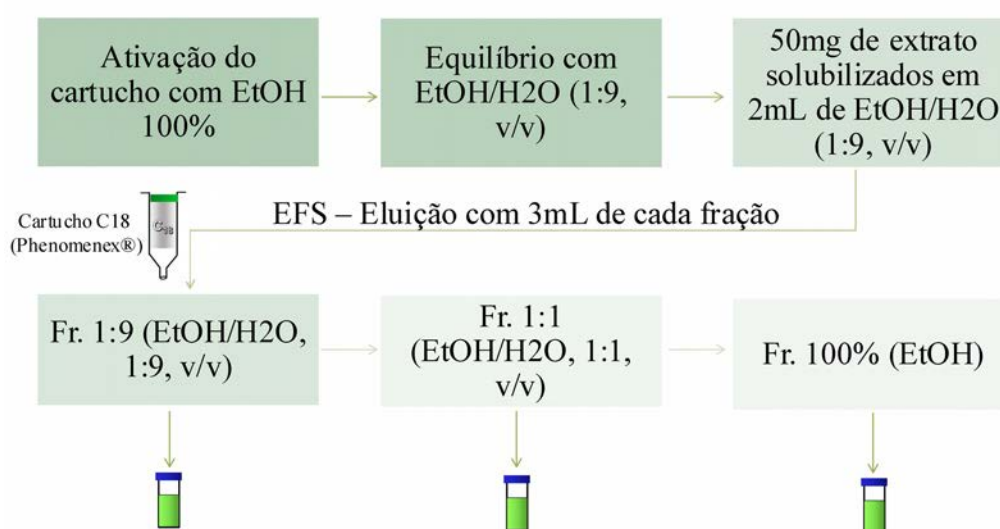
3.4. Preparo de amostra (*clean-up*) do extrato hidroalcoólico dos grãos de *G. max*

Para a realização do *clean-up*, 50 mg do extrato foram solubilizados em 2 mL de uma mistura de EtOH/H₂O (7:3, v/v). O cartucho C₁₈ (Phenomenex®, Strata, 500mg-3mL) foi ativado com EtOH e na sequência ambientado com a fase móvel (1:9 de EtOH/H₂O) e logo em seguida a amostra foi aplicada no cartucho. Com a amostra no cartucho, três frações diferentes da amostra foram obtidas a partir de 3 eluições diferentes: fr. 1:9 (EtOH/H₂O, 1:9, v/v), fr. 1:1 (EtOH/H₂O, 1:1, v/v) e a fr. 100% EtOH, onde foram utilizados 3 mL de fase móvel para eluir cada fração. O esquema resumido do preparo da amostra está representado na Figura 4.

Paralelamente, foram aplicados 50 mg de extrato solubilizados em 2 mL de EtOH/H₂O (7:3, v/v) em um cartucho C₁₈ (*Phenomenex*[®], Strata, 500mg-3mL), previamente ativado com EtOH e ambientado com 3 mL de EtOH/H₂O (7:3, v/v). A amostra foi eluída com 3 mL da fase móvel.

Em seguida, as frações coletadas foram filtradas em disco de membrana de PTFE (*Allcrom*[®], 25 mm) com poros de 0,45 µm e injetadas no sistema CLAE-DAD.

Figura 4. Esquema resumido do preparo de amostra dos grãos de *G. max*



3.5. Análises por CLAE

Para as análises realizadas por CLAE utilizou-se um cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector de arranjo de foto diodos (CLAE-DAD) da marca *Jasco*[®] equipado com bomba quaternária modelo PU – 2089 Plus, detector DAD modelo MD – 2010 Plus, injetor automático modelo AS – 2055 Plus, coluna analítica de fase reversa C₁₈ XBridge (150 x 4,6 mm) com uma pré coluna (4x3 mm, 5µm).

Nas análises que avaliaram a eficiência dos diferentes preparos de amostra (seção 3.4) o modo de eluição utilizado foi gradiente com a seguinte programação da fase móvel: 95:5 a 0:100 % (H₂O+ HAc 0,5% / EtOH, v/v) em 60 minutos com vazão de 1 mL.min⁻¹ e temperatura de 35 °C.

Para as análises do planejamento fatorial, as condições variaram em cada experimento como descrito na seção 3.6.

3.6. Triagem das variáveis

Para a determinação dos efeitos dos fatores cromatográficos foi aplicado um planejamento fatorial fracionário de cinco fatores e dois níveis (Tabela 1).

Os cálculos referentes as análises estatísticas foram realizados no programa gratuito GNU Octave® ver. 4.0.0.

Tabela 1. Fatores (variáveis) e níveis estabelecidos na triagem para desenvolvimento do método de eluição verde por CLAE de *G. max*.

Fatores	níveis	
	-1	+1
X1. % inicial de EtOH	5	10
X2. % final de EtOH	20	40
X3. Temperatura das análises (°C)	35	80
X4. % de AcOH	0,1	0,5
X5. Vazão (mL/min)	0,5	1,0

O planejamento utilizado foi o planejamento fatorial fracionário, com cinco fatores (variáveis) e dois níveis (2^{5-1}) que totalizaram dezesseis experimentos (Tabela 2).

A contagem do número de picos nos cromatogramas foi realizada no programa gratuito OpenChrom® ver. 1.1.0.

Tabela 2. Planejamento fatorial fracionário com 2 níveis e 5 fatores (2^{5-1}) para análises de *G. max*.

Experimento	X1	X2	X3	X4	X5
1	-1 (5%)	-1 (20%)	-1 (35° C)	-1 (0,1%)	+1 (1 mL/min)
2	+1 (10%)	-1 (20%)	-1 (35° C)	-1 (0,1%)	-1 (0,5 mL/min)
3	-1 (5%)	+1 (40%)	-1 (35° C)	-1 (0,1%)	-1 (0,5 mL/min)
4	+1 (10%)	+1 (40%)	-1 (35° C)	-1 (0,1%)	+1 (1 mL/min)
5	-1 (5%)	-1 (20%)	+1 (80° C)	-1 (0,1%)	-1 (0,5 mL/min)
6	+1 (10%)	-1 (20%)	+1 (80° C)	-1 (0,1%)	+1 (1 mL/min)
7	-1 (5%)	+1 (40%)	+1 (80° C)	-1 (0,1%)	+1 (1 mL/min)
8	+1 (10%)	+1 (40%)	+1 (80° C)	-1 (0,1%)	-1 (0,5 mL/min)
9	-1 (5%)	-1 (20%)	-1 (35° C)	+1 (0,5%)	-1 (0,5 mL/min)
10	+1 (10%)	-1 (20%)	-1 (35° C)	+1 (0,5%)	+1 (1 mL/min)
11	-1 (5%)	+1 (40%)	-1 (35° C)	+1 (0,5%)	+1 (1 mL/min)
12	+1 (10%)	+1 (40%)	-1 (35° C)	+1 (0,5%)	-1 (0,5 mL/min)
13	-1 (5%)	-1 (20%)	+1 (80° C)	+1 (0,5%)	+1 (1 mL/min)
14	+1 (10%)	-1 (20%)	+1 (80° C)	+1 (0,5%)	-1 (0,5 mL/min)
15	-1 (5%)	+1 (40%)	+1 (80° C)	+1 (0,5%)	-1 (0,5 mL/min)
16	+1 (10%)	+1 (40%)	+1 (80° C)	+1 (0,5%)	+1 (1 mL/min)

As respostas utilizadas para a determinação das variáveis de maiores efeitos na separação dos metabólitos secundários do EHA de *G. max* foram o número de picos e a função-resposta GCFR, (*Green Chromatographic Fingerprint Response* (Equação 1), desenvolvida pelo nosso grupo (FUNARI et al., 2014).

Equação 1. Função-resposta GCFR (*Green Chromatographic Fingerprint Response*).

$$GCFR = n^x \left(\frac{FP}{MP} \right) \left(\frac{n}{t} \right)$$

Nessa equação n representa o número total de picos no cromatograma, x é o expoente de n, que pode variar de acordo com a resposta que se deseja obter, se x for igual a 1, teremos uma resposta linear e se x for igual a 2, teremos uma resposta exponencial. T é o tempo total da análise. FP e MP são, respectivamente, a metade do cromatograma com menor número de picos e a metade do cromatograma com o maior número de picos. Esse fator foi desenvolvido para que além de uma boa separação dos picos no cromatograma tenhamos também uma boa resolução dos mesmos ao longo de uma análise. Quanto maior for o fator CGFR, maior será a eficiência de uma separação por CLAE, no quesito número de picos e distribuição dos mesmos por minuto de análise (FUNARI et al., 2014).

4. DESENVOLVIMENTO, RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Rendimento do extrato hidroalcoólico das folhas de *Glycine max*

Com a maceração dos grãos de *G. max* foi possível obter um rendimento de 12,24% do EHA (Tabela 3).

Tabela 3. Rendimento do EHA dos grãos de *G. max* coletados.

Material	Quantidade
Grãos moídos	300 g
Pó utilizado na extração	10 g
Líquidos extratores	300 mL
Extrato	1,2243g
Rendimento	12,24%

4.2. Avaliação do *clean-up* dos grãos de *G. max* por CLAE-DAD

O EHA dos grãos de *G. max* foi submetido a dois métodos de *clean-up* com extração em fase sólida (EFS), utilizando cartuchos *Sep-pack* de C₁₈ para a remoção das substâncias apolares que podem ficar adsorvidas na coluna de fase reversa do sistema CLAE, prejudicando o funcionamento da coluna e reduzindo o seu tempo de vida (seção 3.4).

Nas análises por CLAE-DAD foram utilizadas as condições descritas na seção 3.5. A água da fase móvel foi acidificada a fim de se evitar o encaudamento dos picos dos metabólitos presentes no EAH, pois as isoflavonas possuem grupos fenólicos que podem sofrer ionização. Portanto, a função do ácido na fase móvel, é de suprimir essa ionização de compostos de caráter ácido. A escolha do AcOH e do EtOH foi baseada na classificação dos guias “ACSGCI – *Green Solvent Selection Guide*” e do “Pfizer Medicinal Chemistry – *Solvent Selection Guide*”.

Nesse ponto, é importante frisar a importância do *clean-up* no processo de triagem de variáveis e na utilização de CLAE verde, pois o mesmo permite que as substâncias que possam causar interferências nas análises, sejam eliminadas antes que a amostra seja injetada no cromatógrafo. Assim, podemos obter uma concentração mais alta dos análitos de interesse e um aumento na sensibilidade do método.

No cromatograma obtido para a fração fr. 1:9 (Figura 5) é possível observar a presença de picos com tempo de retenção baixo que representam substâncias de alta

polaridade. A análise dos espectros UV (Figura 6.) dos picos majoritários permitiu a identificação de alguns ácidos fenólicos e alguns flavonoides glicosilados (Paiva, 2002), que podemos destacar o ácido hidróxido benzóico (Mira, et al. 2008), ácido gálico (Cuellar, 2013).

Figura 5. Cromatograma da fr. 1:9 do *clean-up* do EHA dos grãos de *G. max*. Sistema CLAE-DAD; coluna analítica de fase reversa C₁₈ XBridge (150 x 4,6 mm) com pré coluna (4x3 mm, 5μm); Solvente A: H₂O + 0,5% AcOH; Solvente B: EtOH. Gradiente de 5-100% de B em 60 min; vazão de 1,00 mL min⁻¹; λ=254nm.

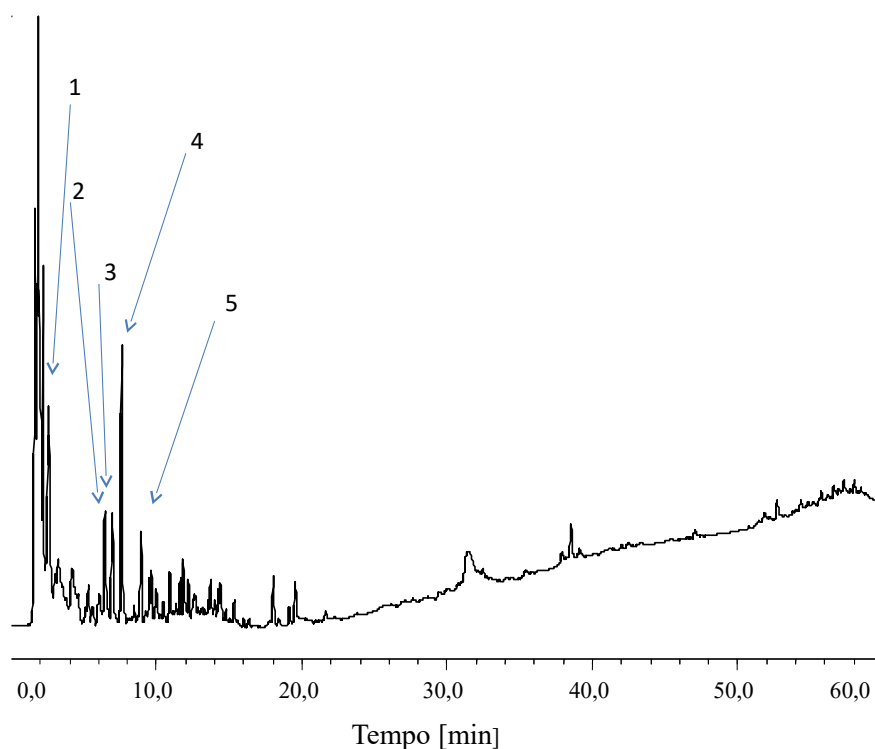
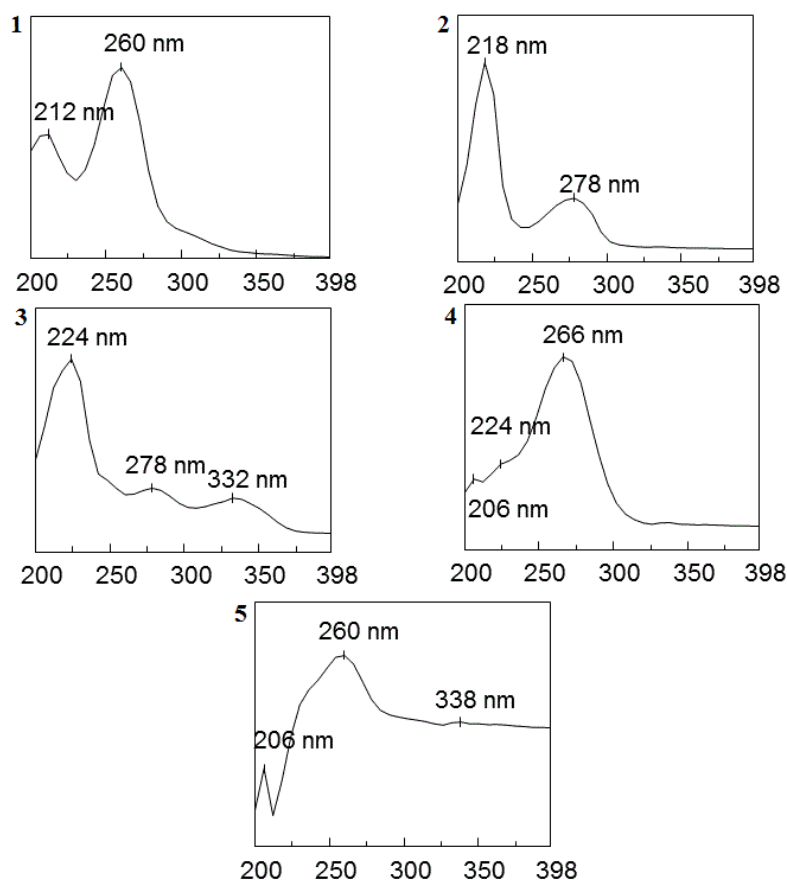


Figura 6. Espectros ultravioletas dos picos majoritários da fr. 1:9 do *clean-up* do EHA dos grãos de *G. max*.



No cromatograma da fração 1:1 (Figura 7) é possível observar a presença de picos com tempo de retenção maiores do que os da fr. 1:9, que classificamos como substâncias de média polaridade. Nesse cromatograma, a intensidade dos picos permitiu analisar os espectros UV dos picos majoritários, evidenciando a presença de isoflavonas (Paiva, 2002) (Figura 8).

Com os espectros UVs dos picos 4, 5 e 6 da figura 7 não foi possível identificar nenhuma substância de interesse, as mesmas podem estar em concentrações muito baixas, ou não absorvem na região do ultravioleta.

Figura 7. Cromatograma da fr. 1:1 do *clean-up* do EHA dos grãos de *G. max*. Sistema CLAE-DAD; coluna analítica de fase reversa C₁₈ XBridge (150 x 4,6 mm) com pré coluna (4x3 mm, 5 μ m); Solvente A: H₂O + 0,5% AcOH; Solvente B: EtOH. Gradiente de 5-100% de B em 60 min; vazão de 1,00 mL min⁻¹; λ =254nm.

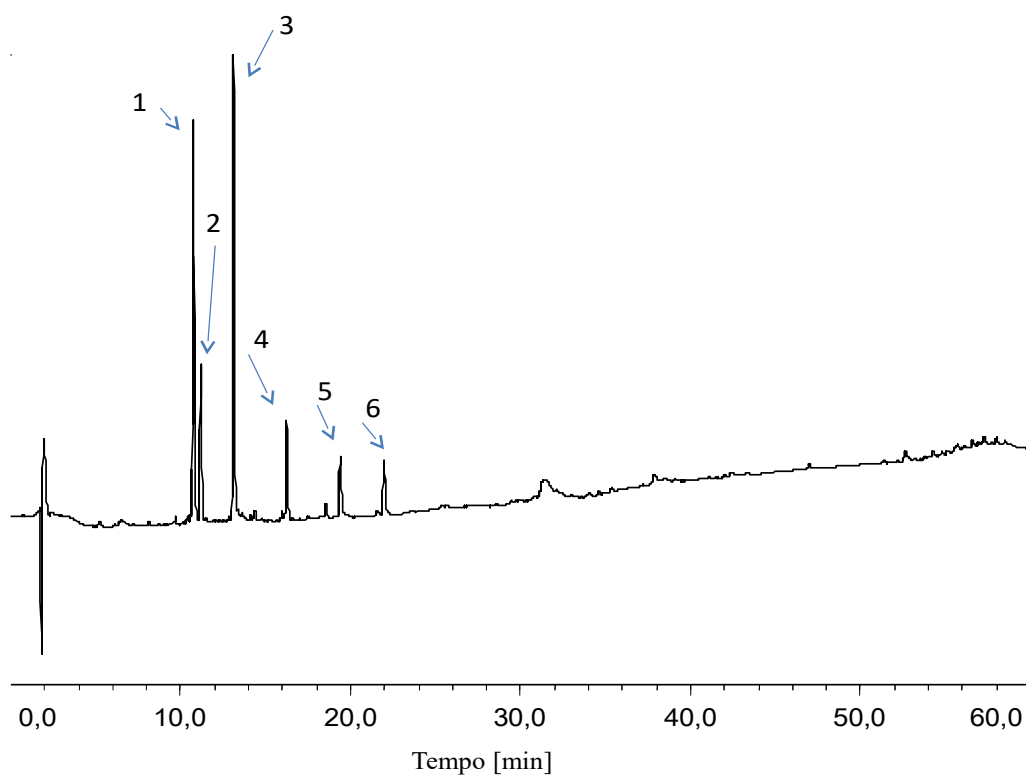
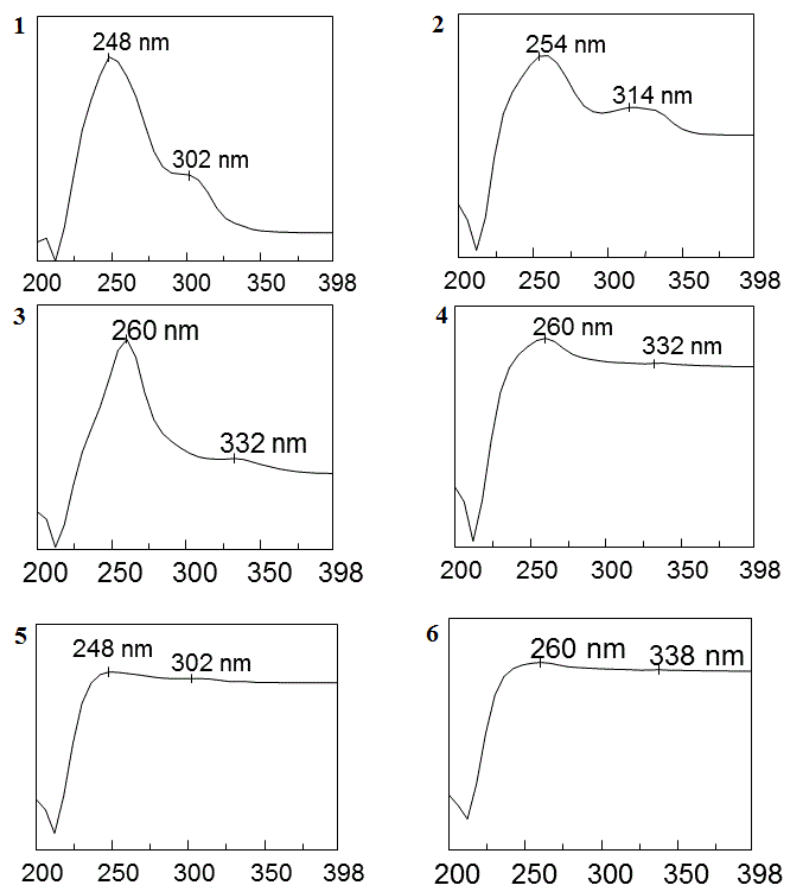
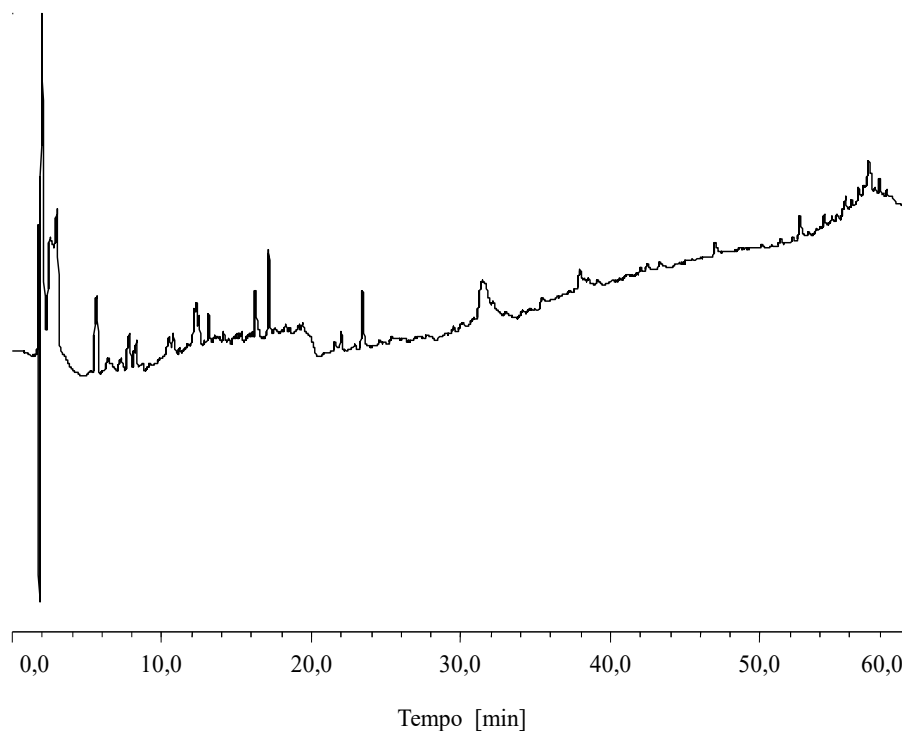


Figura 8. Espectros ultravioletas dos picos majoritários da fr. 1:1 do *clean-up* do EHA dos grãos de *G. max*.



No cromatograma da fr. 100% EtOH (Figura 9) é possível observar que as substâncias estão presentes em quantidades muito pequenas, podendo ser confundidas com os ruídos da linha de base e, com isso, não sendo possível analisar os espectros UV.

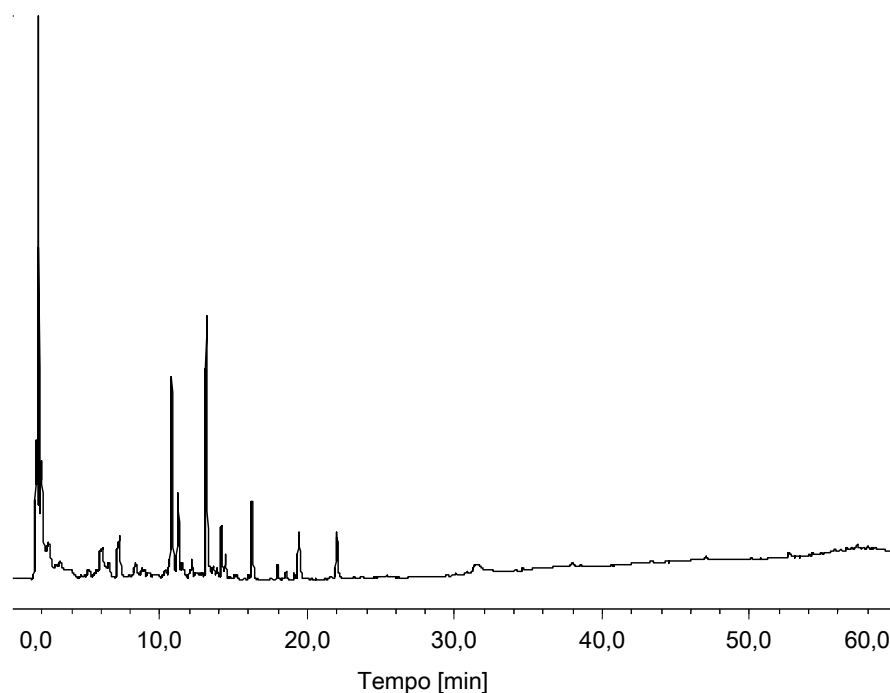
Figura 9. Cromatograma da fr. 100% EtOH do *clean-up* do EHA dos grãos de *G. max*. Sistema CLAE-DAD; coluna analítica de fase reversa C₁₈ XBridge (150 x 4,6 mm) com pré coluna (4x3 mm, 5µm); Solvente A: H₂O + 0,5% AcOH; Solvente B: EtOH. Gradiente de 5-100% de B em 60 min; vazão de 1,00 mL min⁻¹; λ=254nm.



Por último, no cromatograma da fr. 7:3 (Figura 10), fração proveniente do segundo método de *clean-up*, foi possível observar a presença das substâncias da fr. 1:9 e fr. 1:1 juntas e com intensidade que permitiu analisar os espectros UV. Os picos majoritários da fr 7:3 apresentam os ácidos fenólicos identificados na fr 1:9 o ácido gálico e o ácido hidróxido benzóico e os flavonóides encontrados na fr 1:9 e na 1:1.

O segundo método de *clean-up* permitiu concentrar as substâncias representativas do extrato em uma única fração, com apenas uma eluição. Esse método possibilita o preparo da amostra de *G. max* em menor tempo e com menor desperdício de solventes, obedecendo os princípios da Química Verde. Portanto, foi o escolhido para ser utilizado nas próximas etapas deste trabalho.

Figura 10. Cromatograma da fr. 7:3 do segundo método de *clean-up* avaliado para o EHA dos grãos de *G. max*. Sistema CLAE-DAD; coluna analítica de fase reversa C₁₈ XBridge (150 x 4,6 mm) com pré coluna (4x3 mm, 5μm); Solvente A: H₂O + 0,5% AcOH; Solvente B: EtOH. Gradiente de 5-100% de B em 60 min; vazão de 1,00 mL min⁻¹; λ=260nm.



4.3. Identificação dos parâmetros cromatográficos de maior interferência na separação dos metabólitos secundários presentes no EHA dos grãos de *G. max* por CLAE-DAD utilizando EtOH e água como fase móvel (Triagem de variáveis)

Essa etapa teve o objetivo de identificar, dentre um número de variáveis, aquela(s) que apresenta(m) maior importância no desenvolvimento de um método. Para isso, os níveis de cada fator (variáveis) foram estipulados com base no comportamento dos constituintes presentes na análise da fr. 7:3 do *clean-up*, baseando-se na polaridade.

Para evitar-se um tempo de análise muito grande, baseado no número de picos observados no *clean-up*, o tempo de análise foi fixado em 30 min.

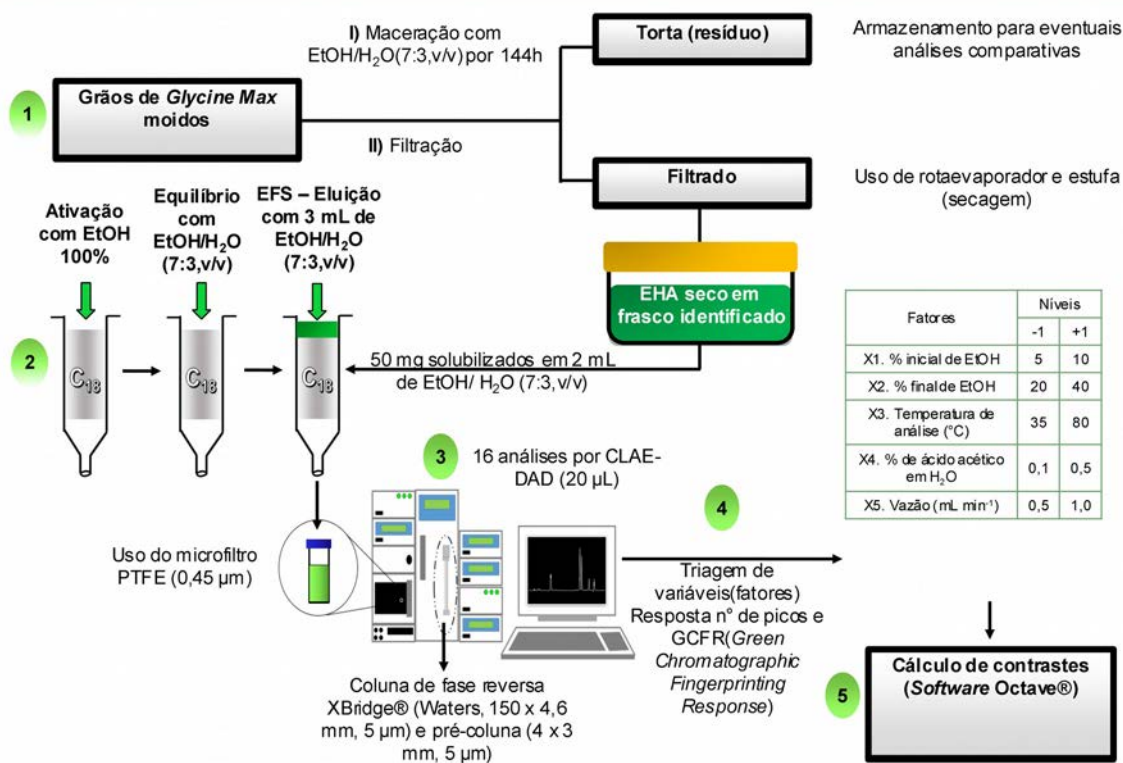
O volume de injeção e a concentração da amostra também foram fixados com valores que permitissem a análise dos espectros UV das substâncias eluídas e esses valores foram 20 μL e 1g.L⁻¹, respectivamente.

Após o estabelecimento dos fatores e níveis, foi realizado um Planejamento Fatorial Fracionário de 2 níveis e 5 fatores (2v⁵⁻¹, Tabela 1), cujas combinações totalizaram 16 análises

por CLAE (Tabela 2), descritas na seção 3.6.

Todo o procedimento resumido está representado no esquema da Figura 11.

Figura 11. Esquema representativo de preparo e análise do EHA dos grãos de *G. max*.



Fonte: SOUZA, 2016 (Com adaptações)

As respostas analisadas tiveram o objetivo de realizar uma leitura qualitativa e quantitativa da amostra, encontrando uma relação entre o número de picos e a sua distribuição por todo o cromatograma em um determinado intervalo de tempo. É uma abordagem de extrema relevância no desenvolvimento de métodos cromatográficos de extratos de plantas, bem como de outras amostras complexas. Quanto maior o valor obtido de GCFR para uma determinada análise, melhor a distribuição dos picos ao longo do cromatograma. O número total de picos e o GCFR de cada análise estão relacionados na Tabela 4, bem como os seus respectivos cromatogramas nas Figuras 12 e 13. A atribuição dos níveis -1 e +1 (baixo e alto, respectivamente) são alternados a cada 1, 2, 4 e 8 experimentos para as análises X1, X2, X3 e X4, respectivamente, ao passo que para a X5 os níveis são obtidos através da combinação das outras variáveis.

Tabela 4. Planejamento experimental de dois níveis e cinco fatores de um fatorial fracionário 2_v^{5-1} e as respostas obtidas para cada análise do EHA dos grãos de *G. max*.

Experimento	X1	X2	X3	X4	X5	Nº. de Picos	GCFR
1	-1	-1	-1	-1	+1	13	4,8
2	+1	-1	-1	-1	-1	11	3,4
3	-1	+1	-1	-1	-1	25	19,2
4	+1	+1	-1	-1	+1	20	5,7
5	-1	-1	+1	-1	-1	18	8,6
6	+1	-1	+1	-1	+1	10	0,4
7	-1	+1	+1	-1	+1	20	1,5
8	+1	+1	+1	-1	-1	16	1,2
9	-1	-1	-1	+1	-1	15	5,0
10	+1	-1	-1	+1	+1	12	1,6
11	-1	+1	-1	+1	+1	28	10,5
12	+1	+1	-1	+1	-1	13	4,8
13	-1	-1	+1	+1	+1	15	3,8
14	+1	-1	+1	+1	-1	13	1
15	-1	+1	+1	+1	-1	24	6,4
16	+1	+1	+1	+1	+1	13	0,0

Figura 12. Cromatogramas da triagem de variáveis de *G. max* dos experimentos 1 ao 8; $\lambda=260\text{nm}$.

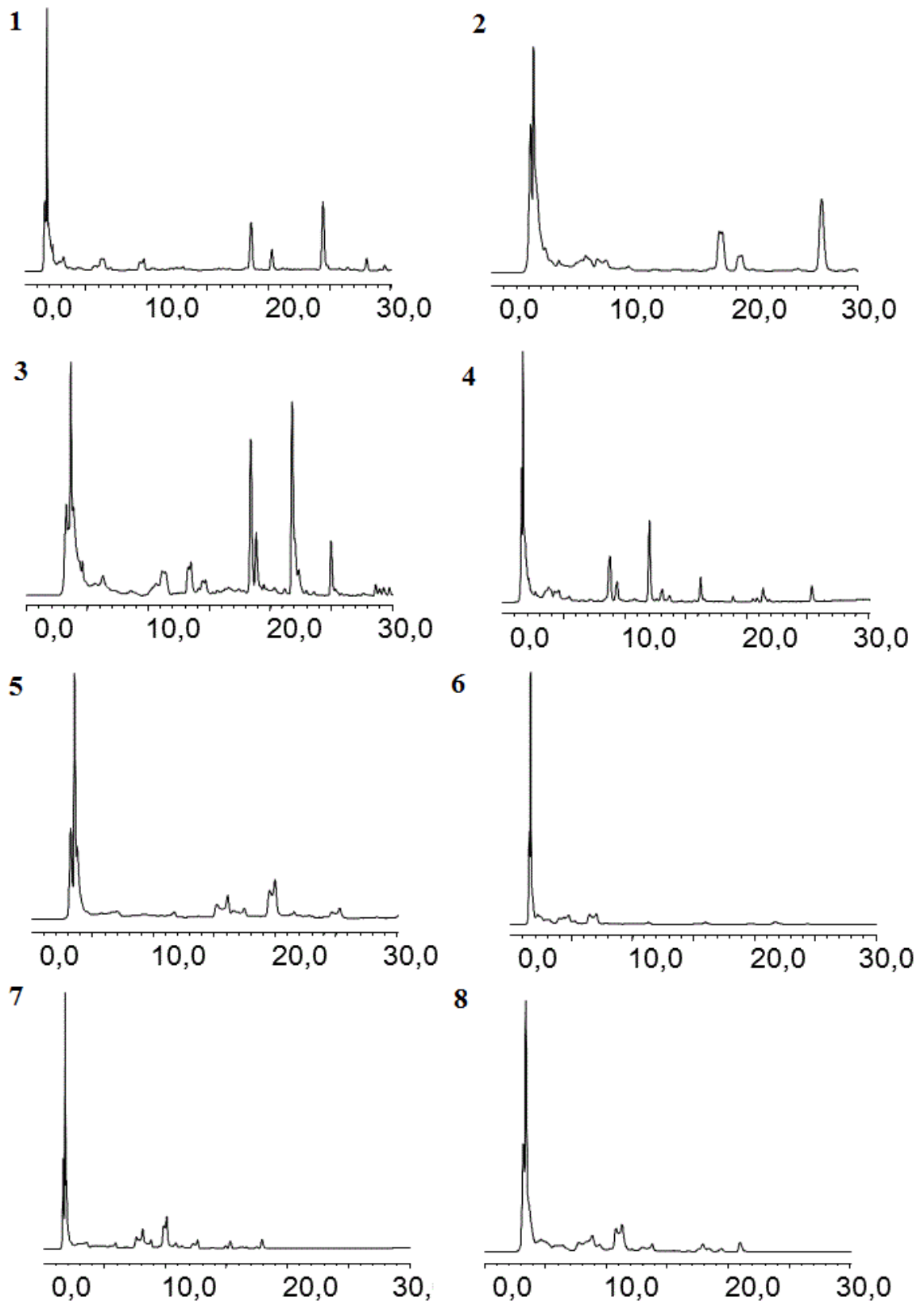
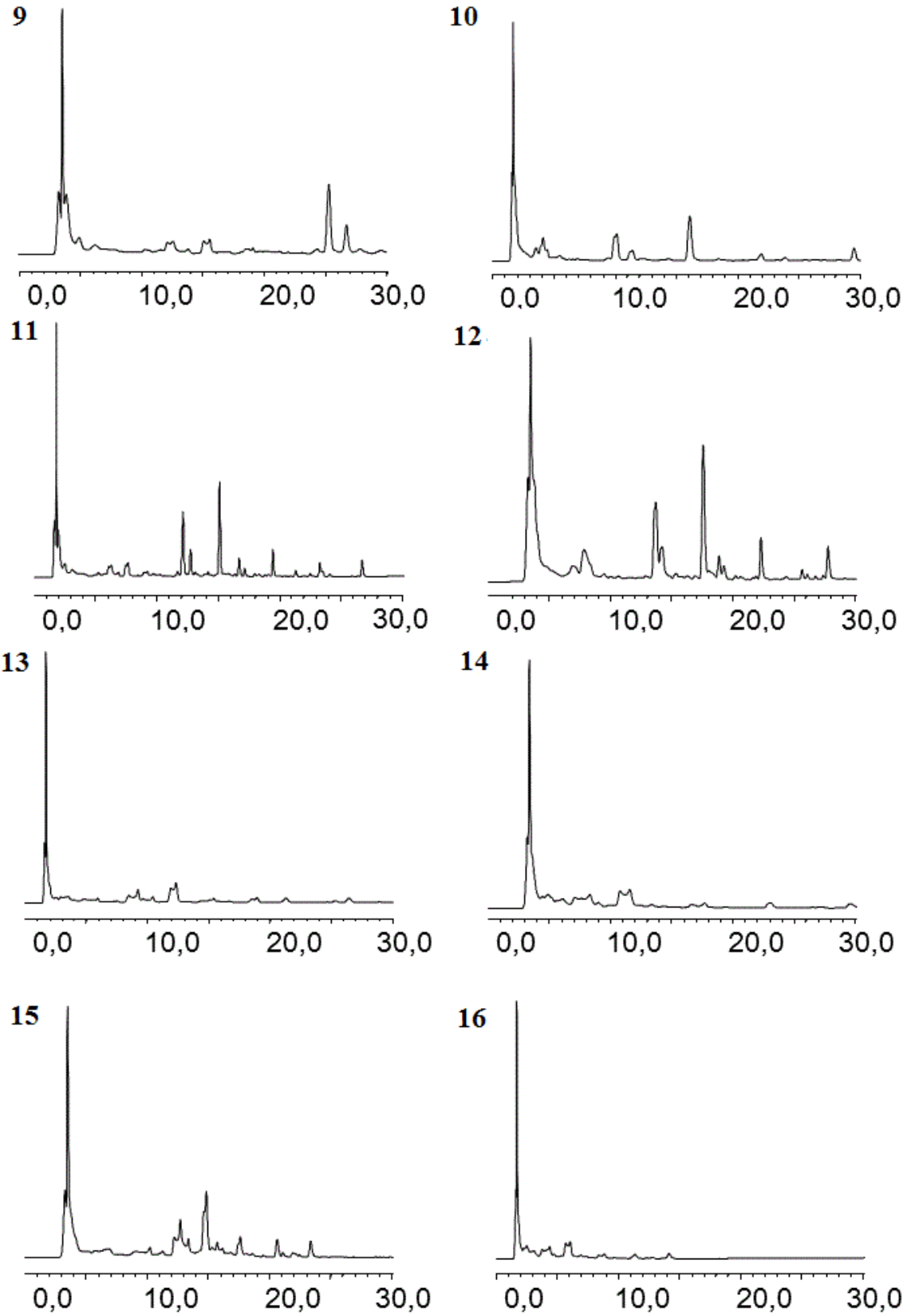


Figura 13. Cromatogramas da triagem de variáveis de *G. max* dos experimentos 9 ao 16; $\lambda=260\text{nm}$.



As duas respostas obtidas na triagem foram utilizadas para calcular os efeitos de cada fator estudado e suas combinações.

Como é possível observar no gráfico normal da resposta número de picos (Figura 14), os contrastes que apresentaram efeitos significativos foram os referentes aos fatores X1 (% inicial de EtOH) e X2 (% final de EtOH). No gráfico normal da resposta GCFR (Figura 15), apenas o fator X2 apresentou contraste com efeito significativo.

Figura 14. Gráfico normal dos valores dos efeitos calculados para a resposta Número de Picos.

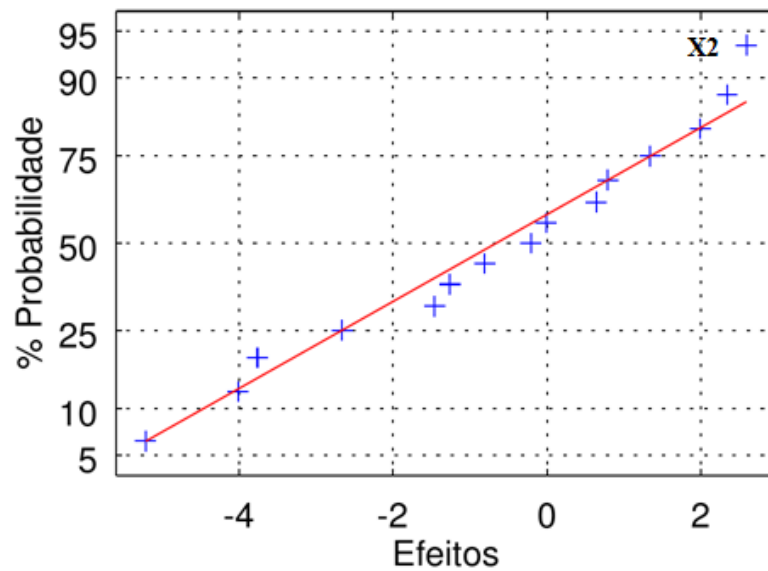
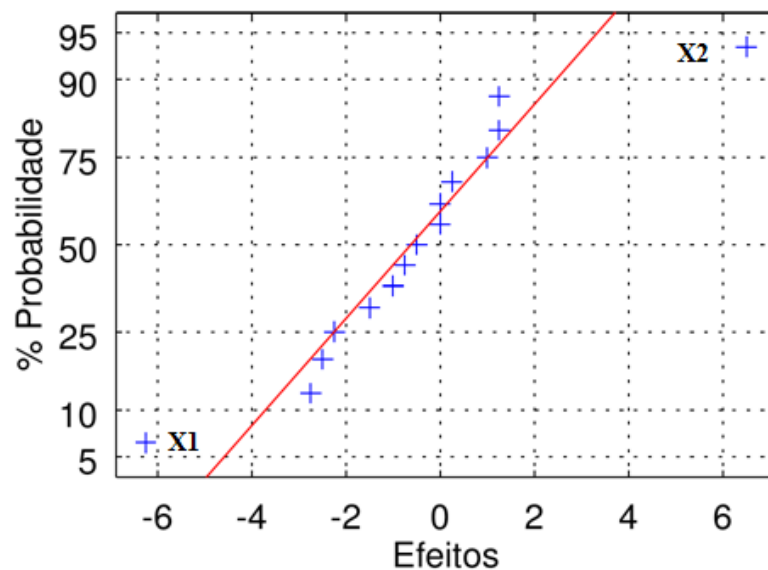


Figura 15. Gráfico normal dos valores dos efeitos calculados para a resposta GCFR (x=1).



Os fatores X_1 (% inicial de EtOH) e X_2 (%final de EtOH) interferem na taxa de aumento de EtOH na fase móvel, ou seja, interfere diretamente na força de eluição da fase móvel.

Maiores taxas de aumento de EtOH ($X_1=+1$ e $X_2=+1$) proporcionam maior força de eluição e, portanto, as substâncias interagem menos com a fase estacionária, provocando co-eluição de picos, o que diminui o número de picos no cromatograma, além de provocar eluição das substâncias em menor tempo prejudicando a distribuição dos picos ao longo do cromatograma. As menores taxas de aumento de EtOH ($X_1=-1$ e $X_2=-1$) provocam o efeito inverso, porém, menores taxas podem resultar em análises com tempo muito longo e picos largos que prejudicam a resolução.

Portanto, esses fatores precisam ser analisados com maiores detalhes (aumento de níveis) para que possa estabelecer um modelo matemático capaz de determinar os valores ótimos de X_1 e X_2 para a obtenção de um cromatograma com maior número de picos e com a melhor distribuição possível desses picos no cromatograma (maior GCFR).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O método de *clean-up* desenvolvido mostrou-se simples e ambientalmente amigável com apenas uma etapa de eluição, utilizando EtOH:H₂O (7:3, v/v) como fase móvel.

Dos cinco parâmetros cromatográficos avaliados para as análises por CLAE utilizando EtOH e H₂O como fase móvel, apenas a porcentagem inicial e a porcentagem final de EtOH apresentaram efeitos significativos na separação dos metabólitos secundários presentes no EHA dos grãos de *G. max*.

O EtOH como alternativa para substituição da ACN e MeOH nas etapas cromatográficas do estudo de plantas medicinais é uma proposta que visa a diminuição da toxicidade dos resíduos e sua fonte de obtenção é renovável. Além disso, o EtOH é um solvente de fácil obtenção no Brasil, em especial no interior do estado de São Paulo.

Portanto, os resultados deste trabalho podem auxiliar no desenvolvimento de método, ambientalmente amigável e sustentável, para aplicação da CLAE em análises de extratos polares de *G. max*.

Por fim, com essas estratégias racionais de desenvolvimento de métodos com o auxílio da quimiometria podem encorajar os analistas a incluir parâmetros ambientais e de segurança nas rotinas de trabalho. Um esforço coletivo pode contribuir para uma mudança de paradigmas na escolha de solventes, reduzindo a quantidade de solventes prejudiciais utilizados por massa de composto identificada ou isolada e preservando a saúde de estudantes e pesquisadores envolvidos na pesquisa.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGÊNCIA EMBRAPA DE INFORMAÇÃO TECNOLÓGICA. Embrapa. Árvore do conhecimento: Família *Fabaceae*. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/especies_arboreas_brasileiras/arvore/CONT000fu17wvyo02wyiv807nyi6s9ggg9il.html>. Acesso em: 11 jan. 2017.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 26, de 13 de maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 14 mai. 2014. Disponível em: <<http://www.in.gov.br>>. Acesso em: 11 jan. 2017.
- ALMASSY J, A. LOPES, R. C. ARMOND, C. S, F. CASALI, V. W. D. **Folhas de Chá – plantas medicinais na Terapêutica Humana**. UFV: Viçosa, 2005.
- ANASTAS, P. T.; WARNER, J. C. **Green Chemistry: Theory and Practice**. New York: Oxford University Press, 1998. 135 p.
- ANDRES, A.; DONOVAN, S. M.; KUHLENSCHMIDT, M. S. *Soy isoflavones and virus infections*. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 20, p. 563–569, 2009.
- BADKE, M.R. et al. Plantas medicinais: o saber sustentado na prática do cotidiano popular. **Escola Anna Nery**, v.15, n.1, p.132-9, 2011
- BEACH, E. S.; CUI, Z.; ANASTAS, P. T. *Green chemistry: a design framework for sustainability*. **Energy and Environmental Science**, v. 2, p. 1038-1049, 2009.
- BIBLIOTECA VIRTUAL EM SAÚDE. MS elabora Relação de Plantas Medicinais de interesse ao SUS. Brasília: Agência Saúde, 2009. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/sus/pdf/marco/ms_relacao_plantas_medicinais_sus_0603.pdf>. Acesso em: 11 jan. 2017.
- CAIREEN R. HARGREAVES, ASTRAZENECA, JULIE B. MANLEY, ACS GREEN CHEMISTRY INSTITUTE. **ACS GCI Pharmaceutical Roundtable: Collaboration to Deliver a Solvent Selection Guide for the Pharmaceutical Industry**. Disponível em: <www.acs.org/gcipharmaroundtable> Acesso em: 11 Jan 2017
- CARLINI, C. **Ureases de Glycine max**. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/laprotox/print/165>>. Acesso em: 11 jan. 2017.
- CHEMAT, F.; VIAN, M. A.; CRAVOTTO, G. *Green extraction of Natural Products: Concept and principles*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 8615-8627, 2012
- COSTA, A, F, E; FROTA, J, G; LIMA, M, C; MORAES, M, O. Plantas medicinais utilizadas por pacientes atendidos nos ambulatórios do Hospital Universitário Walter Cantídio da Universidade Federal do Ceará. **Pesq. Med. Fortaleza**, v. 1, n. 2, p. 20-25, 1998.

CUELLAR, F. A.; ARIZA, E.; ANZOLA, C.; RESTREPO, P.; Capacidade antioxidante de aracá-boi (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh) durante a maturação. *Revista Colombiana de Química*. Vol.42 no.2 Bogotá. Ago 2013

DA SILVA, C. R.; LIMA, S. M. R. R.; ALVES, D. L.; AOKI, T. Análise crítica dos efeitos da *Glycine max* nas doenças cardiovasculares e seus fatores de risco. **Femina**, v. 37, n. 2, p. 107-113, 2009.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Embrapa Soja. **Soja em números (safra 2013/2014)**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>>. Acesso em: 11 jan. 2017.

FIRMO, W.C.A.; MENEZES, V.J.M.; PASSOS, C.E.C.; DIAS, C.N.; ALVEZ, L.P.L.; DIAS, I.C.L.; NETO, M.S.; OLEA, L.S.G. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. 2011. Disponível em: <<http://www.periodicoseletronicos.ufma.br/index.php/cadernosdepesquisa/article/view/746/454>>. Acesso em: 11 jan. 2017

FUNARI, C. S.; CARNEIRO, R. L.; ANDRADE, A. M.; CAVALHEIRO, A. J.; HILDER, E. F. *Green chromatographic fingerprinting: An environmentally friendly approach for the development of separation methods for fingerprinting complex matrices*. **Journal of Separation Science**, v. 37, p. 37-44, 2014a.

FUNARI, C. S.; CARNEIRO, R. L.; CAVALHEIRO, A. J.; HILDER, E. F. *A trade off between separation, detection and sustainability in liquid chromatographic fingerprinting*. **Journal of Chromatography A**, v. 1354, p. 34-42, 2014b

GUARDIA, M. *An integrated approach of analytical chemistry*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 10, p. 429-437, 1999.

GUIDONI, C.; FIGUEIREDO, F. T.; SILVA, A. G. Plantas contendo isoflavonas no tratamento da síndrome da menopausa e nos distúrbios do climatério. **Natureza on line**. v. 5, n. 1, p. 25-29, 2007.

HONG, J; QIN, X; SHU, P; WANG, QI; ZHOU, Z; WANG, G; LIN, B; WANG, Q; QIN, M. *Comparative study of isoflavones in wild and cultivated soybeans as well as bean products by high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry and chemometric techniques*. **European Food Research and Technology** November 2011, Volume 233, Fascículo 5, p 869-880, 28 Setembro 2011.

JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. Plantas medicinais: Cura segura? **Química Nova**, [s.i], v. 28, n. 3, p.521-528, 28 fev. 2005.

KAGAWA, A. ed. **Standard table of food composition in Japan**. Tokyo. University of Nutrition for women, 1995. p. 104-105.

METHANOL INSTITUTE. *Health and Safety*. **Methanol Health Effects**. 2011. Disponível em: <<http://www.methanol.org/Health-And-Safety/Safe-Handling/Methanol-Health-Effects.aspx>>. Acessado em: 11 jan. 2017.

MIRA, N, V, M; BARROS, R, M, C; SCHIOCCHET, M, A, NOLDIN, J, A; LANFER-MARQUES, U, M. Extração, análise e distribuição dos ácidos fenólicos em genótipos pigmentados e não pigmentados de arroz (*Oryza sativa* L.) **Ciência Tecnologia e Alimentação** Vol.28 no.4 Campinas. Dez. 2008.

NOLDIN, V, F. Estudo fitoquímico das folhas e rizomas de *Simaba ferruginea* St. Hil. E avaliação da atividade antiúlcera e antinociceptiva dos extratos e compostos isoladas. 2005. 91 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmaceuticas, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2005. Disponível em: <<http://siaibib01.univali.br/pdf/Vania%20Floriani%20Noldin.pdf>>. Acesso em: 11 jan. 2017

LUI, M, C, Y. AGUIAR, C, L. ALENCAR, S, M. SCAMPARINI, A, R, P. PARK, Y, K. Isoflavonas em isolados e concentrados protéicos de soja. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 23, supl. p. 206-212, Dec. 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612003000400038&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 11 Jan 2017.

PAIVA, S, R; FONTOURA, L, A; FIGUEIREDO, M, R; Perfil cromatográfico de duas espécies de plumbaginaceae: *Plumbago scandens* L. E *Plumbago auriculata* LAM. **Química Nova** vol.25 no.5 São Paulo Sept./Oct. 2002

STANLEY E. M. A química e a antroposfera: a química ambiental e a química verde. **Química ambiental**. 9ª Edição. Porto Alegre: Bookman, 2013. xxxii, Capítulo 2, p. 28-54.

SOUZA, O. Determinação de variáveis com efeitos importantes na separação de metabólitos secundários de *Cynara Scolymus* ("Alcachofra") por CLAE-DAD, utilizando conceitos de química verde. In: CBQ – CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 56º., 2016 Belém. Resumos... Associação Brasileira de Química: ABQ, 2016. p 60

SKOOG, D. A. & LEARY, J. J., *High-Performance liquid Chromatography In: Principles of Instrumental Analysis*, 4 ed., **Harcourt Brace College Publishers**, Flórida, 1992, p 628 - 669.

THE ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY. **GSK Solvent Selection Guide**. Disponível em: <<http://www.rsc.org/suppdata/gc/c0/c0gc00918k/c0gc00918k.pdf>> Acesso em: 11 Jan 2017

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **The world medicines situation 2011. Traditional medicines: global situation, issues and challenges**. Geneva: WHO, 2011. 14p.