

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ARIADNE MAGALHÃES CARNEIRO

Estudo da Ocorrência de Isoflavonas em Resíduos da Cultura de Soja

Botucatu

2018

ARIADNE MAGALHÃES CARNEIRO

Estudo da Ocorrência de Isoflavonas em Resíduos da Cultura de Soja

Versão corrigida

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP - Instituto de Biociências de Botucatu como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador:

Prof. Dr. Cristiano Soleo de Funari

Co-orientador:

Prof. Dr. Daniel Rinaldo

Botucatu

2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Carneiro, Ariadne Magalhães.

Estudo da ocorrência de isoflavonas em resíduos da cultura de soja / Ariadne Magalhães Carneiro. - Botucatu, 2018

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Cristiano Soleo de Funari

Coorientador: Daniel Rinaldo

Capes: 90400003

1. Isoflavonas. 2. Soja. 3. Resíduos agrícolas. 4. Química verde. 5. Solventes.

Palavras-chave: Isoflavona; Química Verde; Resíduo agrícola; Soja; Solventes verdes.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE ARIADNE MAGALHÃES CARNEIRO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA, DO INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS.

Aos 19 dias do mês de abril do ano de 2018, às 09:00 horas, no(a) Sala de Pós-Graduação do IBB, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. CRISTIANO SOLEO DE FUNARI - Orientador(a) do(a) Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu - UNESP, Prof. Dr. ANDRÉ GONZAGA DOS SANTOS do(a) Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP, Profa. Dra. CARLA DOS SANTOS RICCARDI do(a) Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu - UNESP, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de ARIADNE MAGALHÃES CARNEIRO, intitulada **Estudos Químicos Sobre Resíduos da Cultura de Soja**. Após a exposição, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: APROVADA. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. CRISTIANO SOLEO DE FUNARI



Prof. Dr. ANDRÉ GONZAGA DOS SANTOS



Profa. Dra. CARLA DOS SANTOS RICCARDI



Agradecimentos

Agradeço aos meus pais e ao meu namorado pelo apoio durante todo este tempo. Agradeço também a todos que me deram suporte para que este trabalho fosse realizado. Ao meu orientador, pela paciência, ao Prof. Dr. Moacir Forim, por ter me recebido na Ufscar, ao Dr. Alan Pilon por ter colaborado com a realização de etapas cruciais deste projeto, ao Prof. Dr. Daniel Rinaldo por também ter me recebido em Bauru, à Maiara Borges e ao João Pelissari por todo o auxílio que me deram.

RESUMO

CARNEIRO, Ariadne Magalhães. **Estudo da Ocorrência de Isoflavonas em Resíduos da Cultura de Soja**. 2018. 61. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, SP, 2018. Versão corrigida.

Aproximadamente $3,7 \times 10^9$ toneladas de resíduos agrícolas são produzidos anualmente no mundo. Por ser uma das grandes potências agrícolas atualmente, grandes quantidades de resíduos agrícolas são geradas constantemente no Brasil. Uma das principais culturas produzidas no país é a soja. Além de seu uso na pecuária, utilizada na alimentação animal, assim como para alimentação humana, a soja desperta grande interesse do ponto de vista farmacológico, por ser uma das principais fontes de isoflavonas, uma forma de fitoestrogênio, sendo umas das espécies listadas na RENISUS. Este trabalho teve como objetivo investigar o perfil químico dos resíduos provenientes da cultura da soja (caules, folhas e vagens) por meio de uma abordagem analítica verde. Os extratos foram obtidos em triplicata por maceração dinâmica a 30 °C, com acetona e etanol, com e sem adição de ácido. O solvente acetonitrila foi utilizado como solvente de referência, pois é comumente empregado tanto para a extração como para a separação de isoflavonas presentes em grãos de soja. Os extratos foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um espectrofotômetro de ultravioleta/visível (HPLC-PAD/UV) e a comparação da eficiência de extração entre os solventes testados foi feita com base em número total de picos, área total sob os picos e rendimento da extração. Os solventes verdes etanol e acetona mostraram-se mais eficientes do que o solvente de referência acetonitrila. Posteriormente, uma estratégia de identificação de compostos em mistura, baseada em dados obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas de alta resolução (HPLC-PDA/UV-ESI/TOF/MS) e em dados quimiométricos foi empregada. Foram identificadas as isoflavonas não glicosiladas daidzeína, genisteína e gliciteína, além da flavona apigenina, em resíduos de cultura de soja. Este trabalho sugere que isoflavonas e outros flavonóides poderiam ser obtidos de resíduos agrícolas da cultura de soja, amplamente disponíveis mundialmente, por meio de tecnologias verdes de extração e de análise.

Palavras-chave: Isoflavona. Soja. Resíduo agrícola. Química Verde. Solventes verdes.

ABSTRACT

CARNEIRO, Ariadne Magalhães. **Study of the Occurrence of Isoflavones in Soybean Crop Residues**. 2018. 60. Dissertation (Master in Biotechnology) – Bioscience Institute of Botucatu, São Paulo State University, Botucatu, SP, 2018. Original version.

Approximately 3.7×10^9 tonnes of agricultural waste is produced annually in the world. Because it is one of the great agricultural powers today, large amounts of agricultural residues are constantly generated in Brazil. One of the main crops produced in the country is soy. In addition to its use in livestock and human nutrition, the soybean awakes great interest from the pharmacological point of view, being one of the main sources of isoflavones, a form of phytoestrogen, being one of the species listed in RENISUS. The objective of this work was to investigate the chemical profile of residues from soybean (shoots, leaves and pods) using a green analytical approach. The extracts were obtained in triplicate by dynamic maceration at 30°C , with acetone and ethanol, with and without acid addition. The solvent acetonitrile was used as reference solvent, since it is commonly used both for the extraction and the separation of isoflavones present in soybean grains. The extracts were analyzed by high performance liquid chromatography coupled to an ultraviolet/visible spectrophotometer (HPLC-PAD/UV) and the comparison of the extraction efficiency among the solvents tested was done based on total number of peaks, total area under peaks and extraction yield. The green solvents ethanol and acetone were more efficient than the reference solvent acetonitrile. Subsequently, a strategy for the identification of compounds in mixture, based on data obtained by high performance liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry (HPLC-PDA/UV-ESI/TOF/MS) and chemotaxonomic data was used. The non-glycosylated isoflavones daidzein, genistein and glycitein, as well as flavone apigenin, were identified in soybean residue. This work suggests that isoflavones and other flavonoids could be obtained from soybean crop residues widely available worldwide through green extraction and analysis technologies.

Key-words: Isoflavone. Soy. Agricultural waste. Green Chemistry. Green Solvents.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura das principais isoflavonas da soja	18
Figura 2: Ilustração dos seis tipos de extratos realizados para cada parte do vegetal (caules, folhas e vagens)	22
Figura 3: Perfis HPLC-UV dos extratos de folhas de soja	25
Figura 4: Perfis HPLC-UV dos extratos de vagens de soja	26
Figura 5: Perfis HPLC-UV dos extratos de caules de soja	27
Figura 6: Perfis HPLC-UV dos extratos EtOH e EtOH:0,1N HCl em água 8:2 (v/v)	32
Figura 7: Fórmulas estruturais das isoflavonas	36
Figura 8: Cromatogramas HPLC-ESI(+)-MS, sobrepostos, dos padrões injetados	36
Figura 9: Cromatogramas HPLC-ESI(+)-MS (<i>Base Peak Chromatogram</i>) representativos de extratos EtOH e EtOH:0,1N HCl em água 8:2 (v/v) para grãos, vagens, folhas e caules	38
Figura 10: Cromatogramas com íons extraídos de extratos EtOH (A) e EtOH:0,1N HCl em água 8:2 (v/v) (B) de grãos de soja	39
Figura 11: Espectros de massas e de UV da daidzina (A e B, respectivamente) e do candidato com m/z 417,1221 (C e D, respectivamente) presente no extrato EtOH: 0,1N HCl em água 8:2 (v/v) de grãos de soja	40
Figura 12: Esquema da clivagem da porção açúcar da isoflavona daidzina	41
Figura 13: Espectros de massas e de UV da genistina (A e B, respectivamente) e do candidato m/z 433,1674 (C e D, respectivamente) presente no extrato EtOH:0,1N HCl em água 8:2 (v/v) de grãos de soja	42
Figura 14: Esquema da fragmentação da molécula da genistina	42
Figura 15: Espectros de massas e de UV da daidzeína (A e B, respectivamente) e do candidato com m/z 255,0658 (C e D, respectivamente) presente no extrato EtOH:0,1N HCl em água 8:2 (v/v) de grãos de soja	44
Figura 16: Perfil de fragmentação da isoflavona daidzeína	44
Figura 17: Espectros de massas e de UV da genisteína (A e B, respectivamente) e do candidato com m/z 271,0578 e tempo de retenção (C e D, respectivamente) presente no extrato EtOH:0,1N HCl em água 8:2 (v/v) de grãos de soja	45
Figura 18: Esquema da fragmentação da molécula da genisteína	46

Figura 19: Cromatogramas com íons extraídos dos extratos EtOH (coluna da esquerda) e EtOH:0,1N HCl em água 8:2 (v/v) (coluna direita) de vagens (A e B), folhas (C e D) e caules (E e F)	47
Figura 20: Espectros de massas e de UV da gliciteína (A e B, respectivamente) e do candidato com mesma m/z e tempo de retenção (C e D, respectivamente) presente no extrato EtOH:0,1N HCl em água 8:2 (v/v) de folhas de soja	49
Figura 21: Espectros de massas ESI/MS para genisteína, apigenina e pelargonidina	52
Figura 22: Espectros de massas e de UV da genisteína (A e B, respectivamente) e do isômero com m/z 271,0604 e t_R 39 minutos (C e D, respectivamente) presente no extrato EtOH:0,1N HCl em água 8:2 (v/v) de folhas de soja	53
Figura 23: Espectros de massas e de UV da daidzeína (A e B, respectivamente) e do isômero com m/z 255,0662 (C e D, respectivamente) presente no extrato EtOH: 0,1N HCl em água 8:2 (v/v) de folhas de soja	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Teor de isoflavonas do okara.....	20
Tabela 2: Número de picos, área total dos cromatogramas e rendimento dos extratos.....	28
Tabela 3: Dados das seis isoflavonas pesquisadas e as respectivas ocorrências nas amostras.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOH – *Ácido acético*

EtOH – *Etanol*

HCl – *Ácido clorídrico*

HPLC - *High performance liquid chromatography*

HPLC-PDA/UV - *High performance liquid chromatography coupled to a photodiode array/UV detector*

HPLC-PDA/UV-ESI/TOF/MS - *High performance liquid chromatography coupled to a photodiode array/UV detector and to mass spectrometer with electrospray ionization interface (ESI) and time-of-flight analyser (TOF/MS)*
electrospray ionization time of flight mass spectrometer

MeCN - *Acetonitrila*

MeOH - *Metanol*

UV - *Ultravioleta*

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	13
2 – REVISÃO	14
2.1 Química Verde	14
2.2 <i>Glycine max</i> (L.) Merr. (Fabaceae)	17
2.2.1 Flavonoides	17
2.3 Subprodutos da produção de soja e seus derivados	18
3 - OBJETIVOS	20
3.1 Objetivos específicos	20
4 – MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1 Solventes e Reagentes	21
4.2 Amostras de resíduos e padrões	21
4.3 Preparação de extratos	21
4.4 Análises por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrofotômetro de ultravioleta. (HPLC-PDA/UV)	22
4.5 Análises por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a Espectrometria de massas de alta resolução com interface de ionização por electrospray e analisador por tempo de voo	22
5 – RESULTADOS E DISCUSSÕES	23
5.1 Extração de resíduos com distintos solventes	23
5.2 Comparação dos perfis metabólicos de diferentes resíduos agrícolas	31
5.3 Identificação de isoflavonas diretamente nos extratos	33
5.3.1 Ajuste das condições cromatográficas com o intuito de reduzir o impacto ambiental do método	33
5.3.2 Estratégia de identificação de compostos em mistura	34
5.3.2.1 Estudos de ocorrência de isoflavonas nos extratos com o auxílio de padrões	35
5.3.2.2 Expandindo a identificação putativa de isômeros nos extratos	49

6 – CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS	57

1. INTRODUÇÃO

Estima-se que $3,7 \times 10^9$ toneladas de resíduos agrícolas sejam produzidos anualmente, no mundo (BENTSEN et al., 2014). O Brasil, por ser um dos maiores produtores agrícolas da atualidade, acaba por produzir uma considerável quantidade de resíduos. Segundo o diagnóstico dos resíduos orgânicos do setor Agrossilvopastoril e Agroindústrias Associada, de 57 milhões de toneladas de produção, aproximadamente 41 milhões de toneladas foram classificadas como resíduos. Diante disto, preocupa o fato de que os agricultores e a agroindústria associada não estejam atentos em relação à geração de resíduos e/ou os seus posteriores destinos/ tratamentos, pois se uma porcentagem destes resíduos é útil para a proteção do solo contra erosão e para restaurar os nutrientes que foram extraídos pelo vegetal, o acúmulo destes resíduos pode impactar negativamente no meio ambiente devido à geração de subprodutos que podem ser tóxicos, cumulativos ou de difícil degradação (IPEA, 2012).

Esforços pela valorização de resíduos ainda são considerados incipientes no Brasil em comparação aos países centrais, pois só mais recentemente instituições públicas brasileiras têm mostrado interesse no assunto (PERLATTI; FORIM; ZUIN, 2014). A própria Organização das Nações Unidas (ONU) reconhece a necessidade de se intensificar e aprofundar pesquisas de tecnologias para conversão de resíduos agrícolas em recursos úteis à sociedade (UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAM - DIVISION OF TECHNOLOGY, 2009). A busca por compostos de interesse em resíduos agrícolas, ou de bioprocessos onde estes resíduos possam ser matérias-primas para a fabricação de novos produtos, por meio de estratégias de agregação de valor avançadas, baseadas em tecnologias verdes, vem sendo entendida como uma forma de preservar recursos ambientais, bem como uma estratégia para diversificar a geração de produtos a partir de uma dada matéria-prima. Segundo Pleissner et al. (2015), os processos de valorização de resíduos provenientes de frutas, vegetais, carnes e derivados, e óleos, abrangem a produção de antioxidantes, extração de flavonoides, proteínas, incluindo enzimas, glicerol e ácidos graxos.

A cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merr., *Fabaceae*), um dos mais importantes grãos para o consumo humano e animal, tanto na forma natural como a de produtos derivados, bem como matéria-prima para a produção de biodiesel (KARKI et al., (2011), é responsável por 56,8% dos 58,5 milhões de hectares de área cultivada no Brasil. Esta cultura apresenta o maior crescimento absoluto de área cultivada em relação a outras culturas, com estimativa de aumento de 4,9 milhões de toneladas na produção. De acordo com Matos (2005), 2,7

toneladas de resíduos são geradas durante o processamento de uma tonelada de grãos, portanto, estima-se que, aproximadamente, 13 milhões de toneladas de resíduos serão geradas com o aumento da produção de soja. Conseqüentemente, a cultura de soja é potencialmente a cultura que mais gera resíduos agrícolas no Brasil, como palhas, folhas, bagaço de colmo, vagem. Par[agrafo para justificar os objetivos

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Química Verde

Química Verde é definida como o planejamento, o desenvolvimento e a implementação de produtos químicos e processos para reduzir ou eliminar o uso ou geração de substâncias nocivas à saúde humana e ao ambiente (ANASTAS; EGHBALI, 2010; LENARDÃO *et al.*, 2003). Os produtos ou processos da Química Verde podem ser divididos em três grandes categorias: (i) uso de fontes renováveis ou recicladas de matéria-prima; (ii) aumento da eficiência de energia, ou a utilização de menos energia para produzir a mesma ou maior quantidade de produto e (iii) evitar o uso de substâncias persistentes, bioacumulativas e tóxicas (ANASTAS; EGHBALI, 2010; ANASTAS; KIRCHHOFF, 2002).

Os doze princípios da Química Verde foram introduzidos em 1998 por Paul Anastas e John Warner (ANASTAS; EGHBALI, 2010; LENARDÃO *et al.*, 2003) e são os seguintes:

1. Prevenção. Evitar a produção de resíduos é melhor do que tratá- los ou “limpá-los” após sua geração.

2. Economia de Átomos. Deve-se procurar desenhar metodologias sintéticas que possam maximizar a incorporação de todos os materiais de partida no produto final.

3. Síntese de Produtos Menos Perigosos. Sempre que praticável, a síntese de um produto químico deve utilizar e gerar substâncias que possuam pouca ou nenhuma toxicidade à saúde humana e ao ambiente.

4. Planejamento de Produtos Seguros. Os produtos químicos devem ser desenhados de tal maneira que realizem a função desejada e que, ao mesmo tempo, não sejam tóxicos.

5. Solventes e Auxiliares mais Seguros. O uso de substâncias auxiliares (solventes, agentes de separação, secantes, etc.) precisa, sempre que possível, tornar-se desnecessário e, quando utilizadas, estas substâncias devem ser inócuas.

6. Busca pela Eficiência de Energia. A utilização de energia pelos processos químicos precisa ser reconhecida pelos seus impactos ambientais e econômicos e deve ser minimizada. Sempre que possível, os processos químicos devem ser conduzidos à temperatura e pressão ambientes.

7. Uso de Fontes Renováveis de Matéria-Prima. Sempre que técnica e economicamente viável, a utilização de matérias-primas renováveis deve ser escolhida em detrimento de fontes não-renováveis.

8. Evitar a Formação de Derivados. A derivatização desnecessária (uso de grupos bloqueadores, proteção/desproteção, modificação temporária por processos físicos e químicos) deve ser minimizada ou, se possível, evitada, porque estas etapas requerem reagentes adicionais e podem gerar resíduos.

9. Catálise. Reagentes catalíticos (tão seletivos quanto possível) são melhores que reagentes estequiométricos

10. Planejamento para a Degradação. Os produtos químicos precisam ser desenhados de tal modo que, ao final de sua função, se fragmentem em produtos de degradação inócuos e não persistam no ambiente.

11. Análise em Tempo Real para a Prevenção da Poluição. Será necessário o desenvolvimento futuro de metodologias analíticas que viabilizem um monitoramento e controle dentro do processo, em tempo real, antes da formação de substâncias nocivas.

12. Química Intrinsecamente Segura para a Prevenção de Acidentes. As substâncias, bem como a maneira pela qual uma substância é utilizada em um processo químico, devem ser escolhidas a fim de minimizar o potencial para acidentes químicos, incluindo vazamentos, explosões e incêndios

Estes 12 princípios são um guia para a construção e planejamento de novos processos e produtos químicos, que percorrem todos os aspectos do ciclo de vida dos processos, desde ao

uso de matérias-primas, até a eficiência e segurança da transformação, a toxicidade e a biodegradabilidade dos produtos e reagentes usados (ANASTAS; EGHBALI, 2010).

Esta abordagem vem ganhando importância notadamente a partir da década de 1990, quando foram criados programas e premiações voltadas à Química Verde. Desde então, acentuaram-se a promoção e o estabelecimento de conferências, de comissões científicas e de institutos de pesquisas e as publicações sobre o tema e as suas aplicações, incluindo a criação de um periódico intitulado “Green Chemistry”, pela Sociedade Real de Química Britânica (ANASTAS; EGHBALI, 2010; ANASTAS; KIRCHHOFF, 2002; LENARDÃO et al., 2003).

Assim, esforços vêm sendo aplicados no sentido do desenvolvimento de processos de extração e de separação sustentáveis do ponto de vista ambiental e de saúde. Estes, de forma geral, seguem as premissas da Química Verde, especialmente aquelas detalhadas em quatro dos doze princípios da Química verde, definidos por Anastas e Warner (1998): (a) “prevenção - evitar a produção do resíduo é melhor do que tratá-lo ou limpá-lo”; (b) “planejamento de produtos seguros - os produtos químicos devem ser desenhados de tal modo que realizem a função desejada e ao mesmo tempo não sejam tóxicos”, (c) “solventes e auxiliares mais seguros - o uso de substâncias auxiliares (solventes, agentes de separação, secantes, etc.) precisa, sempre que possível, tornar-se desnecessário e, quando utilizadas, estas substâncias devem ser inócuas”; e (d) “química intrinsecamente segura para a prevenção de acidentes - as substâncias, bem como a maneira pela qual uma substância é utilizada em um processo químico, devem ser escolhidas a fim de minimizar o potencial para acidentes químicos, incluindo vazamentos, explosões e incêndios” (ANASTAS; EGHBALI, 2010; ANASTAS; KIRCHHOFF, 2002).

Os solventes representam um desafio na área da Química Verde, sendo, talvez, a parte mais ativa neste campo (ANASTAS; EGHBALI, 2010). Isto se deve ao fato de que os solventes estão diretamente relacionados ao desperdício de massa em processos e sínteses, à poluição ambiental e na segurança de trabalhadores (ANASTAS; EGHBALI, 2010). Portanto, foram criados guias de seleção de solventes verdes, de modo que pudessem orientar o desenvolvimento de novos produtos e processos utilizando solventes menos danosos (PRAT; HAYLER; WELLS, 2014; TOBISZEWSKI; NAMIEŚNIKA; PENA-PEREIRA, 2017).

Horvath e Anastas (2007) destacam que a busca por matérias-primas diversas também é uma área bastante importante para a Química Verde. Desta forma, resíduos agrícolas

tornam-se uma opção viável do ponto de vista econômico e sustentável, já que não competem com os recursos agrícolas para a produção de alimentos e de ração animal. São necessárias pesquisas de base para o desenvolvimento de métodos e processos sustentáveis, eficientes e econômicos em larga escala para conversão de biomassa (carboidratos, proteínas, lipídeos e metabólitos secundários) em produtos industrialmente viáveis, como compostos químicos intermediários, farmacêuticos e materiais orgânicos poliméricos.

2.2 *Glycine max* (L.) Merr. (Fabaceae) descri;’ao botanica

Os lipídeos constituem 20% do peso seco da soja e são encontrados principalmente no cotilédone do grão de soja, e os ácidos graxos predominantes são o ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoleico e ácido linolênico (GERDE; WHITE, 2008). A soja ainda possui altos níveis de proteína, de aproximadamente 40% (MALENCIC et al., 2007), e apresenta 35% de carboidratos, ou seja, o segundo maior componente. Além de proteínas, lipídeos e carboidratos, a soja também contém outros componentes, tais como minerais e diversos metabólitos ditos especiais ou secundários, que são moléculas adaptativas, produzidas para razões fisiológicas, sociais ou predatórias (O’BRIEN; WRIGHT, 2011). Estes metabólitos podem ser isoflavonas, ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido ferrúlico, ácido *p*-cumarínico, tocoferóis, saponinas e ácidos fítricos (MESSINA; MESSINA, 2010; KIM et al., 2012; LIU, 2012).

2.2.1 Flavonoides

Flavonoides são compostos polifenólicos amplamente distribuídos pelo reino vegetal. Estes compostos são importantes para a proteção das folhas vegetais de raios UV durante seu crescimento. De acordo com Ho et al. (2002), o conteúdo de flavonoides das folhas de soja difere do conteúdo de flavonoides presentes nos grãos. Os flavonoides mais abundantes nos grãos de soja são: *malonil-genisteína*, *malonil-daidzeína*, *genisteína* e *daidzeína* (isoflavonas). Já as folhas apresentaram seis compostos da classe dos flavonoides que, após análises foram identificados como glicosídeos de kaempferol.

As isoflavonas são a forma mais comum encontrada de fitoestrogênios, devido à semelhança estrutural que possui com estrógenos humanos, como o 17 β -estradiol, e podem ser encontradas em diversas espécies, sendo que a soja constitui uma das fontes mais abundantes destes compostos. As principais isoflavonas encontradas na soja são a *genisteína*,

a daidzeína e a gliciteína (Figura 1) (QUEIROZ et al., 2006). Também são encontrados glucosídeos, malonilglucosídeos e acetilglucosídeos destes três compostos (KIM et al., 2012; KIM et al., 2005; WANG; MURPHY, 1994).

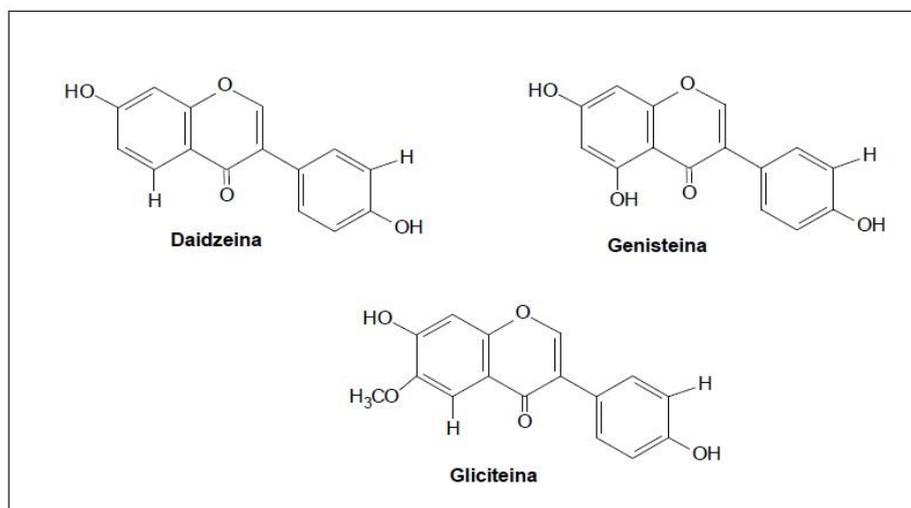


Figura 1. Estrutura das principais isoflavonas da soja. Fonte: Queiroz et al., 2006.

As isoflavonas apresentam diversos benefícios a saúde humana, além de sua conhecida atuação como fitoestrogênios. Estes compostos podem apresentar atividades antioxidantes (JENG et al., 2010; TYUG et al., 2010; MALENCIC et al., 2007), anticarcinogênicas (SING et al., 2006; LI et al., 2011) e diminuem os riscos de doenças cardiovasculares (MORTON et al., 2000).

Além de ser uma das espécies listadas na RENISUS, a soja já é uma das espécies presentes na lista de fitoterápicos que possuem registros simplificados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (CARVALHO et al., 2008), estas isoflavonas já são comercializadas, na forma de extrato seco dos grãos de soja. No Brasil é possível citar as marcas Buona e Soyfemme, das empresas Eurofarma e Aché, respectivamente.

2.3 Subprodutos da produção de soja e seus derivados

Os subprodutos obtidos do campo e das indústrias de extração de óleo de soja são amplamente utilizados na alimentação de ruminantes, pois, além de reduzir os custos e reduzir o impacto ambiental, através da diminuição de resíduos, os grãos, que são alimentos mais nobres, são destinados, principalmente, à alimentação humana. Segundo estudo realizado pelo

órgão EMBRAPA, os subprodutos coletados nos campos agrícolas, chamados de restos de cultura, apresentaram conteúdo médio de proteína bruta de 21,69% e nível de óleo de 8,03%.

Nas culturas de soja, a produção de biomassa, que é resultante das partes de grãos não aproveitadas, como a palha e as cascas, é de 3 a 4 toneladas por hectare, com umidade de 11,5% (NOGUEIRA; LORA, 2002). Segundo o Inventário Energético de Resíduos Rurais (2014), convertendo-se estes números de produção à base seca e utilizando-se como referência a produtividade média nacional de 2,93 tSoja/hectare, calculou-se uma produção de 1,21 tBs/tSoja. Porém, nas culturas de soja, recomenda-se que cerca de 70% da palha permaneça no campo para repor os nutrientes retirados do solo. Com isto, infere-se que 30% dos resíduos poderiam ser destinados para a extração de compostos de interesse industrial (esta espécie foi incluída na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS, que conta com 71 espécies de potencial terapêutico), ou como matéria-prima para a produção de acetona, butanol ou etanol através de processos fermentativos (XU et al., 2007).

A produção de biodiesel também apresenta a etapa de extração do óleo vegetal, que é realizada em larga escala com solventes orgânicos, em especial o n-hexano, que é tóxico e inflamável e contém 45 a 90% de hexano e outras frações importantes são: 2- e 3-etil pentano, o metil ciclopentano e o ciclohexano. Deste processo, é possível obter uma farinha desengordurada e cascas, cuja origem se dá através da limpeza, preparo e moagem de grãos, bagas e amêndoas. Para cada tonelada de soja obtém-se, aproximadamente, 600 kg de farinha desengordurada e cerca de 50 kg de cascas, que constituem o farelo de soja. Destes resíduos se extraem a proteína e fibras, compostos pelas mesmas e por celulose, apresentando um teor de umidade de 40 a 60%, e desta forma, estes resíduos são utilizados na produção de ração animal.

A casca do grão de soja (CGS), que também é utilizada para alimentação animal, é obtida no processamento da extração de óleo. O resíduo “casca de soja” constitui cerca de 2% de cada tonelada de soja que é processada, com variação de 0 a 3%, de acordo com a proteína de soja que foi processada. Porém, quando o teor de proteína da soja é elevado, não há a necessidade de retirar a casca de soja do farelo. (ZAMBOM et al., 2001)

Outro resíduo que pode ser obtido a partir do extrato aquoso da produção de leite de soja é conhecido como “okara”. Os grãos de soja lavados e secos, serão moídos e aquecidos e

posteriormente passarão pelo processo de filtração, que separa o extrato aquoso do subproduto “okara”.

De acordo com Khare Jha e Gandhi (1995), para cada 1 kg de grãos de soja utilizados na produção de leite de soja/tofu, aproximadamente 1,1 kg de okara será obtido. Este subproduto contém, principalmente, fibras, compostas por celulose, hemicelulose e lignina, cerca de 25% de proteína, de 10 a 15% de óleo e pouco conteúdo de carboidratos.

Além disso, a fração proteica de alta qualidade possui boas características de umidade e qualidades emulsificantes, e ainda contém um peptídeo com efeito anti-hipertensão (O'TOOLE, 1999). Além do seu teor proteico, a “okara” também apresenta teores de isoflavonas. O estudo feito por Bowles e Demiate (2006) encontrou uma concentração de 35,73 mg% de isoflavonas totais no subproduto *okara* analisado (Tabela 3). Segundo Jackson et al. (2002), a bebida derivada de soja apresenta dois terços do teor total de isoflavonas encontrado na matéria-prima (grão), enquanto o subproduto okara apresenta apenas um terço.

Tabela 1. Teor de isoflavonas do okara. Fonte: Bowles e Demiate, 2006.

Isoflavona	Média mg%
Daidzina	5,40
Glicitina	1,02
Genistina	9,30
6''-O-malonil-daidzina	7,23
6''-O-malonil-glicitina	0,65
6''-O-malonil-genistina	0,26
6''-O-acetil-daidzina	0,34
6''-O-acetil-glicitina	0,31
6''-O-acetil-genistina	8,19
Daidzeína	1,61
Gliciteína	0,13
Genisteína	1,46
Total	35,73

3. OBJETIVOS

Este projeto tem como objetivo contribuir para o conhecimento químico de resíduos da cultura de soja, tais como folhas, caules e cascas da vagem, a partir de uma abordagem experimental que siga os princípios de química verde.

3.1 Objetivos específicos

- Conhecer se isoflavonas estão presentes em tais resíduos e identificá-las.
- Comparar o desempenho de solventes tradicionais e de solventes alternativos, melhor classificados em guias de seleção de solventes verdes, em etapas de extração dos resíduos e de separação dos componentes dos extratos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Solventes e Reagentes

Os solventes utilizados foram etanol (grau HPLC, Vetec™), acetona (P.A. ACS, Vetec™), acetonitrila (grau HPLC, J.T. Baker®), ácido clorídrico 37% (P.A. ACS, Synth®), ácido acético glacial (P.A. ACS, Vetec™) e água ultrapurificada (Millipore®, USA).

4.2 Amostras de resíduos e padrões

As amostras utilizadas foram os caules, as folhas e as vagens de soja, sem os grãos. Estes materiais vegetais foram retirados da Fazenda da Faculdade de Ciências Agronômicas de Botucatu – SP, no início de março de 2017.

Os padrões das isoflavonas agliconas daidzeína, gliciteína e genisteína, assim como suas correspondentes glicosiladas dadizina, glicitina e genistia (Sigma-Aldrich, 2017) foram utilizados para a identificação dos mesmos em resíduos agrícolas e em extrato de grãos de soja (extrato de referência)

4.3 Preparação dos extratos

Todas os resíduos coletados foram moídos em liquidificador industrial de 1200W, com o objetivo de aumentar a superfície de contato. Em seguida, utilizou-se método de extração adaptado de Kim et al. (2012), no qual 1,0 g de amostra foi extraído com 10,0 mL de solvente orgânico (acetonitrila, acetona e etanol) ou com solução composta por 8,0 mL do solvente orgânico e 2,0 mL de solução aquosa 0,1 N de HCl (Figura 2). A extração foi realizada por maceração dinâmica a quente (120 rpm, 30°C e 2 h). Após o período da extração, os extratos permaneceram em repouso por 30 minutos, para que os resíduos decantassem, e uma alíquota de 1,5 mL de extrato foi retirada e filtrada em filtro de nylon de 0,45µm e injetada no sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

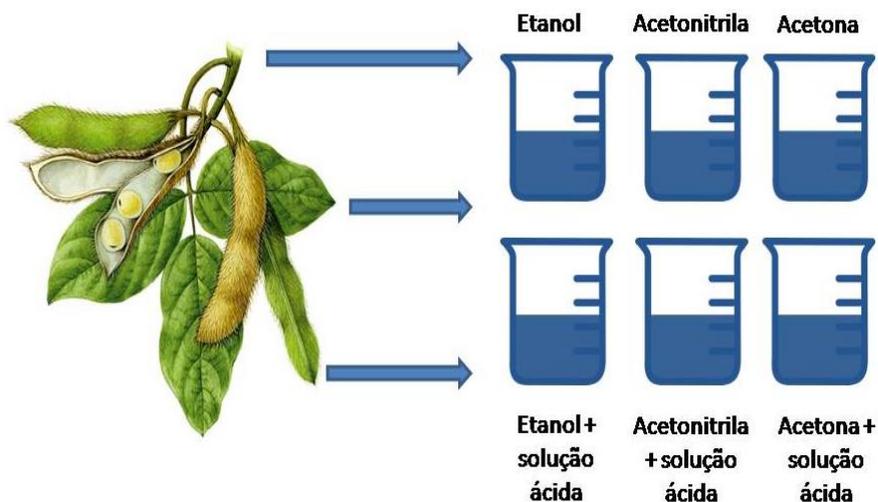


Figura 2. Ilustração dos seis tipos de extratos realizados para cada parte do vegetal (caules, folhas e vagens).
Fonte: a autora.

4.4 Análises por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrofotômetro de ultravioleta. (HPLC-PDA/UV)

As análises em HPLC foram feitas em aparelho HPLC-PAD (Jasco®, Japão), equipado com bomba quaternária (modelo PU – 2089 plus), com detector de arranjo de fotodiodos (modelo MD – 2010 plus), injetor automático (modelo AS – 2055 plus) e forno para a coluna (modelo CO-2060 plus). As separações foram atingidas em coluna Luna® C18, de 5µm, de marca Phenomenex, com dimensões de 250 x 4,6 mm. Como fase móvel utilizou-se 0,1% ácido acético glacial em água ultrapurificada (A) e 0,1% ácido acético glacial em acetonitrila (B) no seguinte gradiente: 15-35% B (0-50 min); 35% B (50-60 min). Equilibrou-se a coluna com a fase móvel inicial por 25 min. Vazão foi de 1mL/min e 20µL de cada extrato foram injetados (KIM et al.,2012).

4.5 Análises por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a Espectrometria de massas de alta resolução com interface de ionização por electrospray e analisador por tempo de vôo.

Para auxiliar na elucidação de compostos presentes nas amostras, realizou-se análise em um HPLC (Shimadzu, Japão) acoplado à espectrometria de massas de alta resolução com interface de ionização por electrospray (ESI) e analisador por tempo de vôo (TOF/MS).

A separação foi obtida em coluna XBridge™ C18, de 3,5µm (Waters, EUA) e de diâmetro 4.6x150mm. O gradiente utilizado consistia em 0,1% ácido acético glacial em água ultrapurificada (A) 0,1% ácido acético glacial em metanol (B) no seguinte gradiente: 21-45% B (0-30 min); 45% B (30-36 min). Equilibrou-se a coluna com a fase móvel inicial por 25 min. A vazão foi de 1ml/min e o volume injetado foi de 12 µL. O metanol, que além de ser um solvente considerado menos nocivo, também possui as características de pureza necessárias para o uso em espectrometria de massas.

Os dados foram processados utilizando software Compass™ (Bruker Daltonics), versão 4.3. Os dados foram analisados em modo positivo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Extração de resíduos com distintos solventes

Trabalhos de bioprospecção, cujo objetivo é investigar quimicamente organismos vivos e que vêm recebendo grande destaque atualmente, geralmente envolvem etapas de extrações, fracionamentos e sucessivas análises. Todos estes processos implicam em quantidades expressivas de solventes tóxicos, como metanol e acetonitrila, que contradizem o apelo segundo o qual um produto derivado da biodiversidade, como um fitoterápico, é mais benigno do ponto de vista da saúde e ambiental, em relação a um produto obtido exclusivamente por vias sintéticas (FUNARI et al., 2014a, 2014b).

O etanol é um solvente apresentado como recomendável de acordo com guias de seleção de solventes. A acetona, apesar de ser considerada problemática por alguns guias, também é mostrada como recomendável. Já a acetonitrila foi considerada perigosa por um dos guias e é apresentada como um solvente problemático. Portanto, na primeira etapa deste trabalho foi realizada a comparação da eficiência de extração de solventes verdes (etanol e acetona) como potenciais alternativas ao solvente de referência acetonitrila, bastante indesejável do ponto de vista da Química Verde (PRAT et al., 2016). A necessidade ou não de um ácido no meio extrator também foi averiguada para cada resíduo investigado (vagens, folhas e caules). Os parâmetros escolhidos para monitorar o desempenho dos solventes foram os números de picos observados nos cromatogramas obtidos por HPLC-PDA/UV, a somatória

da área de todos os picos do cromatograma (área total) e, por fim, o rendimento dos extratos, que foi calculado de acordo com fórmula a seguir:

$$Re = \text{massa extrato seco} / \text{massa da amostra vegetal} \times 100\%$$

A Tabela 2 traz os resultados obtidos para os seis meios extratores testados (3 solventes orgânicos e 3 soluções solvente orgânico:0,1N HCl em água 8:2 (v/v)), enquanto que cromatogramas representativos dos perfis metabólicos obtidos com estes meios extratores, para cada tipo de resíduo, são apresentados nas figuras 3-5.

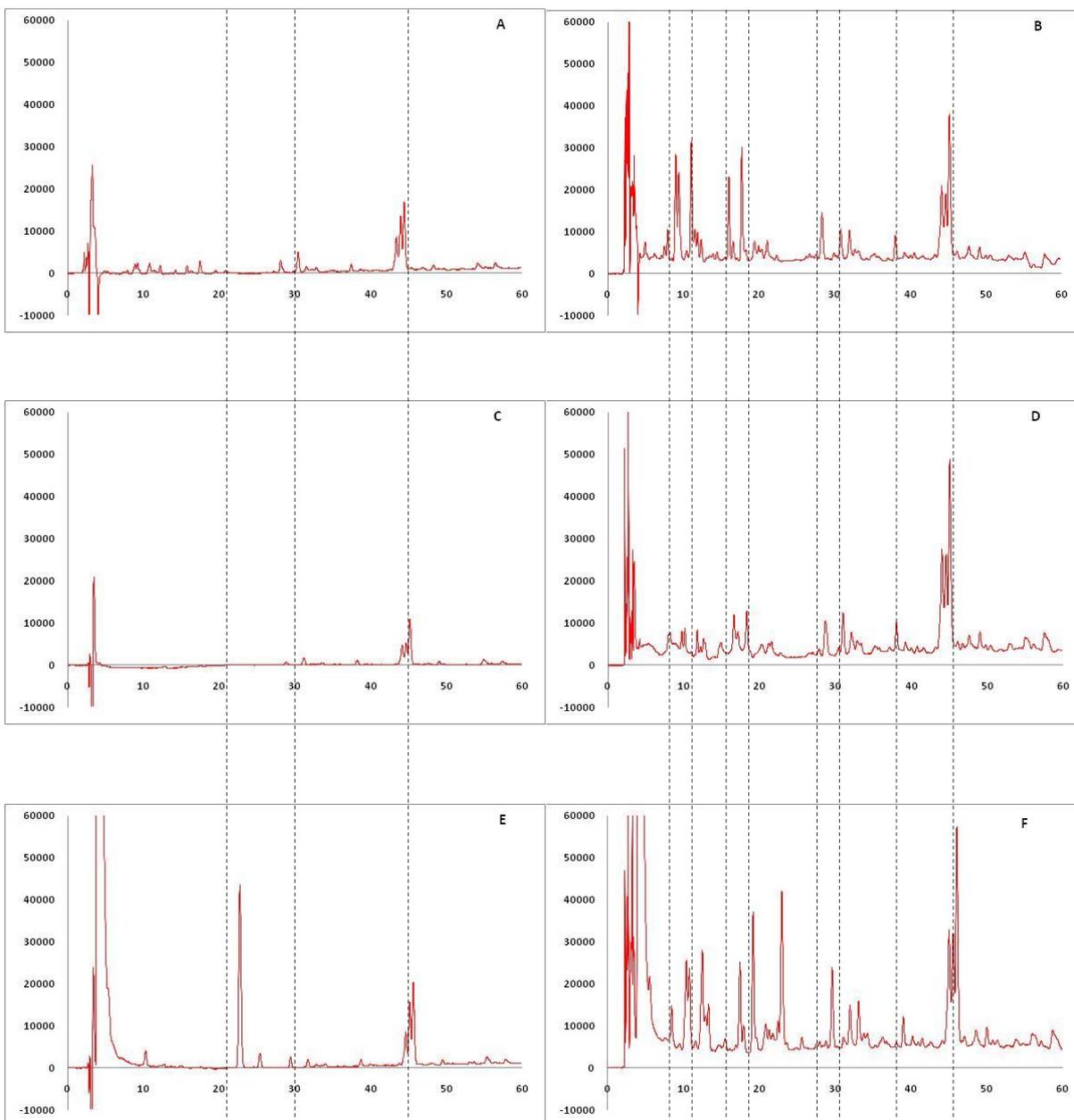


Figura 3. Perfis HPLC-UV dos extratos de folhas de soja a 254nm, extraídos com Etanol (A); Etanol:0,1N HCl em água 8:2 (v/v) (B); Acetonitrila (C); Acetonitrila:0,1N HCl em água 8:2 (v/v) (D); Acetona (E); Acetona:0,1N HCl em água 8:2 (v/v) (F).. Coluna: Luna® C18, 250 x 4.6 mm; 5 μ m. Fase móvel: 0,1% AcOH em água (A) e 0,1% AcOH em MeCN (B) no seguinte gradiente: 15-35% B (0-50 min); 35% B (50-60 min). Vazão: 1 mL/min. Volume de injeção: 20 μ L.

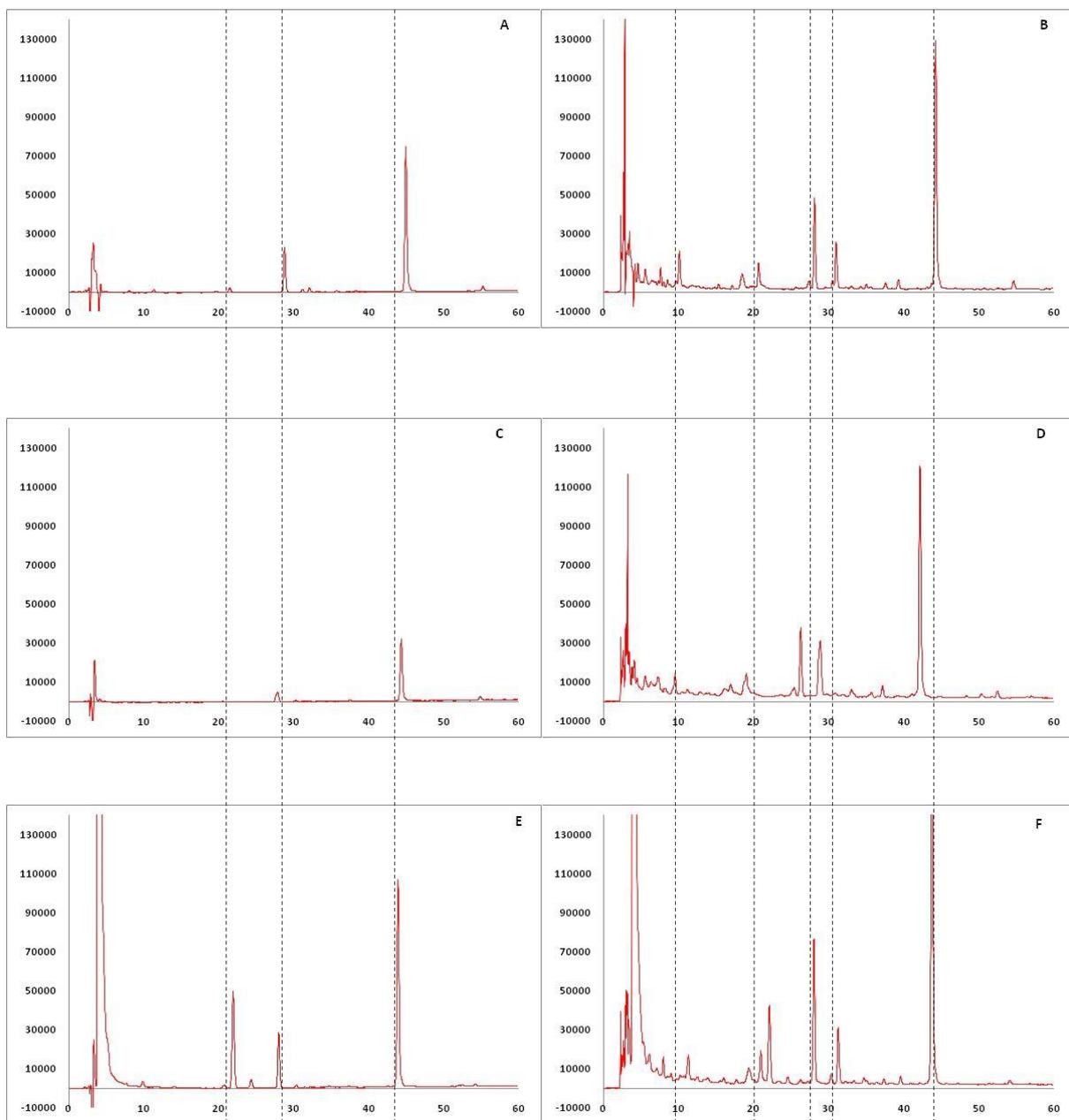


Figura 4. Perfis HPLC-UV dos extratos de vagens de soja a 254nm extraídos com Etanol (A); Etanol:0,1N HCl em água 8:2 (v/v) (B); Acetonitrila (C); Acetonitrila:0,1N HCl em água 8:2 (v/v) (D); Acetona (E); Acetona:0,1N HCl em água 8:2 (v/v) (F).. Coluna: Luna® C18, 250 x 4.6 mm; 5 μ m. Fase móvel: 0,1% AcOH em água (A) e 0,1% AcOH em MeCN (B) no seguinte gradiente: 15-35% B (0-50 min); 35% B (50-60 min). Vazão: 1 mL/min. Volume de injeção: 20 μ L.

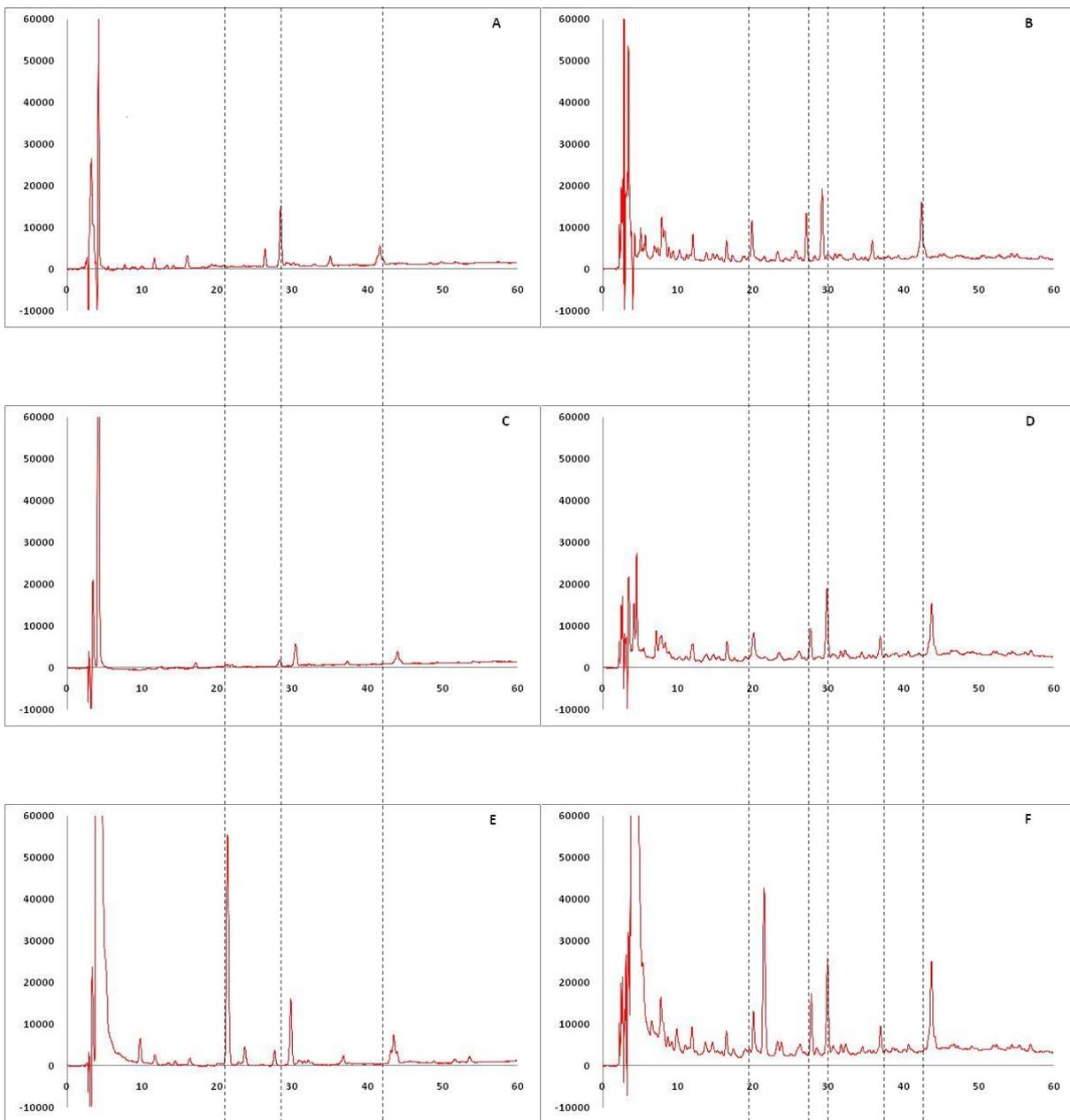


Figura 5. Perfis HPLC-UV dos extratos de caules de soja a 254nm extraídos com Etanol (A); Etanol:0,1N HCl em água 8:2 (v/v) (B); Acetonitrila (C); Acetonitrila:0,1N HCl em água 8:2 (v/v) (D); Acetona (E); Acetona:0,1N HCl em água 8:2 (v/v) (F).. Coluna: Luna® C18, 250 x 4.6 mm; 5 μ m. Fase móvel: 0,1% AcOH em água (A) e 0,1% AcOH em MeCN (B) no seguinte gradiente: 15-35% B (0-50 min); 35% B (50-60 min). Vazão: 1 mL/min. Volume de injeção: 20 μ L.

Tabela 2. Número de picos, área total sob os picos dos cromatogramas e rendimento dos extratos.

	EXTRATOS	Nº DE PICOS	ÁREA TOTAL (AUxs)	RENDIMENTO (mg/mg x 100%)
FOLHAS	Etanol	17,0 ± 1,0	1,7 ± 0,2	4,5 ± 0,7
	Etanol:0,1N HCl em água	40,6 ± 4,2	5,7 ± 0,5	3,9 ± 0,1
	Acetonitrila	5,3 ± 0,6	0,4 ± 0,1	0,8 ± 0,1
	Acetonitrila:0,1N HCl em água	35,3 ± 3,2	4,2 ± 0,5	1,9 ± 0,4
	Acetona	11,3 ± 1,5	2,1 ± 0,2	0,9 ± 0,3
	Acetona:0,1N HCl em água	47,0 ± 2,6	8,3 ± 0,2	2,4 ± 0,8
VAGENS	Etanol	9,0 ± 0,0	2,1 ± 0,2	1,1 ± 0,1
	Etanol:0,1N HCl em água	31,6 ± 2,5	6,2 ± 1,6	5,6 ± 1,0
	Acetonitrila	4,3 ± 1,5	1,4 ± 0,5	0,4 ± 0,0
	Acetonitrila:0,1N HCl em água	25,3 ± 1,1	6,1 ± 0,5	2,3 ± 0,8
	Acetona	7,3 ± 0,6	3,4 ± 0,4	0,7 ± 0,1
	Acetona:0,1N HCl em água	26,3 ± 2,6	8,2 ± 0,4	4,4 ± 1,0
CAULES	Etanol	7,3 ± 0,7	1,4 ± 0,6	1,3 ± 0,1
	Etanol:0,1N HCl em água	32,6 ± 1,1	3,6 ± 1,3	3,0 ± 0,8
	Acetonitrila	4,0 ± 1,4	2,2 ± 1,5	0,5 ± 0,0
	Acetonitrila:0,1N HCl em água	25,0 ± 1,4	3,0 ± 0,2	1,7 ± 0,9
	Acetona	13,3 ± 2,1	2,3 ± 0,2	1,5 ± 1,0
	Acetona:0,1N HCl em água	31,3 ± 5,0	4,5 ± 1,8	3,0 ± 0,3

Como pode ser visto na Tabela 2, para folhas, a solução acetona:solução aquosa 0,1N HCl 8:2 (v/v) deu os melhores resultados para número de picos ($47 \pm 2,6$), área total ($8,3 \pm 0,2$), enquanto que etanol puro levou ao melhor rendimento. Realmente, a observação dos perfis obtidos por HPLC para folhas é condizente com isto, já que o cromatograma (Figura 3-F) exibe o maior número de picos, em maiores intensidades. Contudo, surpreende que etanol puro tenha levado ao melhor rendimento para folhas, já que o cromatograma da Figura 3-A só exibe mais picos que o cromatograma C, onde acetonitrila foi usado.

Para vagens (Figura 4), a solução acetona:solução aquosa 0,1N HCl 8:2 (v/v) (Figura 4-F) também mostrou-se bastante eficaz em relação à área total dos cromatogramas ($8,2 \pm 0,5$ AUxs), conforme indicado na tabela 2. A acetonitrila:solução aquosa 0,1N HCl 8:2 (v/v) e o etanol:solução aquosa 0,1N HCl 8:2 (v/v) apresentaram áreas totais semelhantes, porém o

etanol:solução aquosa 0,1N HCl 8:2 (v/v) apresentou maior quantidade de picos. Novamente o etanol puro apresentou maior rendimento para vagens.

Para caules (Figura 5), a solução acetona:solução aquosa 0,1N HCl (v/v) e solução etanol:solução aquosa 0,1N HCl 8:2 (v/v) demonstraram resultados bastante próximos, tanto para a área total quanto para o número de picos. O etanol puro apresentou maior rendimento, no entanto, assim como para os outros resíduos, apresentou resultados inferiores quanto à área e número de picos.

À primeira impressão, com base nos cromatogramas (Figuras 3 à 5) e nas áreas sob os picos dos cromatogramas (Tabela 2), é possível observar que o solvente verde acetona com a presença da solução aquosa 0,1N HCl mostrou-se bastante eficaz. Com relação ao número de picos, não é possível atestar qual solvente apresentou maior eficácia sem um tratamento estatístico mais específico. É importante notar também a presença de um pico aos 43 minutos, aproximadamente, que está presente em todas as partes da planta, mas que é de maior intensidade nas vagens, seguido de folhas, e por fim, caules. A identificação destes compostos será apresentada na seção 5.3.2.

De forma geral, conforme observado nas Figuras 3 a 5, a presença da solução ácida causa bastante diferença entre os perfis obtidos. Nota-se semelhança em termos qualitativos, mas diferença expressiva em termos quantitativos. Nos extratos onde utilizou-se um solvente orgânico com uma solução ácida (solvente orgânico:0,1N HCl em água 8:2 (v/v)), observaram-se maiores números de picos, maiores áreas e também pequeno aumento no rendimento, para os solventes acetona e acetonitrila, para as três partes da planta. Acredita-se que isto foi causado por uma hidrólise em meio ácido, onde compostos contendo açúcares sofreriam uma quebra, com liberação da porção glicosídica e da aglicona. Com isto, os açúcares livres, bastante polares, não interagiriam com a fase estacionária utilizada aqui (C18), bastante apolar, sendo coeluídos logo nos primeiros minutos de análise, no que se considerou como tempo morto (Fig. 3-5). É possível observar também que o pico aos 45 minutos se torna mais intenso na presença da solução ácida, para os três tipos de solventes (Fig. 3-5), cujo espectro UV apresentou máximos em 220, 270 e 340nm. De acordo com Mabry et al. (1970), os espectros UV de flavonas e flavonóis, em metanol, exibem dois máximos no intervalo de 240 a 400nm, sendo que o pico chamado de Banda I encontra-se no intervalo de 300 a 380nm, e o pico chamado de Banda II está entre 240 e 280nm. Já as

isoflavonas, flavanonas e dihidroflavonois exibem Banda II mais intensa em relação à Banda I. Para isoflavonas, a Banda II ocorre na região de 245 a 270nm. Seguindo esta classificação, é mais provável que o pico observado aos 45 minutos seja uma flavona, possivelmente a apigenina. Esta confirmação será discutida posteriormente (subseção 5.3.2.2).

Nota-se também que os cromatogramas dos extratos da acetona para folhas (Figura 3-E,F), vagens (Figura 4-E,F) e caules (Figura 5-E,F) apresentaram picos de intensidade semelhante aos 20 minutos, aproximadamente, que não foram observados nos extratos de etanol e de acetonitrila.

Pode-se dizer que tanto a acetona como o etanol foram mais eficientes em comparação com a acetonitrila, para os três parâmetros estabelecidos. Além disto, o fato de a acetona e do etanol terem apresentado desempenhos de extração de resíduos de soja superiores aos observados para a acetonitrila, sendo este o solvente utilizado no trabalho de referência para a extração de grãos (KIM et al. 2011), para a extração de grãos, traz uma boa perspectiva do ponto de vista ambiental. A acetonitrila é tóxica para mamíferos (as doses letais 50% oral e dermal – LD50 – são 2460 e 2000mg/kg em ratos e coelhos, respectivamente), possui meia vida de 2 a 20 dias em água e ainda exibe toxicidade aguda e crônica para a vida aquática. Tais características a classificam como um solvente indesejável tanto do ponto de vista ambiental (FRITZ; RUTH; KRAGL, 2009; FUNARI et al., 2015). Já o etanol e a acetona, por serem menos tóxicos, biodegradáveis e por poderem ser obtidos a partir de processos de fermentação a partir de matérias-primas renováveis, ocupam melhores posições em guias de seleção de solventes, feitos para atingir processos mais sustentáveis (PRAT et al. 2016; FUNARI et al., 2014, 2015).

Cabe dizer que pelo fato de acetonitrila e acetona apresentarem características físico-químicas semelhantes, como, por exemplo, serem completamente miscíveis com água, serem aceptoras de ligações de hidrogênio e apresentarem algumas propriedades solvatocrômicas e viscosidades semelhantes, faz da acetona um forte candidato a substituir a acetonitrila em processos de separação (FUNARI et al., 2015) e de extração, como aqui mostrado. Também devido a propriedades físico-químicas semelhantes, além das vantagens ambientais acima mencionadas, o etanol (e suas misturas com água) apresenta-se como uma alternativa ao metanol tanto em processos de extração como de separação de matrizes de origem natural (CASTRO et al., 2016; FUNARI et al., 2014a; WELCH et al., 2010). Cabe acrescentar que

etanol é amplamente disponível no Brasil, onde é inclusive produzido a partir de cana-de-açúcar obtida em culturas ditas “orgânicas”, sustentando ainda mais os conceitos de Química Verde (FUNARI et al., 2014a).

5.2 Comparação dos perfis metabólicos de diferentes resíduos agrícolas

O próximo passo foi comparar os perfis cromatográficos obtidos por HPLC para os distintos resíduos coletados. Para tal, a comparação deve ser feita entre extratos preparados a partir de um mesmo método extrator e analisados utilizando-se um mesmo método analítico. Para efeito de comparação entre as partes da planta, foram escolhidos os extratos obtidos com Etanol e com Etanol:0,1N HCl em água 8:2 (v/v) (Figura 6), pois além do etanol, dentre os três aqui investigados para fins de extração, ser o solvente mais bem avaliado em guias de comparação de desempenhos ambientais de solventes (PRAT et al., 2016), os extratos baseados em EtOH apresentaram, em geral, os melhores resultados em relação ao parâmetro número de picos, como anteriormente discutido, considerado aqui o mais importante dentre os três parâmetros avaliados (número de picos, área total sob os picos do cromatograma e rendimento) para uma comparação qualitativa (Tabela 2). A presença da solução ácida alterou visivelmente a eficácia da extração na qual os cromatogramas apresentaram maior número de picos, por isto a Figura 6 traz os extratos obtidos com EtOH e EtOH:0,1N HCl em água 8:2 (v/v).

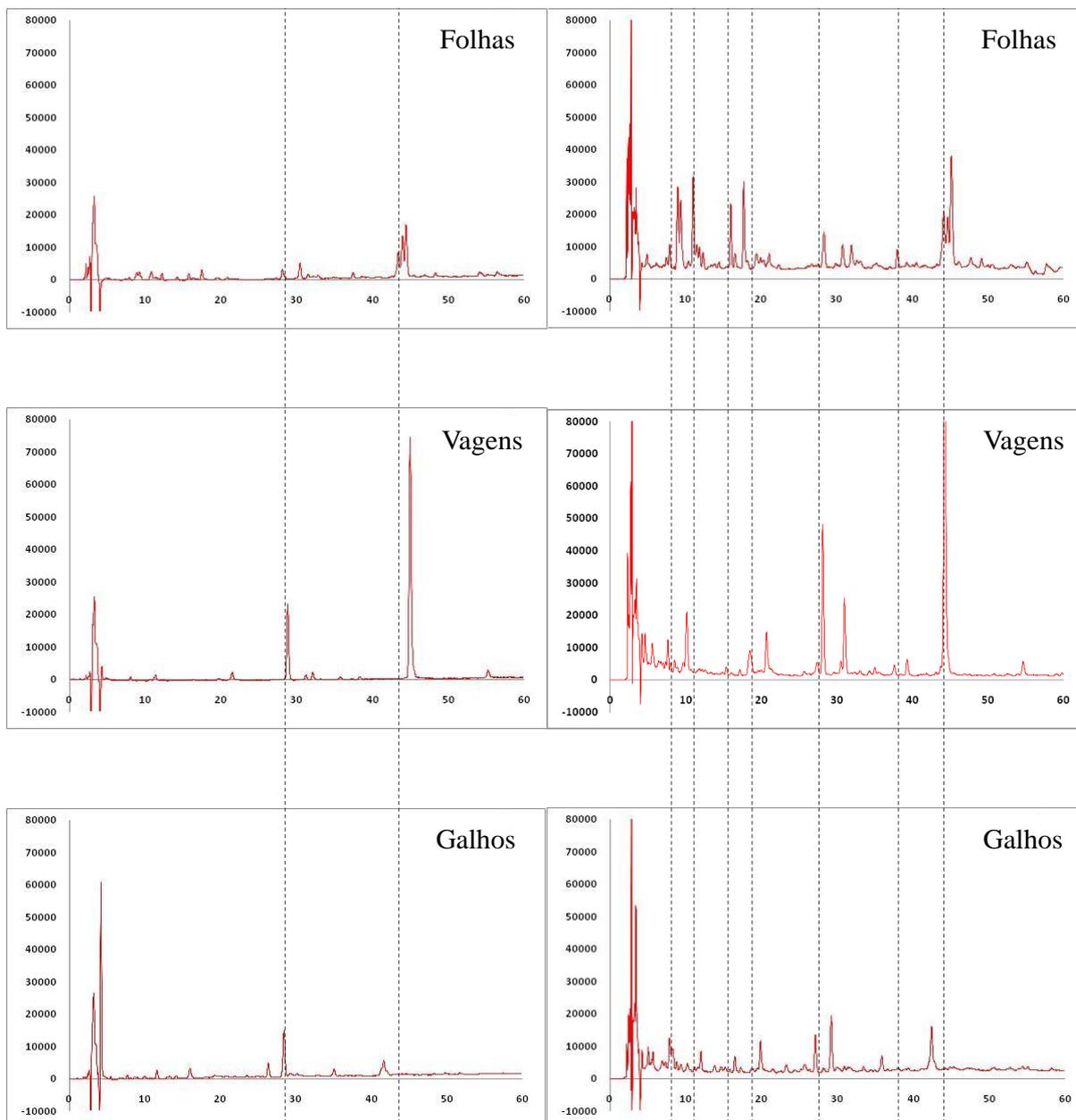


Figura 6. Perfis HPLC-UV representativos a 254nm dos extratos EtOH de folhas, vagens e caules obtidos com etanol (coluna da esquerda) e EtOH:0,1N HCl aquoso 8:2 (v/v) (coluna da direita). Coluna: Luna® C18, 250 x 4.6 mm; 5 μ m. Fase móvel: 0,1% AcOH em água (A) e 0,1% AcOH em MeCN (B) no seguinte gradiente: 15-35% B (0-50 min); 35% B (50-60 min). Vazão: 1 mL/min. Volume de injeção: 20 μ L.

As folhas apresentaram mais picos em comparação a vagens e a caules (Figura 6, Tabela 2), o que indicou maior variedade de compostos absorvendo em 254 nm, em níveis detectáveis, na amostra de folhas. Já os extratos de vagens diferenciaram-se acentuadamente dos demais devido à presença de picos de intensidade muitos maiores, revelando uma diferença quantitativa no conteúdo de metabólitos secundários das amostras (Figura 6). Aqui, uma vez mais, o destaque ficou para o composto eluindo em aproximadamente 45 min, que teve a sua identidade putativamente definida como sendo apigenina (subseção 5.3.2.2).

5.3 Identificação de isoflavonas diretamente nos extratos

5.3.1 Ajuste das condições cromatográficas com o intuito de reduzir o impacto ambiental do método

Diversas métricas para avaliar o grau de impacto ambiental de um método analítico já foram descritas na literatura, cada uma com vantagens e desvantagens (FUNARI et al., 2014; TOBISZEWSKI, 2016). No caso de métodos de HPLC, considerou-se a HPLC-Environmental Assessment Tool (HPLC-EAT) como a ferramenta mais apropriada, já que ela é capaz de gerar refinadas diferenciações entre métodos de HPLC (FUNARI et al., 2014). A abordagem do HPLC-EAT determina uma pontuação para o método, baseada em como os solventes empregados afetam o ambiente e no risco que estes podem apresentar ao operador, em termos de saúde e segurança. Quanto menor for esta pontuação, menor será o impacto ambiental do método, e, conseqüentemente, mais “verde” ele é considerado (GABER et al., 2011). A pontuação dada pelo HPLC-EAT é calculada de acordo com a Equação 1, considerando os impactos de cada componente da fase móvel à saúde, segurança e ambiente (SHE). A pontuação SHE é determinada a partir de diferentes parâmetros, como, por exemplo, toxicidade aguda e crônica e persistência no ambiente (KOLLER et al., 2000). As pontuações SHE para solventes orgânicos normalmente utilizados são apresentadas no banco de dados do software do HPLC-EAT, tornando-as de fácil acesso.

Pontuação HPLC-EAT = $m_i (S_i + H_i + E_i) + m_{i+1} (S_{i+1} + H_{i+1} + E_{i+1}) + \dots$ (Equação 1)

Onde m é a massa em gramas do composto usado no método e S , H e E são as pontuações para cada componente da fase móvel em relação aos parâmetros Segurança, Saúde e Ambiente, respectivamente.

Inicialmente, o método HPLC de referência desenvolvido por Kim et al. (2012), baseado em acetonitrila como solvente orgânico e em uma coluna C18 de dimensões 250 x 4,6 mm e 5 μ m (veja subseção 4.4), foi transposto para uma coluna menor, de dimensões 150 x 4,6mm e 3,5 μ m, com ajuda do programa livre desenvolvido por Guillaume et al. (GUILLARME et al., 2008, 2007). Esta etapa já propiciou uma diminuição de 28% do impacto ambiental do método, levando a um valor de HPLC-EAT de 50,3 em detrimento de 70,6 do método de referência.

Em seguida, com o intuito de minimizar ainda mais o impacto do método de separação a ser empregado nesta etapa, o componente orgânico MeCN foi substituído por MeOH, um solvente preferível em relação à problemática MeCN de acordo com parâmetros ambientais (PRAT et al., 2016). A força de eluição das fases móveis foi mantida, sendo os valores de porcentagem de MeOH obtidos com o auxílio de um nomograma para cromatografia líquida em fase reversa (C18) (subseção 4.5) (SNYDER, GLAJCH e KIRKLAND, 1997). O impacto desta nova condição foi medido, levando a uma considerável diminuição do impacto ambiental (25%) em relação ao método de referência já transposto para coluna de menor dimensão, com valores de HPLC-EAT de 37,7 e 50,3, respectivamente.

Em suma, do método de referência (KIM et al., 2012) utilizado para as análises iniciais dos extratos aqui investigados, ao método utilizado para se identificar os compostos, como descrito a seguir, obteve-se uma redução de 53% no índice de impacto ambiental. Este ganho em termos ambientais poderia ser ainda maior se MeCN fosse substituída por acetona ou por EtOH, já que são solventes preferíveis ao MeOH, cujas eficiências de separação já foram demonstradas na literatura (FUNARI et al., 2016, 2015; PRAT et al., 2016). Entretanto, as análises por espectrometria de massas exigem o uso de solventes com grau de pureza MS ainda não disponível para acetona e EtOH no mercado brasileiro, por isto o MeOH foi escolhido para substituir MeCN.

5.3.2 Estratégia de identificação de compostos em mistura

Esta etapa do trabalho visou à análise da ocorrência ou não de isoflavonas previamente relatadas em soja, disponíveis comercialmente, diretamente nos resíduos estudados. O estudo baseou-se em uma estratégia de desreplicação anteriormente desenvolvida pelo Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE), do Instituto de Química da UNESP-Araraquara, em colaboração com o Laboratório de Fitoquímica da Universidade de Genebra, para a identificação de substâncias em extratos de plantas do gênero *Lippia* (FUNARI et al., 2012). Esta estratégia, com modificações, foi empregada na investigação dos resíduos agrícolas aqui investigados. De forma geral, tal estratégia baseia-se no cruzamento de informações cromatográficas e espectrométricas, obtidas em análises por cromatografia líquida acoplada a espectrometrias de massas de alta resolução e de

ultravioleta, com informações quimiotaxonômicas disponíveis na base de dados *SciFinder* (FUNARI et al., 2012).

As análises apresentadas neste trabalho foram realizadas na Central de Espectrometria de Massas de Micromoléculas Orgânicas – CEMMO (FCRP/USP), nas quais os extratos EtOH e EtOH:HCl 8:2 (v/v) de vagens, folhas e caules, coletadas no campo após colheita, foram injetados em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada PDA/UV e à espectrometria de massas de alta resolução com interface de ionização por electrospray e analisador por tempo de voo (HPLC-PDA/UV-ESI/TOF/MS). Para efeito comparativo, extratos dos grãos de soja, que foram coletados no campo juntamente com as amostras de resíduos, foram utilizados como extratos de referência, uma vez que é conhecida a ocorrência das seis isoflavonas aqui utilizadas como compostos de referência (padrões) nesta parte do vegetal.

5.3.2.1 Estudos de ocorrência de isoflavonas nos extratos com o auxílio de padrões

Inicialmente, soluções dos padrões das isoflavonas daidzina (1), glicitina (2), genistina (3), daidzeína (4), gliciteína (5) e genisteína (6) (Figura 7) foram injetadas em HPLC-PDA/UV-ESI/TOF/MS. Os Cromatogramas HPLC-ESI(+)-MS obtidos quando da injeção destes padrões podem ser vistos na Figura 8. Para efeito de comparação posterior, durante o processo de desreplicação, os espectros de massas observados para estes padrões, bem como os seus espectros UV, obtidos durante experimento, foram utilizados e são apresentados nas Figuras 11-14 e na Figura 16.

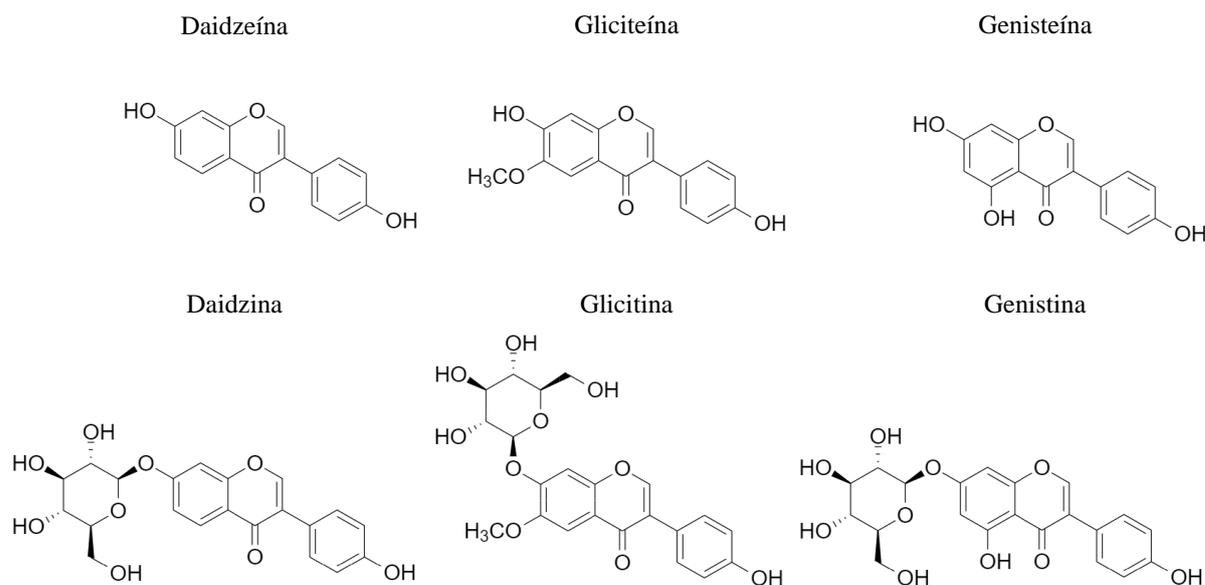


Figura 7. Fórmulas estruturais das isoflavonas usadas como substâncias de referência neste trabalho: daidzina (1), glicitina (2), genistina (3), daidzeína (4), gliciteína (5) e genisteína (6).

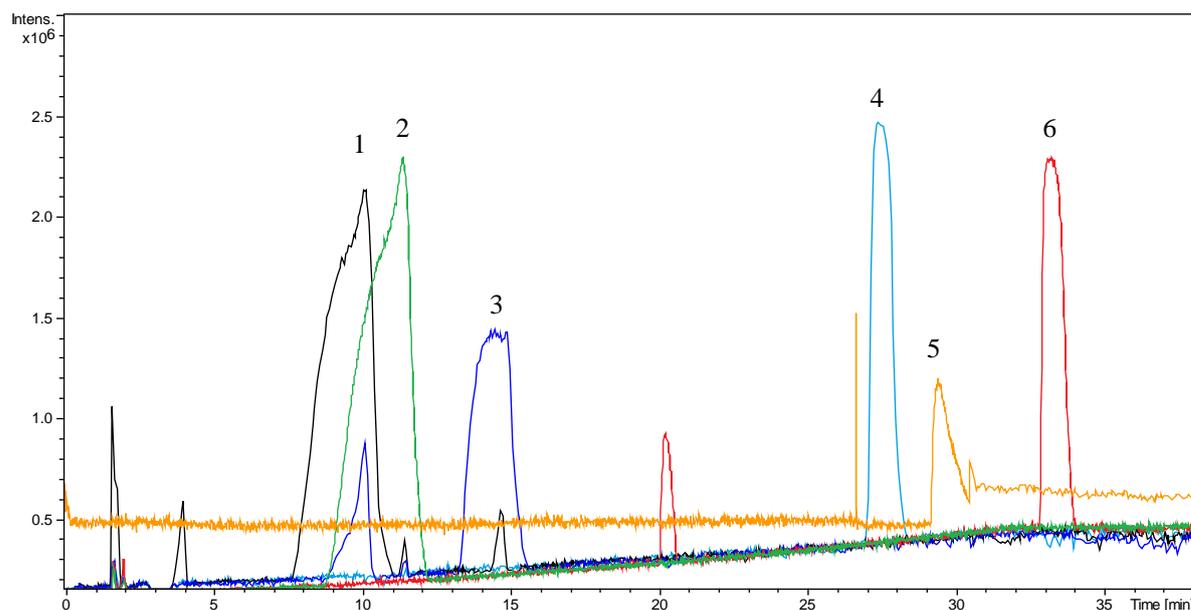


Figura 8. Cromatogramas HPLC-ESI(+)-MS, sobrepostos, dos padrões injetados daidzina (1); glicitina (2); genistina (3), daidzeína (4), gliciteína (5) e genisteína (6). Coluna: XBridge C18, 150 x 4.6 mm; 3,5 μ m. Fase móvel: 0,1% AcOH em água (A) e 0,1% AcOH em MeOH (B) no seguinte gradiente: 21-45% B (0-30 min); 45% B (30-36 min). Vazão: 1 mL/min. Volume de injeção: 12 μ L.

Como esperado, por se tratar de uma análise por HPLC em modo reverso, as isoflavonas glicosiladas daidzina (1), glicitina (2) e genistina (3), que são mais polares, eluíram antes do que suas respectivas agliconas daidzeína (4), gliciteína (5) e genisteína (6) (Figura 8).

Em seguida, iniciou-se a injeção dos extratos. A Figura 9, a seguir, traz os cromatogramas HPLC-ESI(+)-MS (*Base Peak Chromatogram*) dos extratos EtOH e EtOH:0,1N HCl em água 8:2 (v/v) de grãos (extratos de referência) e dos resíduos coletados no campo de cultivo (vagens, folhas e caules de soja). Nota-se que as amostras diferem entre si tanto em termos qualitativos como quantitativos. As vagens (C e D) apresentaram um pico bastante proeminente em torno de 30 minutos, que foi observado também nas amostras de caules (G e H), mas não com a mesma intensidade. Além disto, observa-se semelhança entre os cromatogramas obtidos por HPLC-PDA/UV (Figura 6) e os cromatogramas obtidos por HPLC-ESI(+)-MS (Figura 9).

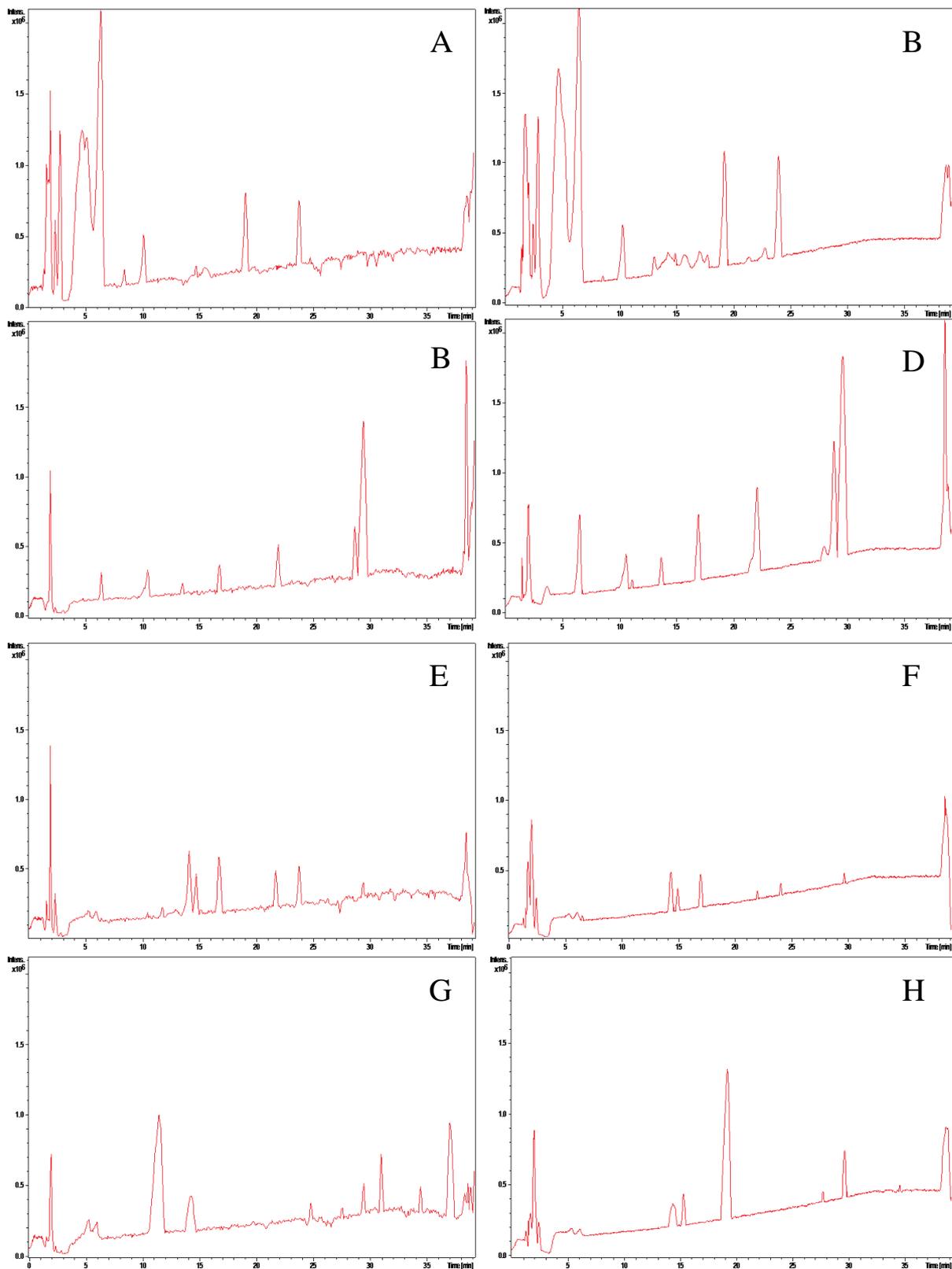


Figura 9. Cromatogramas HPLC-ESI(+)-MS (*Base Peak Chromatogram*) representativos de extratos EtOH (coluna da esquerda) e EtOH:0,1N HCl em água 8:2 (v/v) (coluna direita) de grãos (A e B), vagens (C e D), Folhas (E e F) e caules (G e H). Coluna: XBridge C18, 150 x 4,6 mm; 3,5 μ m. Fase móvel: 0,1% AcOH em água (A) e 0,1% AcOH em MeOH (B) no seguinte gradiente: 21-45% B (0-30 min); 45% B (30-36 min). Vazão: 1 mL/min. Volume de injeção: 12 μ L.

A busca pelas m/z compatíveis com os observados para os padrões foi iniciada pelo extrato de referência, ou seja, o extrato EtOH:0,1N HCl em água 8:2 (v/v) de grãos de soja, no modo positivo (Tabela 3). Uma tolerância do valor m/z observado experimentalmente pela injeção dos padrões de mais ou menos 0,05 foi aplicada. Após a observação da presença de íons com m/z compatíveis com os observados para os padrões (Fig. 10), passou-se a verificar se os seus tempos de retenção também eram compatíveis com o dos padrões correspondentes. Em caso positivo, o próximo passo foi confrontar os espectros de massas e de UV obtidos online dos candidatos com os dos respectivos padrões de referência. Os passos e os resultados são apresentados detalhadamente a seguir para este extrato de referência.

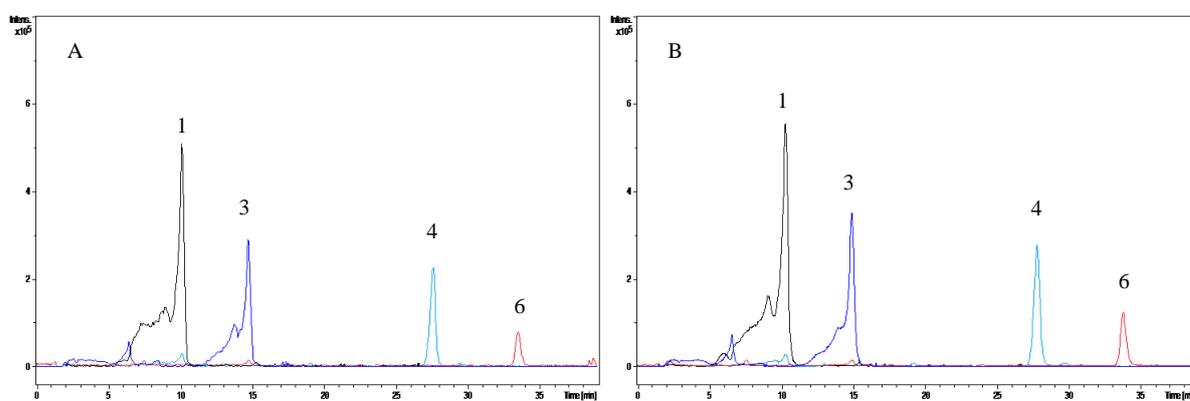


Figura 10. Cromatogramas com íons extraídos de extratos EtOH (A) e EtOH:0,1N HCl em água 8:2 (v/v) (B) de grãos. Os picos foram numerados de acordo com o m/z das isoflavonas daidzina (1), genistina (3), daidzeína (4) e genisteína (6). Coluna: XBridge C18, 150 x 4,6 mm; 3,5 μ m. Fase móvel: 0,1N AcOH em água (A) e 0,1N AcOH em MeOH (B) no seguinte gradiente: 21-45% B (0-30 min); 45% B (30-36 min). Vazão: 1 mL/min. Volume de injeção: 12 μ L.

A Figura 10 traz os cromatogramas de íons extraídos dos extratos EtOH e EtOH:0,1N HCl em água 8:2 (v/v) de grãos, enquanto que as Figuras 11-14 trazem os espectros UV e MS observados para os picos com tempos de retenção próximos aos padrões de referência. Pela Figura 10, observa-se que os tempos de retenção para os grãos são muito próximos aos observados para os padrões de daidzina (1), genistina (3), daidzeína (4) e genisteína (6) (Figura 8), com desvios máximos de aproximadamente 0,5 min. Tais desvios foram considerados aceitáveis, pois poderiam ser resultantes da robustez apenas parcial do método, que não foi validado, bem como de efeito matriz, já que estes compostos poderiam interagir com outros presentes no extrato, influenciando levemente os seus tempos de retenção em relação à análise dos compostos puros, livres do efeito matriz.

O pico com m/z 417,1221, compatível com aquele valor observado para a daidzina (m/z 417,1207), foi o primeiro a ser analisado. O seu tempo de retenção (10,0 min) também mostrou-se compatível com aquele observado para a daidzina (9,5 min) portanto, passando pelo segundo filtro. Então, os espectros de massas e de UV correspondente a este pico do extrato foram comparados com os do padrão, conforme a Figura 11.

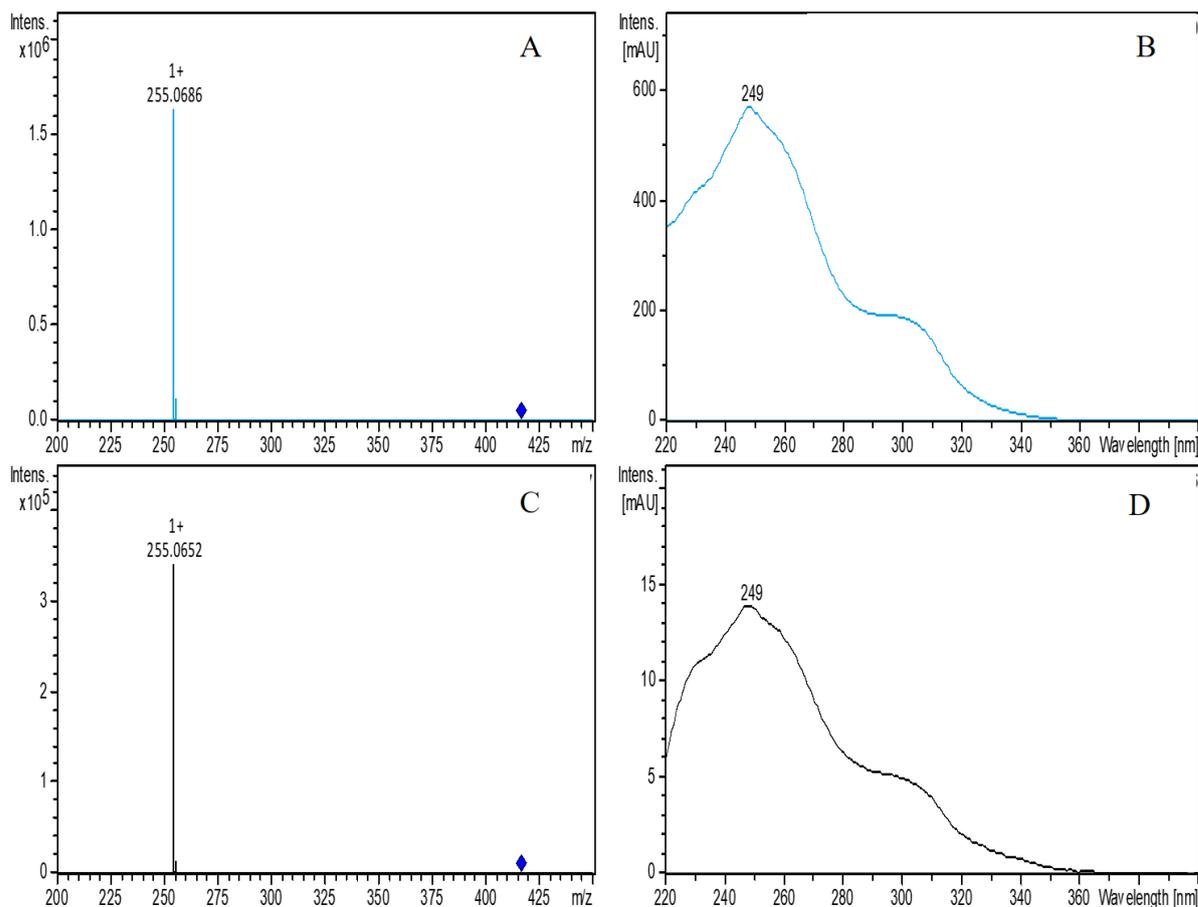


Figura 11. Espectros de massas e de UV da daidzina (A e B, respectivamente) e do candidato com m/z 417,1221 (C e D, respectivamente) presente no extrato EtOH: 0,1N HCl em água 8:2 (v/v) de grãos de soja. Coluna: XBridge C18, 150 x 4.6 mm; 3,5 μ m. Fase móvel: 0,1N AcOH em água (A) e 0,1N AcOH em MeOH (B) no seguinte gradiente: 21-45% B (0-30 min); 45% B (30-36 min). Vazão: 1 mL/min. Volume de injeção: 12 μ L.

Como pode ser observado na Figura 11, o espectro de massas do padrão de daidzina apresentou um sinal em m/z 417,1207 $[M+H]^+$, que gerou um fragmento de m/z 255,06 (pico base). Alta semelhança foi observada para o espectro de massas do composto candidato que apresentou m/z 417,1221 e um fragmento m/z 255,06, também como pico base, reforçando muito a hipótese de ser o composto daidzina. O fragmento de m/z 255,06 representa a forma aglicona, após a perda de uma unidade de m/z 162, que representa a porção açúcar da molécula (Figura 12). Também pela Figura 11, pode-se observar a alta similaridade entre os

seus espectros UV, em ambos os casos com UV_{máx} em 249 nm e um ombro em aproximadamente 305 nm. Evidentemente este composto passou também pelo filtro quimiotaxonômico, pois já foi isolado de extratos de grãos de soja (KIM et al., 2012). Com isto, pode-se afirmar que o composto em questão presente no extrato de referência trata-se da daidzina (Tabela 3).

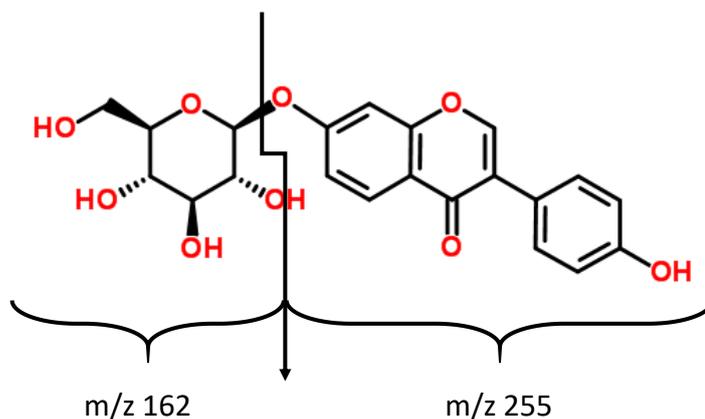


Figura 12. Esquema da clivagem da porção açúcar da isoflavona daidzina. Fonte: a autora.

Procedeu-se, então, á análise comparativa da espécie presente no extrato com m/z 433,1674, compatível com aquele observado para o íon molecular $[M+H]^+$ do padrão genistina (m/z 433,1129). Verificou-se semelhança também em relação aos seus tempos de retenção (14,5 min e 14,5 min, respectivamente). Portanto, passou-se à etapa de comparação de seus espectros de massas e UV, que apresentaram-se muito parecidos entre si (Figura 13). Em ambos os espectros de massas, um sinal relativo ao $[M+H]^+$ foi observado, como informado acima, e ambos tiveram como pico base o íon m/z 271,06. Assim como para a isoflavona glicosilada daidzina, o pico base representa a porção aglicona da molécula, após a perda da porção açúcar de m/z 162, conforme apresentado na figura 14 (MARCH et al., 2004). O próximo filtro a ser vencido seria o do espectro UV. Também aqui foram muito parecidos, com UV_{máx} de 259 nm em ambos os casos, e com uma banda de menor intensidade em 225 nm. Portanto, pode-se identificar o pico em 14,5 min no extrato de referência como sendo a genistina.

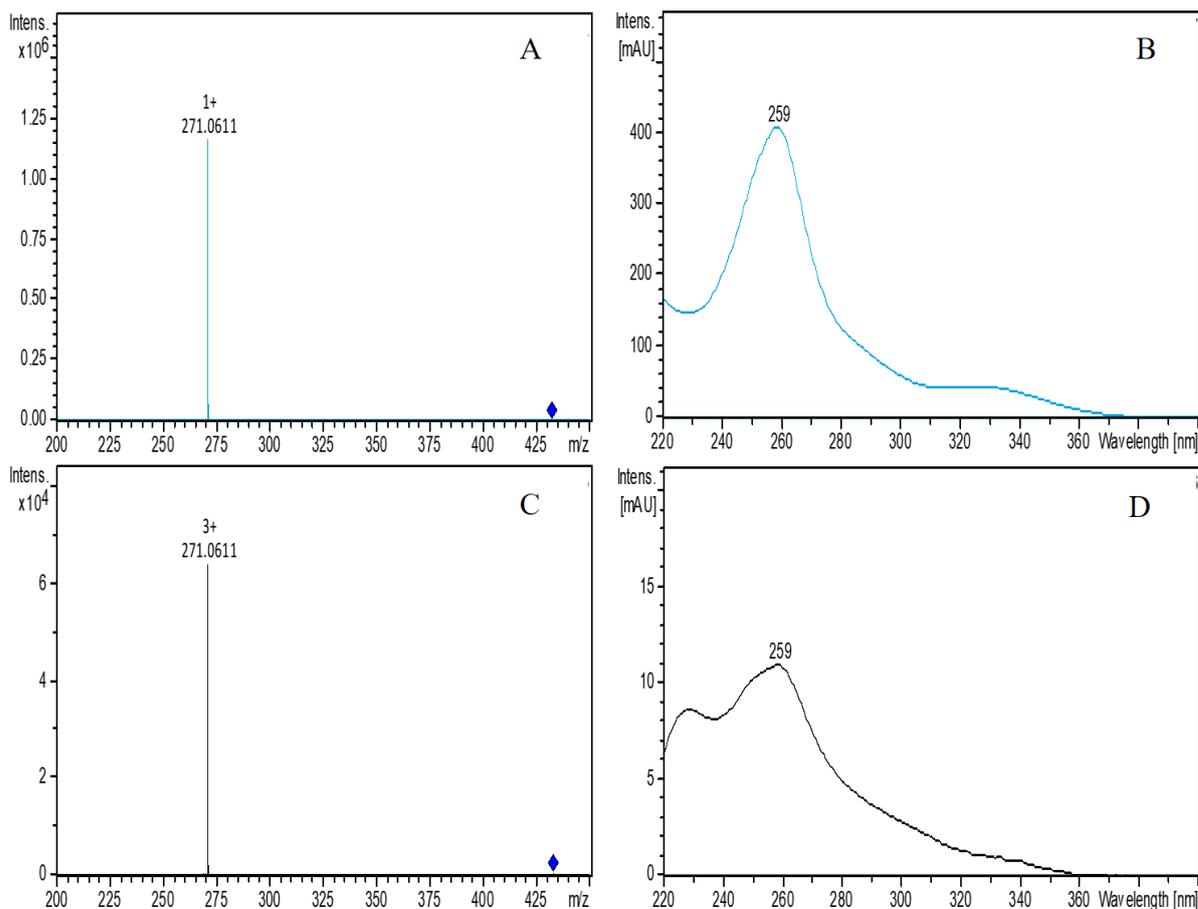


Figura 13. Espectros de massas e de UV da genistina (A e B, respectivamente) e do candidato m/z 433,1674 (C e D, respectivamente) presente no extrato EtOH:0,1N HCl em água 8:2 (v/v) de grãos de soja. Coluna: XBridge C18, 150 x 4.6 mm; 3,5 μ m. Fase móvel: 0,1N AcOH em água (A) e 0,1N AcOH em MeOH (B) no seguinte gradiente: 21-45% B (0-30 min); 45% B (30-36 min). Vazão: 1 mL/min. Volume de injeção: 12 μ L.

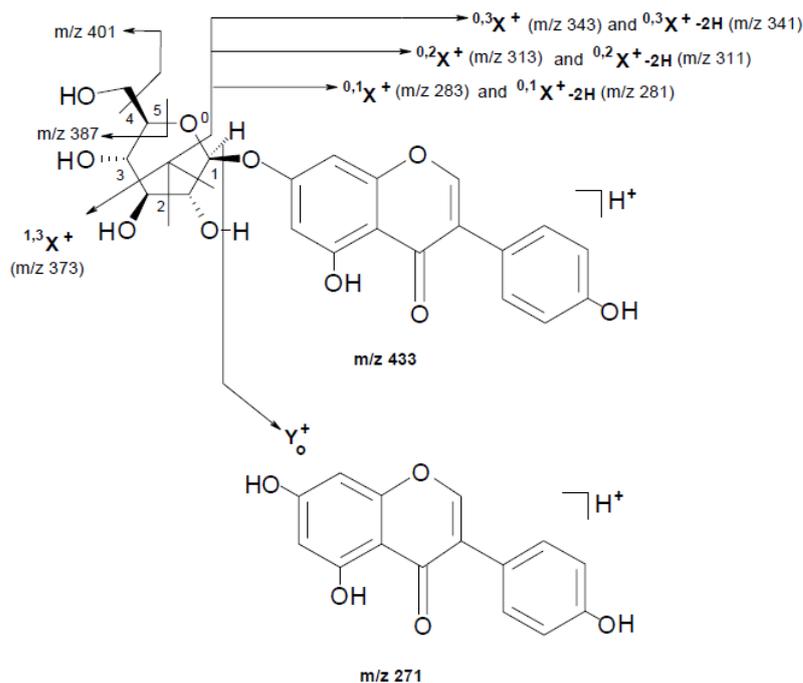


Figura 14. Esquema da fragmentação da molécula da genistina. Fonte: March et al., 2004.

A próxima identificação comparativa foi feita para a espécie presente no extrato de referência com m/z 255,0658, compatível com aquele observado para o íon molecular $[M+H]^+$ do padrão daidzeína (m/z 255,0685). Verificou-se semelhança também em relação aos seus tempos de retenção (27,2 min. e 27,2 min, respectivamente). Portanto, passou-se à etapa de comparação de seus espectros de massas, que se apresentaram muito parecidos entre si (Figura 15). Em ambos os espectros de massas um sinal relativo ao íon molecular $[M+H]^+$ foi observado como picos base. A fragmentação destes íons gerou novos íons com m/z 227,1; 199,1; 181,1; 171,1; 153,1 e 137,0, dentre outros, em ambos os casos. O fragmento de m/z 221,1 representa a molécula após a perda de CO, enquanto que o fragmento de m/z 199,1 representa a molécula após a perda de duas moléculas de CO. O fragmento de m/z 137,0 é resultante da reação de Retro Diels Alder (Figura 16) (TCHOUMTCHOUA et al., 2013).

Em relação aos espectros UV, enquanto o padrão daidzeína exibiu espectro com UVmax em 248 nm, o espectro obtido durante experimento, quando se selecionou o pico com tempo de retenção 27,2 minutos, mostrou UVmax em 223 nm. Contudo, a semelhança entre todos os filtros anteriores nos levou a atribuir este pico ao composto daidzeína, pois seria esperado que se houvesse co-eluição de compostos, o espectro UV recuperado não seria o observado para o padrão, que foi injetado individualmente. Isto porque não há o recurso de se selecionar apenas um espectro UV. Contudo, deve-se dizer que ferramentas quimiométricas foram desenvolvidas para separar os espectros UV de compostos que co-eluem, chamada deconvolução de picos. Por outro lado, pode-se extrair apenas um m/z em um cromatograma, e o espectro de massas seletivo para esta espécie. Eis o motivo pelo qual julgamos que a informação de similaridade entre os espectros de massas deveria se sobrepôr a não semelhança entre os espectros UV.

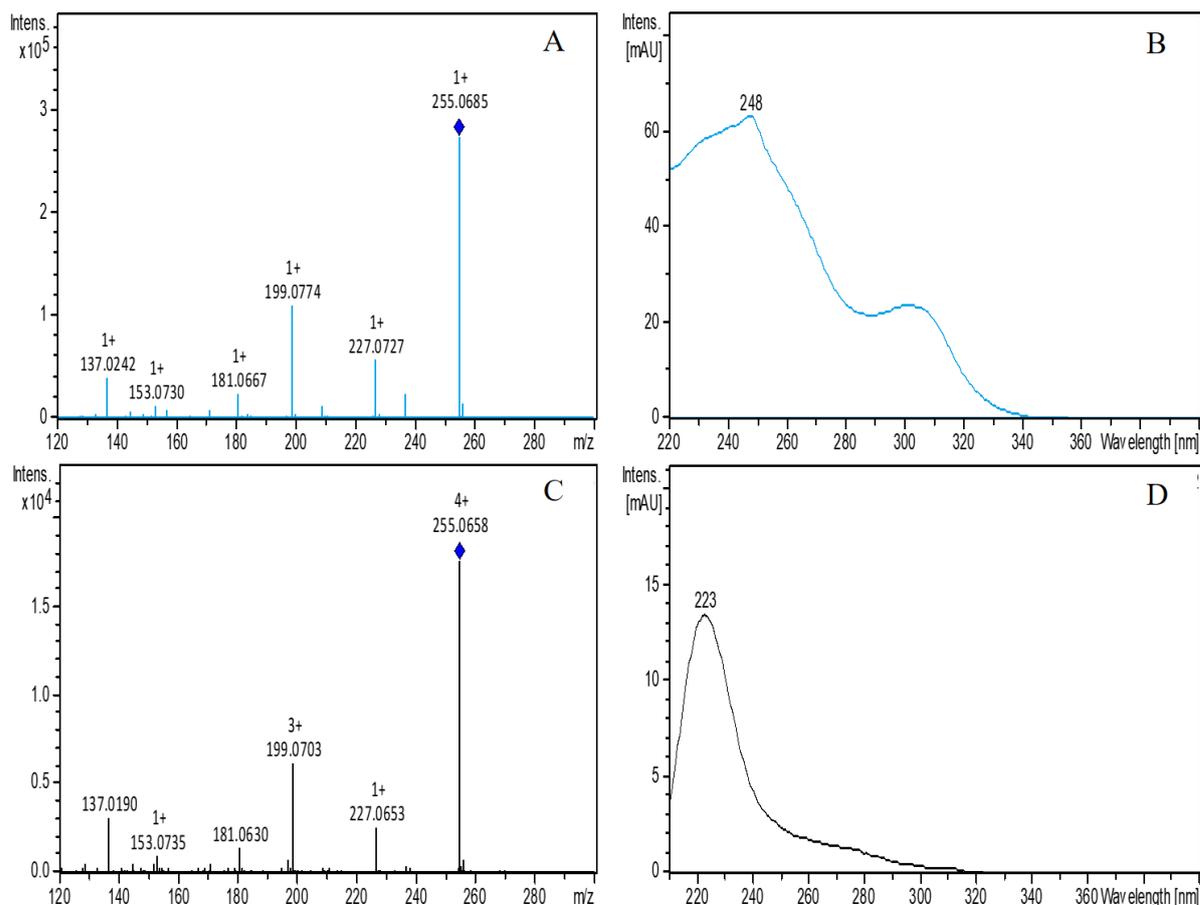


Figura 15. Espectros de massas e de UV da daidzeína (A e B, respectivamente) e do candidato com m/z 255,0658 (C e D, respectivamente) presente no extrato EtOH:0,1N HCl em água 8:2 (v/v) de grãos de soja. Coluna: XBridge C18, 150 x 4.6 mm; 3,5 μ m. Fase móvel: 0,1N AcOH em água (A) e 0,1N AcOH em MeOH (B) no seguinte gradiente: 21-45% B (0-30 min); 45% B (30-36 min). Vazão: 1 mL/min. Volume de injeção: 12 μ L.

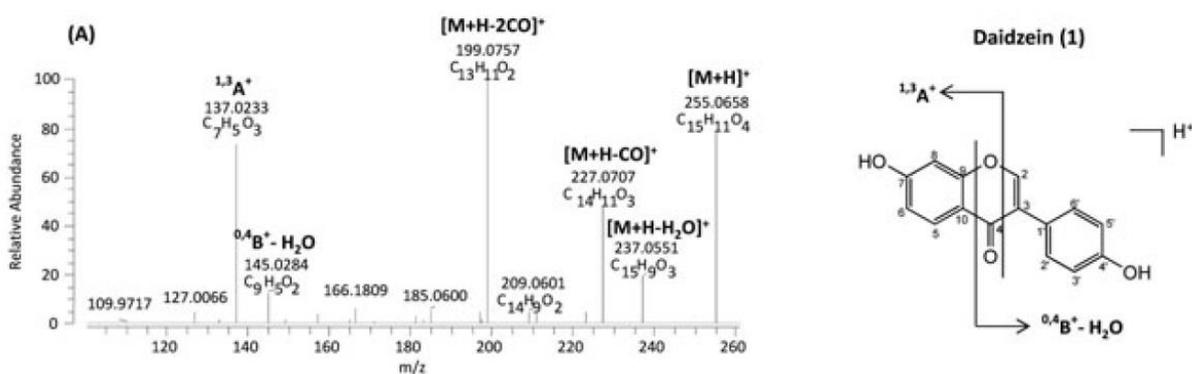


Figura 16. Perfil de fragmentação da isoflavona daidzeína. Fonte: Tchoumitchou et al., 2013.

Por último, realizou-se a identificação comparativa para o composto presente no extrato com m/z 271,0578, compatível ao íon molecular molecular $[M+H]^+$ do padrão genisteína (m/z 271,0596). Houve similaridade entre os tempos de retenção (33,4 min. e 33,5 min., respectivamente). Desta maneira, realizou-se a comparação entre os espectros de

massas, que também foram semelhantes (Figura 17). Em ambos os espectros de massas um sinal relativo ao íon molecular $[M+H]^+$ foi observado como picos base. A fragmentação destes íons gerou íons com m/z 253,03; 243,06; 215,07; 197,06; 169,06 e 153,02 em comum, dentre outros. O íon de m/z 215 representa a dupla perda de CO, já o íon de m/z 153 representa o fragmento resultante da reação de Retro Retro Diels Alder (1^3A^+), conforme figura 18 (MARCH et al., 2004).

Entretanto, em relação aos espectros UV, o padrão genisteína apresentou espectro com UVmax em 259 nm e o espectro obtido durante experimento, quando o pico aos 33,4 foi selecionado, mostrou UVmax em 223 nm. Assim como ocorreu para a identificação comparativa da daidzeína, a similaridade entre os filtros anteriores nos levou a atribuir este pico ao composto genisteína.

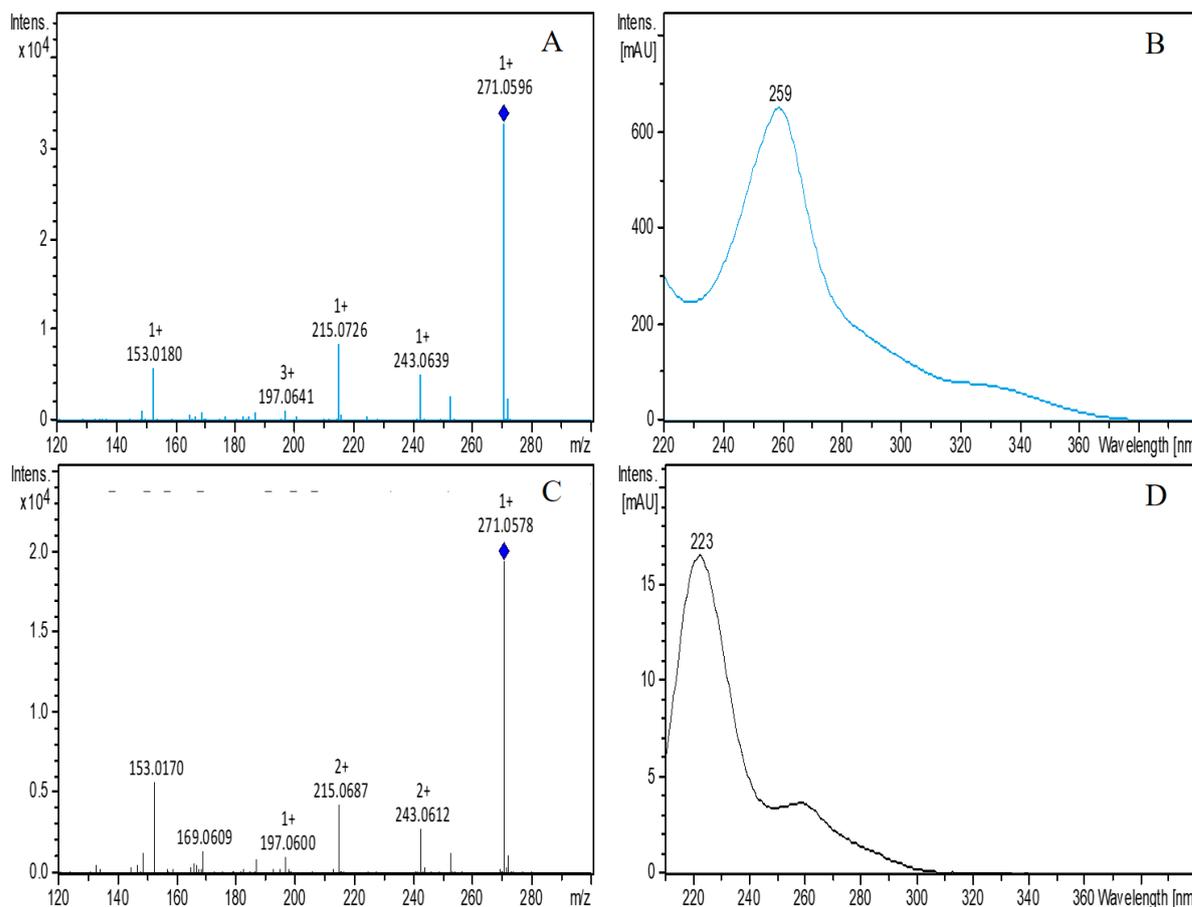


Figura 17. Espectros de massas e de UV da genisteína (A e B, respectivamente) e do candidato com m/z 271,0578 e tempo de retenção (C e D, respectivamente) presente no extrato EtOH:0,1N HCl em água 8:2 (v/v) de grãos de soja. Coluna: XBridge C18, 150 x 4.6 mm; 3,5 μ m. Fase móvel: 0,1N AcOH em água (A) e 0,1N AcOH em MeOH (B) no seguinte gradiente: 21-45% B (0-30 min); 45% B (30-36 min). Vazão: 1 mL/min. Volume de injeção: 12 μ L.

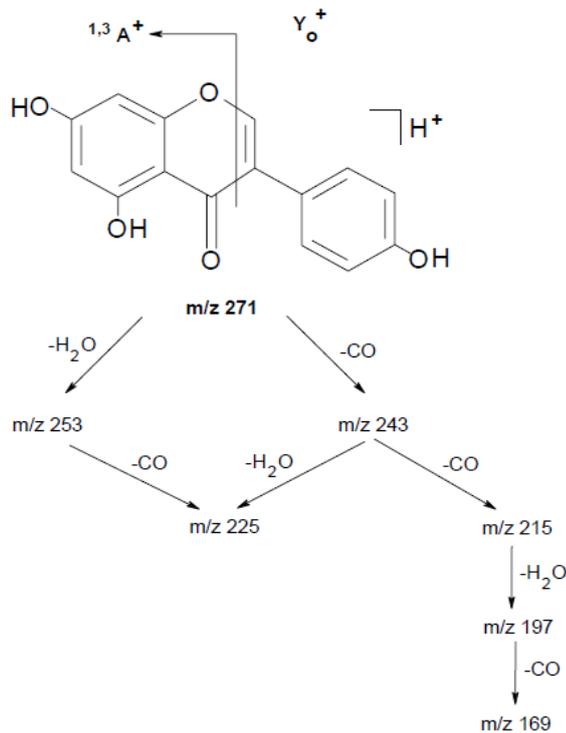


Figura 18. Esquema da fragmentação da molécula da genisteína. Fonte: March et al., 2004.

Em resumo, foi possível identificar em mistura as isoflavonas daidzina (1), genistina (3), daidzeína (4) e genisteína (6) nas amostras de grãos. A daidzina foi a mais abundante entre as isoflavonas detectadas neste extrato de referência, seguida da genistina e da daidzeína. Contudo, não foi possível detectar as isoflavonas glicitina e gliciteína nos extratos de grãos de soja aqui investigados, sendo que a segunda é a correspondente glicosilada da primeira. Szymczak et al. (2017), ao analisarem grãos de soja de 12 localidades diferentes, constataram não só a grande variação no conteúdo das isoflavonas, como também que as principais isoflavonas encontradas em todos os grãos de soja analisados foram a daidzina, malonildaidzina, genistina e malonilgenistina. Os autores verificaram a presença de gliciteína, porém em quantidades muito baixas. Já Yi et al. (1997) verificaram grandes mudanças no teor de isoflavonas em grãos de soja ao longo do cultivo por 21 semanas. Se os níveis de daidzeína e genisteína aumentaram até a 17ª semana, e após este período, tiveram um pequeno decréscimo, já a gliciteína alcançou o nível máximo na 14ª semana, caindo posteriormente para níveis insignificantes. Estes estudos corroboram o fato de termos encontrado em maior quantidade a daidzina, seguida da genistina, bem como a não detecção de gliciteína em nossos extratos de grãos, preparados a partir de material obtido de plantas secas, já com mais de 21 semanas de semeadura.

O procedimento de identificação descrito acima foi aplicado para as amostras de resíduos de vagens, folhas e caules de soja, e os resultados da investigação da ocorrência ou não de isoflavonas com padrões disponíveis está sumarizado na Figura 15 e na Tabela 3, a seguir.

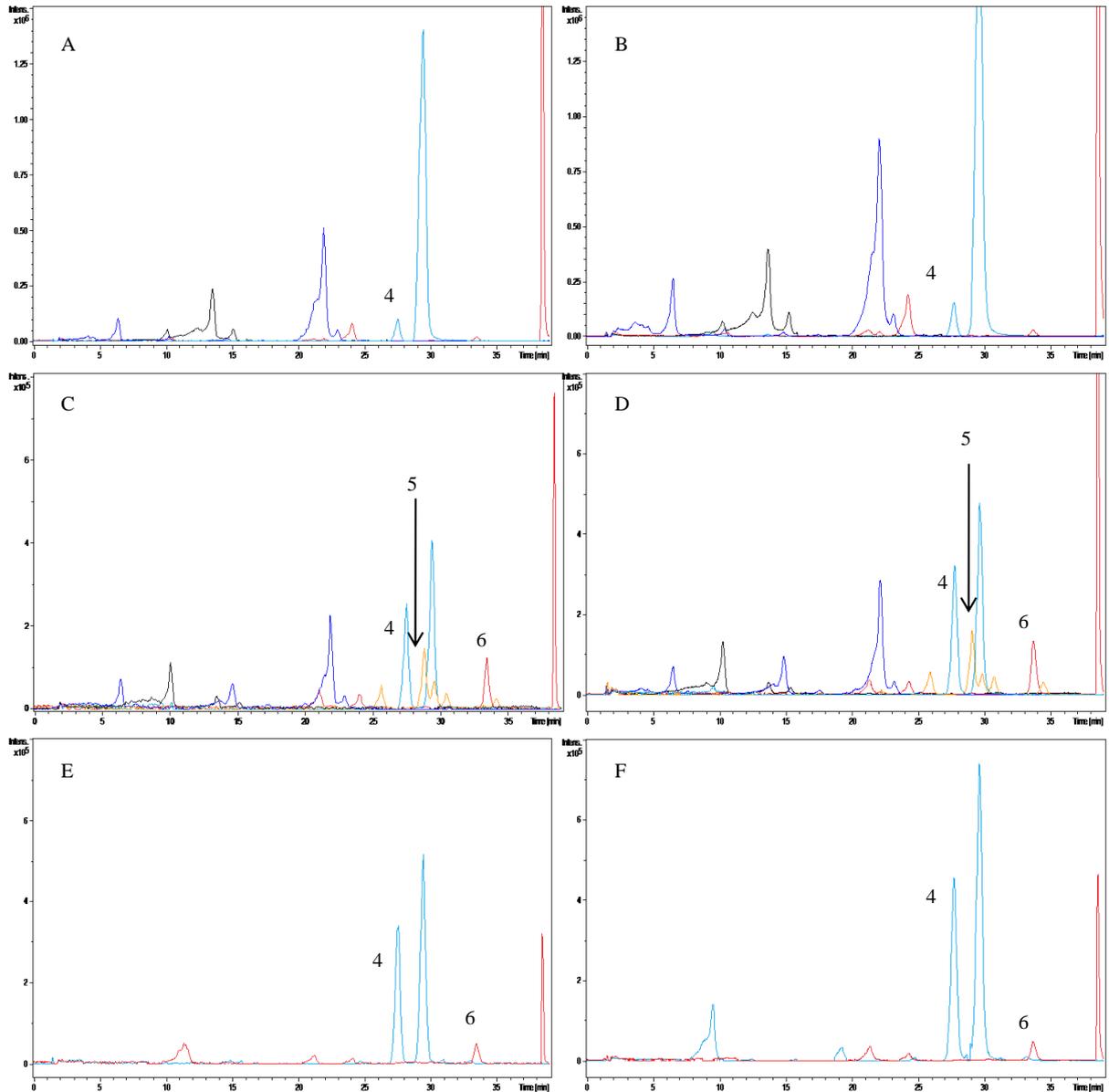


Figura 19. Cromatogramas com íons extraídos dos extratos EtOH (coluna da esquerda) e EtOH:0,1N HCl em água 8:2 (v/v) (coluna direita) de vagens (A e B), folhas (C e D) e caules (E e F). Os picos foram indicados de acordo com a numeração atribuída às isoflavonas daidzina (1); glicitina (2); genistina (3), daidzeína (4), gliciteína (5) e genisteína (6).

Tabela 3: Dados das seis isoflavonas pesquisadas e as respectivas ocorrências nas amostras.

Composto	Tr (min)	Massa teórica [M + H]	Massa medida [M + H] (Δ ppm)	Fórmula molecular	Grão (H ⁺)	Grão	Folha (H ⁺)	Folha	Vagem (H ⁺)	Vagem	Galho (H ⁺)	Galho
Daidzina	9.5	4.171.185	417.1211 (6.2)	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	+	+						
Daidzeína	27.2	255.0657 Da	255.0673 (6.2)	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	+	+	+	+	+	+	+	+
Genistina	14.4	433.1134 Da	433.1124 (2.3)	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	+							
Genisteína	33.5	271.0606 Da	271.0596 (3.7)	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	+	+	+	+			+	+
Glicitina	10.6	447.1291 Da	447.1267 (5.3)	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀								
Gliciteína	30	285.0762 Da	285.0773 (3.8)	C ₁₆ H ₁₂ O ₅			+	+				

Nos extratos de caules, obtidos diretamente do solo após colheita, foram detectadas as presenças das agliconas daidzeína e genisteína, sendo a primeira a que apresentou pico de maior intensidade em relação à segunda (Tabela 3, Figura 15). Já nas vagens secas, apenas a daidzeína foi identificada (Tabela 3, Figura 15).

Nas amostras de folhas, obtidas diretamente do solo após a colheita, foram identificadas as isoflavonas agliconas daidzeína (4), genisteína (6) e gliciteína (5), sendo que a daidzeína foi a que apresentou pico de maior intensidade (Tabela 3, Figura 15). A isoflavona gliciteína foi unicamente encontrada neste extrato, e por isto, a sua identificação será aqui discutida.

Extraíu-se o ion m/z 285,0773 \pm 0,05 no cromatograma obtido para o extrato EtOH: 0,1N HCl em água 8:2 (v/v) de folhas, observando-se um pico com tempo de retenção 29,0 min, ou seja, muito próximo ao observado para o padrão gliciteína (30,0 min). Seguiu-se à etapa de comparação de seus espectros de massas, que se apresentaram muito parecida entre si

(Figura 16). Em ambos os espectros, um sinal relativo ao íon molecular $[M+H]^+$ foi observado. A fragmentação destes íons gerou novos íons com m/z 270,0 e 197,0, dentre outros, em ambos os casos. Em relação aos espectros UV, estes foram muito parecidos. Ambos apresentaram UVmax em 320 nm, com uma segunda banda menos intensa em máximo em 220 nm.

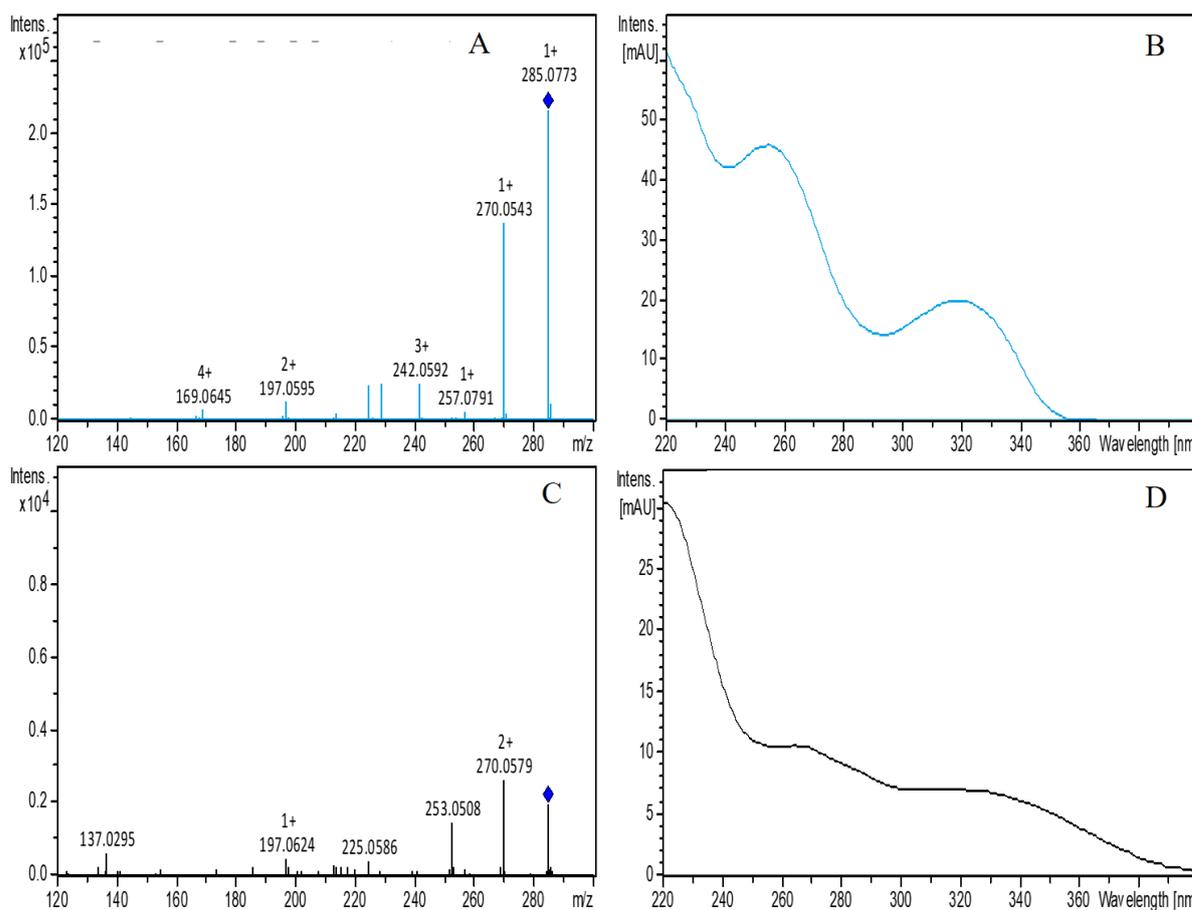


Figura 20. Espectros de massas e de UV da gliciteína (A e B, respectivamente) e do candidato com mesma m/z e tempo de retenção (C e D, respectivamente) presente no extrato EtOH:0,1N HCl em água 8:2 (v/v) de folhas de soja. Coluna: XBridge C18, 150 x 4.6 mm; 3,5 μ m. Fase móvel: 0,1N AcOH em água (A) e 0,1N AcOH em MeOH (B) no seguinte gradiente: 21-45% B (0-30 min); 45% B (30-36 min). Vazão: 1 mL/min. Volume de injeção: 12 μ L.

Já o padrão gliciteína não foi identificado em nenhum extrato analisado neste trabalho.

Diferentemente do observado para os grãos, onde tanto as isoflavonas glicosiladas daidzina (1) e genistina (3), como suas agliconas correspondentes foram identificadas, em vagens, folhas e caules, somente as segundas foram detectadas, tanto para as amostras extraídas com ácido como para as sem ácido. Contudo, Song et al. (2014), ao analisarem amostras de folhas de soja, conseguiram identificar a presença das isoflavonas agliconas

daidzina, genisteína e gliciteína, como também encontraram as isoflavonas glicosiladas daidzina e genistina. Segundo Graham (1991), a distribuição de isoflavonoides e flavonóides é muito característica para cada órgão vegetal e que esta distribuição pode ser afetada pelo tempo de desenvolvimento da planta e pela exposição à luz a que está submetida. Há também evidências que sugerem que a distribuição das isoflavonas seja um processo específico e regulado, afinal tanto a genisteína como a daidzeína podem atuar como antibióticos na proteção do vegetal contra possíveis parasitas. Baseados nisto, supomos que a não observação de isoflavonas glicosiladas daidzina, glicitina e genistina nos extratos de resíduos colhidos do chão após colheita, mesmo aqueles extraídos com solventes puros, sem ácido, possa deva estar relacionado à clivagem da porção açúcar com o passar do tempo, talvez por microorganismos presentes no solo.

5.3.2.2 Expandindo a identificação putativa de isômeros nos extratos

Nas amostras de folhas, caules e vagens (Figura 15) foram observados mais de seis picos com m/z compatíveis aos seis padrões de isoflavonas, servindo como um indicativo de que isômeros de uma ou mais isoflavonas pesquisadas estariam presentes nestes extratos.

Por exemplo, nos extratos EtOH e EtOH:0,1N HCl em água 8:2 (v/v) de folhas, caules e vagens, ao se buscar o m/z $271,0596 \pm 0,05$, compatível com genisteína $[M+H]^+$, dois picos foram observados nas amostras de folhas e caules, com t_R 33,5 e 39,0 minutos, enquanto que nas amostras de vagens, observou-se apenas um pico, bastante intenso com t_R 39,0 minutos. Em todos os casos os picos de t_R 39 min. foram bastante incompatíveis com aquele observado para o padrão genisteína (t_R 33,5 minutos), indicando tratar-se de isômeros desta isoflavona. Então, de acordo com a estratégia de desreplicação aqui adotada e baseada em Funari *et al.* (2012), procedeu-se a uma busca pela fórmula molecular $C_{15}H_{10}O_5$ na base de dados SciFinder, seguida pelo refino com as palavras “glycine max” e “soy”. Encontrou-se que a flavona apigenina e antocianina pelargonidina já haviam sido relatadas em grãos de soja, ambas isômeros da genisteína (ABRANKÓ E SZILVÁSSY, 2015; BOUÉ *et al.*, 2003; SHAHID E ALASALVAR, 2016). Assim, ambas foram consideradas candidatas, procedendo-se ao próximo filtro, que consistiu na comparação dos espectros UV e de massas obtidos durante os experimentos aqui realizados com aqueles disponíveis na literatura. Abrankó e Szilvássy (2015) compararam espectros de massas da apigenina, pelargonidina e da genisteína

por ESI/MS. A seguir a continuação deste procedimento de identificação putativa será discutido para o extrato de Folha-EtOH:0,1N HCl em água 8:2 (v/v), sendo que o mesmo procedimento foi adotado para os demais extratos.

Como a genisteína, a apigenina e a pelargonidina são estruturalmente semelhantes, produzindo íons em comum de m/z 197 e 121 (ABRANKÓ E SZILVÁSSY, 2015). No entanto, íons com m/z 215 e 169 são ambos abundantes no espectro da genisteína e pelargonidina, mas não são observados no espectro da apigenina. Já os íons de m/z 153 e 91 são ambos abundantes no espectro da apigenina e da genisteína, porém não apresentam intensidade significativa no espectro da pelargonidina (Figura 21) (ABRANKÓ E SZILVÁSSY, 2015).

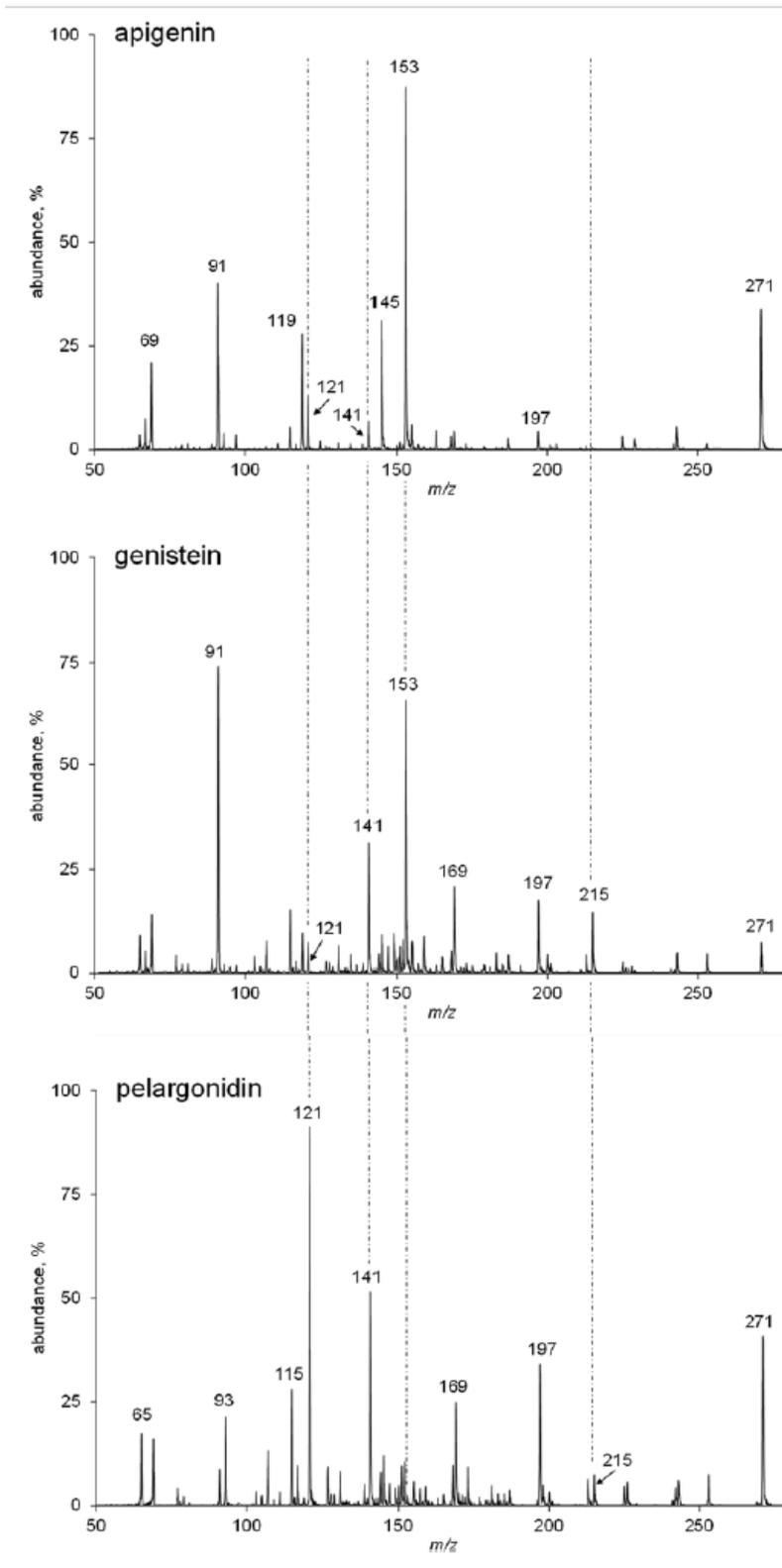


Figura 21. Espectros de massas ESI/MS para genisteína, apigenina e pelargonidina. Fonte: Abrankó e Szilvássy (2015).

Analisando o perfil de fragmentação dos dois picos com m/z $271,0596 \pm 0,05$, observados no extrato Folha-EtOH:0,1N HCl em água 8:2 (v/v), se aquele com t_R 33,5 minutos já havia sido atribuído à genisteína na subseção anterior (Tabela 3), pois tempos de retenção, espectros UV e de massas foram muito próximos ao do padrão, aquele com t_R 39,0 minutos apresentou espectro MS muito próximo ao descrito na literatura para a apigenina, como ausência do fragmento de m/z 215 e a presença do íon de m/z 153, confirmando também a hipótese inicial deste pico tratar-se da apigenina durante a análise dos espectros UV na análise por HPLC-PDA/UV (ABRANKÓ E SZILVÁSSY, 2015). Assim, este composto foi putativamente identificado como sendo apigenina.

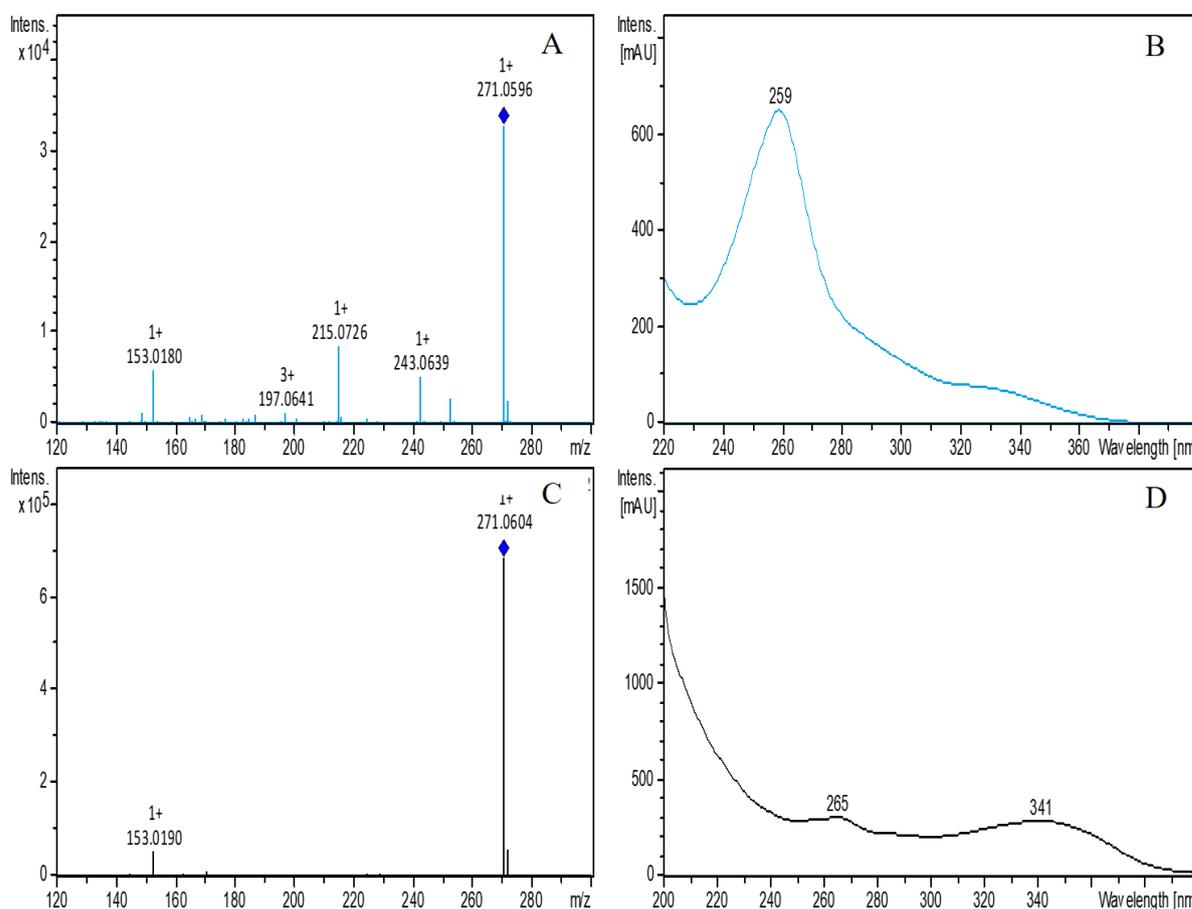


Figura 22. Espectros de massas e de UV da genisteína (A e B, respectivamente) e do isômero com m/z 271,0604 e t_R 39 minutos (C e D, respectivamente) presente no extrato EtOH:0,1N HCl em água 8:2 (v/v) de folhas de soja.

No mesmo extrato, ou seja, no de Folha-EtOH:0,1N HCl em água 8:2 (v/v), ao se verificar a possibilidade de ocorrência de daidzeína (m/z $255,0657 \pm 0,05$), também foram observados dois picos, de t_R 27,2 e 29,0 minutos. O primeiro pico, com t_R 27,2 já havia sido atribuído à daidzeína na subseção anterior, pois o tempo de retenção e espectros UV e MS estão bastante próximos ao do padrão. No entanto, para o pico com t_R 29,0 minutos, tanto o

tempo de retenção como os espectros UV e MS foram distintos daqueles observados para a daidzeína, indicando tratar-se de um isômero desta. Ao se cruzar a fórmula molecular $C_{15}H_{10}O_4$ com as palavras “glycine max” e “soy” no SciFinder, encontrou-se que a flavona 7,4'- dihidroxiflavona já havia sido relatada em vagens e folhas de soja (BOUÉ et al., 2003; MURAMAKI et al., 2014). O primeiro filtro analisado foi o espectro UV obtido experimentalmente, que apresentou UVmax de 255nm, 312nm e 331nm, muito similar ao espectro UV da 7,4'- dihidroxiflavona, que apresenta UVmax em 253nm, 312nm e 328nm (MABRY et al., 1970). O segundo filtro analisado foi o comparativo de espectros de massas, no qual o fragmento de m/z 199 não foi observado (Figura 23-C), que condiz com o relatado na literatura para a candidata 7,4'- dihidroxiflavona (KUHN et al., 2003). Assim, a espécie encontrada neste extrato, com m/z 255,0662 e t_R 29,0 minutos, foi identificada putativamente como sendo 7,4'- dihidroxiflavona.

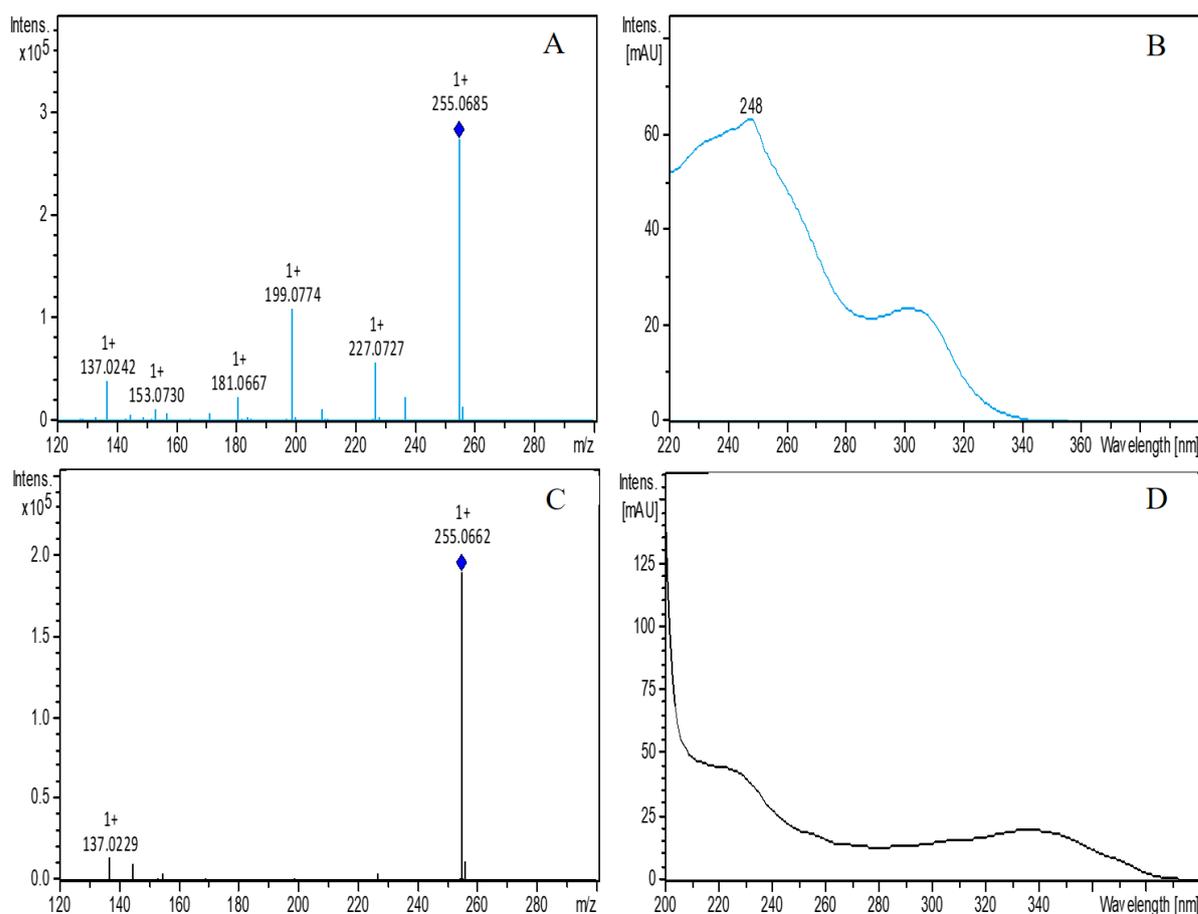


Figura 23. Espectros de massas e de UV da daidzeína (A e B, respectivamente) e do isômero com m/z 255,0662 (C e D, respectivamente) presente no extrato EtOH: 0,1N HCl em água 8:2 (v/v) de folhas de soja.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho levaram à conclusão de que, para qualquer uma das respostas monitoradas neste trabalho, dentre os meios extratores empregados, aqueles baseados nos solventes mais verdes etanol e acetona foram os mais indicados para a extração dos resíduos de cultura de soja, obtidas do solo após colheita.

Para a resposta rendimento de extração, exceto para a extração de folhas, onde o EtOH puro levou ao maior rendimento, a adição de 20% de solução aquosa 0,1N de HCl aumentou o poder de extração de qualquer solvente orgânico aqui empregado. Além disto, no geral, a extrações de vagens e folhas apresentaram os maiores rendimentos de extração.

Para a resposta número de picos observado a 254 nm, foi possível concluir também que dentre os solventes puros, o etanol foi o que levou à extração das maiores quantidades de metabólitos com absorção em 254 nm em folhas e vagens de soja, seguido de acetona e, por último, de acetonitrila, um solvente considerado problemático do ponto de vista ambiental. Já para caules, a acetona mostrou-se o solvente capaz de extrair o maior número de compostos com tal característica estrutural, quando as médias de três extrações com cada solvente foram comparadas. Em todos os casos, notou-se grande incremento de picos quando 20% de solução aquosa 0,1N de HCl foram adicionados aos solventes orgânicos. Como o mesmo padrão foi verificado quando a resposta monitorada foi área total sob os picos de um cromatograma, foi possível concluir que a adição de 20% desta solução leva à extração de um maior número de compostos com absorção em 254 nm. Foi também possível verificar que dentre os três resíduos analisados, as folhas apresentaram o maior número de metabólitos com absorção neste comprimento de onda.

Concluiu-se também pela presença de isoflavonas comumente encontradas em grãos de soja, com elevado valor comercial e farmacêutico, em resíduos da cultura de soja. Nos extratos de folhas e caules, embora quantificações não tenham sido ainda realizadas, as isoflavonas daidzína e genisteína foram detectadas em níveis comparáveis aos encontrados nos grãos aqui utilizados como referência, conforme constatado em cromatogramas HPLC-ESI(+)/TOF/MS. Cabe destacar também que embora a isoflavona daidzina, encontrada nos extratos de grãos (referência), não tenha sido detectada em nenhum dos resíduos aqui

investigados, a isoflavona gliciteína foi identificada apenas em extratos de folhas, mostrando-se ausente ou em quantidades não detectáveis nos extratos de referência.

Considerando a disponibilidade, em massa, destes resíduos em um cultivo de soja, já que para 1000 toneladas de grãos processados são gerados 2700 toneladas de resíduos, bem como a ocorrência e intensidade de picos relativos à isoflavonas, conclui-se que folhas e caules coletados no solo logo após a colheita constituem-se em uma fonte abundante de isoflavonas de interesse farmacológico e comercial, como daidzeína, genisteína (em folhas e caules) e gliciteína (em folhas). Ainda, que estas isoflavonas poderiam ser extraídas com soluções constituídas por uma solução aquosa ácida e por etanol, um solvente considerado de baixo impacto ambiental, permitido em alimentos, amplamente produzido no Brasil a partir de fontes renováveis e por meio de processos fermentativos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRANKÓ, László; SZILVÁSSY, Blanka. Mass spectrometric profiling of flavonoid glycoconjugates possessing isomeric aglycones. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 50, n. 1, p. 71-80, 2015.

ANASTAS, P. T.; WARNER, J. C. Green chemistry. **Frontiers**, 1998.

ANASTAS, P. T.; KIRCHHOFF, M. M. Origins, Current Status, and Future Challenges of Green Chemistry. **Accounts of chemical research**, v. 35, n. 9, p. 686–694, 2002.

ANASTAS, P.; EGHBALI, N. Green Chemistry: Principles and Practice. **Chem. Soc. Rev.**, v. 39, n. 1, p. 301–312, 2010.

BOUE, Stephen M. et al. Identification of flavone aglycones and glycosides in soybean pods by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 991, n. 1, p. 61-68, 2003.

BOWLES, Simone; DEMIATE, Ivo Motin. Caracterização físico-química de okara e aplicação em pães do tipo francês. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 652-659, 2006.

CARVALHO, Ana CB et al. Situation of herbal medicines register in Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 314-319, 2008.

CASTRO, A. C. C. M. et al. Green coffee seed residue: A sustainable source of antioxidant compounds. **Food chemistry**, v. 246, p. 48-57, 2018.

CLARK, James H. Green chemistry: challenges and opportunities. **Green Chemistry**, v. 1, n. 1, p. 1-8, 1999.

CONAB, Acompanhamento da Safra Brasileira, V.3 – Safra 2015/16 – N.6 – Sexto levantamento, Março 2016. 140 p. Disponível em <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_03_10_09_17_17_boletim_graos_marco_2016.pdf> Acesso em 23 de março de 2016.

DO NASCIMENTO, H. T. S. et al. Subprodutos da agroindústria da soja na alimentação de ruminantes. **Embrapa Meio-Norte. Circular Técnica**, 2004.

FRITZ, Ria; RUTH, Wolfgang; KRAGL, Udo. Assessment of acetone as an alternative to acetonitrile in peptide analysis by liquid chromatography/mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 23, n. 14, p. 2139-2145, 2009.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, p. 178–182, 2005.

FUNARI, Cristiano S. et al. High resolution ultra high pressure liquid chromatography–time-of-flight mass spectrometry dereplication strategy for the metabolite profiling of Brazilian

Lippia species. **Journal of Chromatography A**, v. 1259, p. 167-178, 2012.

FUNARI, Cristiano S. et al. A trade off between separation, detection and sustainability in liquid chromatographic fingerprinting. **Journal of Chromatography A**, v. 1354, p. 34-42, 2014a.

FUNARI, Cristiano S. et al. Green chromatographic fingerprinting: an environmentally friendly approach for the development of separation methods for fingerprinting complex matrices. **Journal of separation science**, v. 37, n. 1-2, p. 37-44, 2014b.

FUNARI, Cristiano S. et al. Acetone as a greener alternative to acetonitrile in liquid chromatographic fingerprinting. **Journal of separation science**, v. 38, n. 9, p. 1458-1465, 2015.

FUNARI, Cristiano Soleo et al. On Track for a Truly Green Propolis□ Fingerprinting Propolis Samples from Seven Countries by Means of a Fully Green Approach. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 4, n. 12, p. 7110-7117, 2016.

GABER, Yasser et al. HPLC-EAT (Environmental Assessment Tool): a tool for profiling safety, health and environmental impacts of liquid chromatography methods. **Green Chemistry**, v. 13, n. 8, p. 2021-2025, 2011.

GRAHAM, Terrence L. Flavonoid and isoflavonoid distribution in developing soybean seedling tissues and in seed and root exudates. **Plant physiology**, v. 95, n. 2, p. 594-603, 1991.

GUILLARME, Davy et al. Method transfer for fast liquid chromatography in pharmaceutical analysis: application to short columns packed with small particle. Part I: isocratic separation. **European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics**, v. 66, n. 3, p. 475-482, 2007.

GUILLARME, Davy et al. Method transfer for fast liquid chromatography in pharmaceutical analysis: Application to short columns packed with small particle. Part II: Gradient experiments. **European Journal of Pharmaceuticals and Biopharmaceutics**, v. 68, n. 2, p. 430-440, 2008.

IPEA, Diagnóstico dos Resíduos Orgânicos do Setor Agrossilvopastoril e Agroindústrias Associadas – Relatório de Pesquisa, 2012. Disponível em <http://www.ipea.gov.br/agencia/images/stories/PDFs/relatoriopesquisa/120917_relatorio_residuos_organicos.pdf> Acesso em 19 de maio de 2016.

JACKSON, C.-JC et al. Effects of processing on the content and composition of isoflavones during manufacturing of soy beverage and tofu. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 10, p. 1117-1123, 2002.

JENG, Toong Long et al. Comparisons of flavonoids and anti-oxidative activities in seed coat, embryonic axis and cotyledon of black soybeans. **Food chemistry**, v. 123, n. 4, p. 1112-1116, 2010.

JOHNSON, Lawrence A.; WHITE, Pamela J.; GALLOWAY, Richard (Ed.). **Soybeans: chemistry, production, processing, and utilization**. Elsevier, 2015.

KHARE, S. K.; JHA, Krishna; GANDHI, A. P. Citric acid production from okara (soy-residue) by solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 54, n. 3, p. 323-325, 1995.

KIM, E. H. et al. Analysis of phenolic compounds and isoflavones in soybean seeds (*Glycine max* (L.) Merrill) and sprouts grown under different conditions. **European Food Research and Technology**, v. 222, n. 1-2, p. 201-208, 2006.

KIM, Eun-Hye et al. Analysis of isoflavone, phenolic, soyasapogenol, and tocopherol compounds in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] germplasms of different seed weights and origins. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, n. 23, p. 6045-6055, 2012.

KOLLER, Guntram; FISCHER, Ulrich; HUNGERBÜHLER, Konrad. Assessing safety, health, and environmental impact early during process development. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 39, n. 4, p. 960-972, 2000.

KUHN, Fabian et al. Differentiation of isomeric flavone/isoflavone aglycones by MS2 ion trap mass spectrometry and a double neutral loss of CO. **Rapid communications in mass spectrometry**, v. 17, n. 17, p. 1941-1949, 2003.

LENARDÃO, E. J. et al. "Green chemistry" - Os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 123-129, 2003.

LI, Yiwei et al. Induction of cancer cell death by isoflavone: the role of multiple signaling pathways. **Nutrients**, v. 3, n. 10, p. 877-896, 2011.

LIN, Yuguang et al. Soy protein enhances the cholesterol-lowering effect of plant sterol esters in cholesterol-fed hamsters. **The Journal of nutrition**, v. 134, n. 1, p. 143-148, 2004.

LIU, KeShun. **Soybeans: chemistry, technology, and utilization**. Springer, 2012.

MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. The systematic identification of flavonoids. 1970. In: **Library of Congress Catalog Card**. p. 41.

MALENČIĆ, Djordje; POPOVIĆ, Milan; MILADINOVIĆ, Jegor. Phenolic content and antioxidant properties of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) seeds. **Molecules**, v. 12, n. 3, p. 576-581, 2007.

MARCH, Raymond E. et al. A fragmentation study of an isoflavone glycoside, genistein-7-O-glucoside, using electrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry at high mass resolution. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 232, n. 2, p. 171-183, 2004

MATOS, A. T. Tratamento de resíduos agroindustriais: **Curso sobre tratamento de Resíduos Agroindustriais**. Fundação Estadual do Meio Ambiente. Viçosa-MG, 2005.

MESSINA, Mark; MESSINA, Virginia. The role of soy in vegetarian diets. **Nutrients**, v. 2, n. 8, p. 855-888, 2010.

MORTON, Lincoln W. et al. Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds: relevance to cardiovascular disease. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 27, n. 3, p. 152-159, 2000.

MOURAD, Anna L.; AMBROGI, Vinicius S.; GUERRA, Sinclair MG. Potencial de utilização energética de biomassa residual de grãos. **Proceedings of the 5th Encontro de Energia no Meio Rural**, 2004.

MURAKAMI, Shinichiro et al. Insect-induced daidzein, formononetin and their conjugates in soybean leaves. **Metabolites**, v. 4, n. 3, p. 532-546, 2014.

O'TOOLE, Desmond K. Characteristics and use of okara, the soybean residue from soy milk production a review. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 47, n. 2, p. 363-371, 1999.

PERLATTI, B.; FORIM, M. R.; ZUIN, V. G. Green chemistry, sustainable agriculture and processing systems: a Brazilian overview. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 1, n. 1, p. 5, 2014.

PRAT, D.; HAYLER, J.; WELLS, A. A survey of solvent selection guides. **Green Chemistry**, v. 16, p. 4546-4551, 2014.

PRAT, Denis et al. CHEM21 selection guide of classical-and less classical-solvents. **Green Chemistry**, v. 18, n. 1, p. 288-296, 2015.

QUEIROZ, Sonia CN; NOGUEIRA, Raquel Tassara; SCRAMIN, Shirlei. Importância dos fitoestrógenos, presentes na soja, para a saúde humana. **Jagauriuna: Embrapa-Meio Ambiente**, 2006.

SILVA, Maria Sebastiana et al. Composição química e valor protéico do resíduo de soja em relação ao grão de soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 571-576, 2006.

SINGH, Ajita V. et al. Soy phytochemicals prevent orthotopic growth and metastasis of bladder cancer in mice by alterations of cancer cell proliferation and apoptosis and tumor angiogenesis. **Cancer Research**, v. 66, n. 3, p. 1851-1858, 2006.

SNYDER, L. R.; GLAJCH, J. L.; KIRKLAND, J. J. **Practical CLAE method development**. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 1997.

SONG, Hyuk-Hwan et al. Metabolomics investigation of flavonoid synthesis in soybean leaves depending on the growth stage. **Metabolomics**, v. 10, n. 5, p. 833-841, 2014.

SZYMCZAK, Grażyna et al. Evaluation of isoflavone content and antioxidant activity of selected soy taxa. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 57, p. 40-48, 2017.

TCHOUMTCHOUA, Job et al. Structure-oriented UHPLC-LTQ Orbitrap-based approach as a dereplication strategy for the identification of isoflavonoids from *Amphimas pterocarpoides* crude extract. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 48, n. 5, p. 561-575, 2013..

TOBISZEWSKI, Marek. Metrics for green analytical chemistry. **Analytical Methods**, v. 8, n. 15, p. 2993-2999, 2016.

TOBISZEWSKI, M.; NAMIEŚNIKA, J.; PENA-PEREIRA, F. Environmental risk – based ranking of solvents by the combination of multimedia model and multi-criteria decision analysis. **Green Chemistry**, v. 19, p. 1034–1042, 2017.

TYUG, Tan Seok; PRASAD, K. Nagendra; ISMAIL, Amin. Antioxidant capacity, phenolics and isoflavones in soybean by-products. **Food chemistry**, v. 123, n. 3, p. 583-589, 2010.

UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAM - DIVISION OF TECHNOLOGY, I. AND E. **Converting Waste Agricultural Biomass into a Resource** United Nations Environmental Programme. Osaka/Shiga: [s.n.]. Disponível em: <http://www.unep.org/ietc/Portals/136/Publications/WasteManagement/WasteAgriculturalBiomassEST_Compndium.pdf>.

WANG, Huei-ju; MURPHY, Patricia A. Isoflavone content in commercial soybean foods. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 42, n. 8, p. 1666-1673, 1994.

WELCH, Christopher J. et al. Greening analytical chromatography. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 7, p. 667-680, 2010.

YI, Mi; KWON, Tai-Wan; KIM, Jong-Sang. Changes in isoflavone contents during maturation of soybean seed. **Preventive Nutrition and Food Science**, v. 2, n. 3, p. 255-258, 1997.