

Documentos

ISSN 1517-5111 **90**
Novembro, 2012

**Quantificação de ácidos
fenólicos constitutivos
da soja [*Glycine max* (L.)
Merril] por cromatografia
líquida de alta eficiência
(CLAE)**





ISSN 1516-4691
Novembro, 2012

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 90

Quantificação de ácidos fenólicos constitutivos da soja [*Glycine max* (L.) *Merrill*] por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

*Rosa T. S. Frighetto
Melissa Baccan*

Embrapa Meio Ambiente
Jaguariúna, SP
2012

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Meio Ambiente

Rodovia SP 340 Km 127,5 - Tanquinho Velho
Caixa Postal 69
CEP 13820-000 Jaguariúna, SP
Fone: (19) 3311-2650
Fax: (19) 3311-2640
<http://www.cnpma.embrapa.br>
sac@cnpma.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: *Ladislau Araújo Skorupa*
Secretária-Executiva: *Vera Lúcia S. S. de Castro*
Secretária: *Melissa Sittton*
Bibliotecário: *Victor Paulo Marques Simão*
Membro Nato: *Marcelo Augusto Boechat Morandi*
Membros: *Lauro Charlet Pereira, Fagoni Fayer Calegario, Aline de Holanda Nunes Maia, Nilce Chaves Gattaz, Marco Antonio Ferreira Gomes e Rita Carla Boeira*
Editoração eletrônica: *Alexandre Rita da Conceição*
Revisão de texto: *Nilce Chaves Gattaz*
Normalização Bibliográfica: *Victor Paulo Marques Simão*

1ª edição eletrônica (2012)

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Meio Ambiente**

Frighetto, Rosa T. S.

Quantificação de ácidos fenólicos constitutivos da soja [Glycine max (L.) Merrill] por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) / Melissa Baccan, Rosa T. S. Frighetto. – Jaguariúna, SP : Embrapa Meio Ambiente, 2012.

17 p. — (Documentos / Embrapa Meio Ambiente; 90).

1. Ácidos fenólicos 2. Soja 3. Cromatografia líquida de alta eficiência. I. Baccan, Melissa. II. Frighetto, Rosa T. S. III. Título. IV. Série.

CDD 543.0894

© Embrapa 2012

Autores

Rosa T. S. Frighetto

Química, Doutora em Química orgânica, Embrapa Meio Ambiente, Rod. SP 340, km 127,5 - Caixa Postal 69, Tanquinho Velho, 13.820-000 Jaguariúna, SP.
rosa.frighetto@embrapa.br

Melissa Baccan

Química e Engenheira de Alimentos, Embrapa Meio Ambiente, Rod. SP 340, km 127,5 - Caixa Postal 69, Tanquinho Velho, 13.820-000 Jaguariúna, SP.
melissa.baccan@embrapa.br

Sumário

Introdução	06
Material e Métodos	08
Preparo das soluções	08
Obtenção de ácidos livres em amostras de folhas	09
Condições de análise por CLAE	09
Resultados e Discussão	10
Conclusão	13
Agradecimentos	13
Referências bibliográficas	14

Quantificação de ácidos fenólicos constitutivos da soja [*Glycine max* (L.) Merrill] por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

*Rosa T. S. Frighetto
Melissa Baccan*

1. Introdução

Mais de 8000 compostos fenólicos de origem vegetal são conhecidos na literatura, e estes compostos pertencem a diferentes grupos, tais como flavonóides, taninos, ácidos fenólicos e cumarinas. Os ácidos fenólicos podem ser classificados em dois subgrupos, dependendo da base do esqueleto carbônico de origem, sendo os derivados de ácido cinâmico e de ácido benzóico (LUTHRIA et al., 2006).

As plantas expostas à radiação solar, em particular a radiação UV-B, respondem através da produção de compostos capazes de absorver essa radiação. Esses compostos pertencem, comumente, a dois principais grupos: flavonóides e ácidos hidroxicinâmicos (HCA), ambos são produzidos pela via de fenilpropanóide. Os ácidos HCA mais comuns em folhas de plantas são os ácidos p-cumárico (ácido 4-hidroxicinâmico), caféico (ácido 3,4-dihidroxicinâmico) e ferúlico (ácido 4-hidroxi-3-metoxicinâmico), e em menor concentração o ácido sinápico (ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinâmico) (RUHLAND et al., 2005). A quantidade e a composição dos compostos fenólicos presentes em vegetais são influenciadas pelo genótipo e época cultivada (HOWARD et al., 2003) e pelas condições ambientais em que são produzidos (ROBINSON; BRITZ, 2000; CALDWEL et al., 2005). As

condições de armazenamento (ASAMI et al., 2003) e os parâmetros de extração influenciam nas variáveis químicas do extrato (HINNEBURG; NEUBERT, 2005; MUKHOPADHYAY et al., 2006). Os ácidos fenólicos, dentre a gama de compostos fenólicos, têm atraído interesse por apresentar comprovada ação antioxidante e como potenciais substitutos de antioxidantes sintéticos na indústria alimentícia (SOARES, 2002), além de os ácidos ferúlico e caféico demonstrarem ação protetora contra danos na pele induzidos pela radiação ultravioleta (SAIJA et al., 1999).

As principais formas de interação molecular na parede celular das plantas são através de ligações éster e éter com os carboidratos e unidades condensadas de lignina (CAMPBELL; ELLIS, 1992). Essas ligações são quebradas por hidrólise alcalina para disponibilizar os ácidos na sua forma livre e permitir sua extração por solvente orgânico.

Os métodos de análise desses compostos, para terem aplicabilidade numa rotina de laboratório, necessariamente, devem ser robustos e fornecer dados quantitativos (ROBBINS; BEAN, 2004). Diversos métodos estão disponíveis nas literaturas (LIU et al., 2000; NARDINI et al., 2002; RUHLAND et al., 2005; LUTHRIA et al., 2006), com variações atreladas ao material vegetal em análise, à concentração da base utilizada, à temperatura e ao tempo de hidrólise. O desafio na análise de ácidos fenólicos é devido à complexidade estrutural em que esses compostos estão presentes, isto é, na forma livre, esterificada, glicosilada ou polimerizada (ROBBINS, 2003), e ainda pode coexistir formando complexos com proteínas, carboidratos, lipídeos ou outros componentes do vegetal.

O escopo do presente trabalho é a disponibilização de um método de análise para a determinação quantitativa de ácidos fenólicos constitutivos das folhas de soja. O método é uma adaptação baseada em Evaristo e Leitão (2001) para mistura da fase móvel e o comprimento de onda determinado por Ruhland et al (2005).

Material e Métodos

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico: solução NaOH 2 M; NaCl; ácido ascórbico; EDTA; solução HCl 7 M; acetato de etila grau HPLC; ácido fórmico 1%; metanol grau HPLC; e padrões (Sigma) dos ácidos p-cumárico (pureza não especificada), caféico (pureza 97%), e ferúlico (pureza 98%). Material e vidraria: pipeta volumétrica; unidade filtrante HV em PE com membrana durapore, 0,45 μm de poro, 13mm, fêmea luer lok, macho luer slip. Equipamentos: balança analítica (Ohaus modelo Adventurer); banho de ultrassom (Branson 2210); centrífuga de bancada (Excelsa II modelo 206B); estufa com circulação de ar; sistema de purificação de água para produção de água ultrapura (Millipore modelo Direct-Q, UV 3); sistema CLAE (Agilent modelo 1100 Series), que consiste de sistema de controle (programa computacional Chem Station), bomba, amostrador automático, detector UV-VIS, e coluna C-18 Partisil 5 ODS-2, fase reversa (Whatman 4,6 x 250 mm, 5 μm); vortex para tubos de ensaio (Thermolyne modelo max mix1).

Preparo das soluções:

Solução NaOH 2M contendo 1% de ácido ascórbico e 10 mM de EDTA

Dissolver 8,0 g de NaOH; 1,0 g de ácido ascórbico; 0,38 g de EDTA em cerca de 70 mL de água destilada, com o auxílio do ultrassom; transferir para balão volumétrico âmbar de 100 mL e completar o volume com água destilada.

Solução HCl 7M

Sendo a densidade do ácido 1190 g/L e pureza 37%, pipetar 29 mL do ácido e gotejar sobre água destilada em balão volumétrico de 50 mL e completar o volume.

Solução de padrões

Foram preparadas as soluções estoques na concentração de 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em etanol, e as soluções de trabalho foram preparadas pelas diluições das mesmas.

Obtenção de ácidos livres em amostras de folhas:

As amostras (folhas) foram coletadas no campo, lavadas em água corrente, secas em estufa com circulação de ar (72h, a 50°C), pulverizadas em almofariz e transferidas para frascos âmbar. Pesou-se 0,2 g de amostra, adicionou-se uma mistura de 5 mL da solução NaOH 2M contendo 1% de ácido ascórbico e 10 mM de EDTA e em seguida procedeu-se à hidrólise básica por 60 minutos a 61-63°C. Sem resfriar a solução, acidificou-se com 1,5 mL de HCl 7M, submeteu-se a agitação em vortex por 5-10 s e deixou-se resfriando até a temperatura ambiente e posteriormente centrifugou-se por 10 min, a 2700 rpm. O sobrenadante foi extraído com acetato de etila, 2 x 6,5 mL, primeiramente no vortex por 30 s, seguida de 5 min no ultrassom. Quando necessário, devido à formação de emulsão, adicionaram-se gotas de solução saturada de NaCl (solução aquosa de NaCl ~ 26%). As fases orgânicas foram combinadas e evaporadas até a secura sob nitrogênio. O resíduo foi retomado em 2 mL da mistura metanol:água (75:25), levado ao ultrassom por 5 minutos e filtrado através de membrana filtrante de 0,45 μm , acoplada a uma seringa.

Condições de análise por CLAE:

A separação dos componentes e sua quantificação foram realizadas no equipamento Agilent modelo 1100 Series, equipado com detector UV-Vis, coluna C-18 Partisil 5 ODS-2, fase reversa (4,6 x 250 mm, 5 μm) e volume de injeção de 10 μL por amostrador automático. Foi utilizado o comprimento de onda de 320 nm no detector, e vazão de 0,8 mL.min⁻¹, para quantificação dos ácidos caféico, p-cumárico e ferúlico. As concentrações dos três ácidos fenólicos nos extratos foram determinadas em relação à curva dos padrões externos na faixa de 5 a 150 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. As curvas de calibração foram estabelecidas baseadas na correlação linear entre a concentração dos padrões e a área dos picos correspondentes aos ácidos. Todas as amostras foram analisadas em triplicata. A fase móvel foi constituída de ácido fórmico 1% em água ultrapura (A) e metanol (B), segundo Evaristo e Leitão (2001), conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1. Gradiente de solventes utilizado na separação e quantificação de ácidos fenólicos por CLAE.

Tempo (min)	Fase móvel A (%)	Fase móvel B (%)
0	95	5
10	75	25
20	60	40
30	50	50
40	0	100
45	95	5

Amostras fortificadas foram preparadas para os estudos de recuperação, adicionando-se 1 mL das soluções dos padrões 50, 100 e 150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cada um dos ácidos, em triplicata, a 0,2 g de amostras. As amostras foram homogeneizadas e todas as etapas posteriores foram feitas segundo o procedimento descrito anteriormente.

Resultados e Discussão

As análises de ácidos fenólicos nas folhas de soja congeladas e moídas sob nitrogênio líquido, imediatamente após a sua coleta, resultaram em dados que apresentaram inconsistências na recuperação, verificadas através das amostras fortificadas. A razão principal dessa dificuldade pode estar na hidrólise parcial das ligações éster e éter dos ácidos com a lignina e hemicelulose da parede celular, pelas condições brandas (NaOH 2M a 41-43°C) utilizadas na extração (SUN et al., 2002; DU; YU, 2011), além da presença de água no material vegetal que contribui pela formação de emulsões. Diante disso, a simples secagem das amostras em estufa minimizou a formação de emulsão. Os compostos fenólicos ligados à parede celular foram liberados por hidrólise com NaOH 2M, e verificou-se que a temperatura e o tempo de hidrólise são os dois fatores que influenciaram na extração (Tabela 2). Para esta leguminosa, o uso de NaOH 2M e aquecimento a 61-63°C por uma hora produziram melhores resultados. Foram adicionados ácido

ascórbico e EDTA para prevenir a degradação dos ácidos durante a hidrólise (NARDINI et al., 2002). As hidroxilas fenólicas, normalmente, estão na forma ionizada e as moléculas são solúveis em água na condição alcalina; então a acidificação com HCl 7M tornam-as solúveis em solvente orgânico pela protonação dessa parte da molécula, e permite sua extração com acetato de etila.

Para determinar as eficiências de recuperação, três concentrações de cada um dos padrões foram acrescentadas (chamada também de fortificação das amostras), em triplicatas e extraídas seguindo o procedimento definido anteriormente. Desta forma, as eficiências de extração determinadas foram de 91,8 a 97,1% para o ácido cafêico, 72,3 a 81,3% para o ácido p-cumárico, e 103,6 a 115,5% para o ácido ferúlico.

Tabela 2. Variação dos teores de ácidos fenólicos nos extratos de folhas de soja em função da temperatura e do tempo de hidrólise.

Tempo(min)	<i>Ácido cafêico</i> [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\pm\text{dp}$]		<i>Ácido cumárico</i> [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\pm\text{dp}$]		<i>Ácido ferúlico</i> [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\pm\text{dp}$]	
	temperatura		temperatura		temperatura	
	41-43°C	61-63°C	41-43°C	61-63°C	41-43°C	61-63°C
30'	691,1 \pm 52		299,1 \pm 9		930,6 \pm 36	
60'	650,6 \pm 15	727,5 \pm 8	432,2 \pm 17	378,1 \pm 6	961,9 \pm 16	1030,9 \pm 1
90'	734,1 \pm 18		397,2 \pm 2		1049,1 \pm 15	

dp=desvio padrão

A identificação dos ácidos ocorreu pela comparação dos tempos de retenção com os dos padrões, em comprimento de onda a 320 nm (RUHLAND et al., 2005). A Figura 1 mostra o cromatograma da mistura dos padrões na concentração de $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Quantificação de ácidos fenólicos constitutivos da soja [*Glycine max* (L.) Merrill] por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

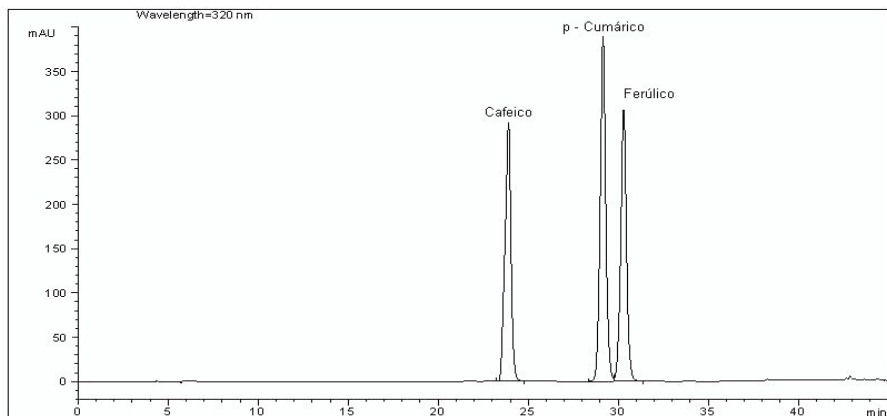


Figura 1. Cromatograma da mistura dos padrões de ácidos caféico, p-cumárico e ferúlico obtido por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em comprimento de onda a 320 nm. Coluna: C-18 Partisil 5 ODS-2, fase reversa (4,6 x 250 mm, 5 μ m; Whatman).

Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) foram determinados (em $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) de acordo com as equações $\text{LOD} = 3 \times (\text{razão S/R})$ e $\text{LOQ} = 10 \times (\text{razão S/R})$, onde S é a altura do sinal e R é a altura do ruído das respectivas curvas. Assim, os valores encontrados foram: $0,3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (LOD e LOQ) para o ácido caféico, e de $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (LOD) e $0,3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (LOQ) para os ácidos p-cumárico e ferúlico.

A curva analítica dos três ácidos apresentou linearidade na faixa de $0,3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ a $5,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ adotada para o trabalho, com coeficientes de determinação $r^2 \geq 0,999$ para os três analitos.

O método analítico foi aplicado em 18 amostras de folhas de soja coletadas no campo experimental, para cada período agrícola entre 2010 e 2011, dos quais resultados de quatro amostras são apresentados como exemplos de aplicabilidade (Tabela 3). Nas análises de rotina pode-se confirmar que os resultados encontrados para o ácido ferúlico apresentaram maior variabilidade entre as análises, que segundo Sun et al (2002) se deve à hidrólise parcial das ligações éster e éter entre o ácido e os componentes da parede celular do vegetal.

Tabela 3. Concentrações médias dos ácidos caféico, p-cumárico e ácido ferúlico, em triplicata, nas folhas de soja provenientes dos experimentos em campo.

Amostras	Ácido caféico [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1} \pm \text{dp}$]	Ácido p-cumárico [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1} \pm \text{dp}$]	Ácido ferúlico [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1} \pm \text{dp}$]
1	183,1 \pm 1,7	355,4 \pm 0,7	639,9 \pm 2,9
2	578,5 \pm 2,5	278,0 \pm 8,4	833,4 \pm 11,8
3	276,7 \pm 9,8	197,9 \pm 3,3	521,8 \pm 8,0
4	109,2 \pm 1,4	211,3 \pm 1,1	480,9 \pm 4,2

dp=desvio padrão

Conclusão

As melhores condições encontradas para extração dos ácidos fenólicos das folhas de soja (leguminosa) foram pelo emprego de NaOH 2M a 60°C por 1 hora.

O presente método de extração dos ácidos fenólicos e as condições de análise por CLAE para os três ácidos hidroxicinâmicos são passíveis de serem usados na rotina de análise de folhas de soja.

Agradecimentos

À assistente de pesquisa Dagmar Nunes dos Santos Oliveira e à estagiária Lídia Cristina Sávi (ETECAP-Química) pela colaboração e apoio nas análises.

Referências

ASAMI, D.K.; HONG, Y.J.; BARRET, D.M.; MITCHELL, A.E. Processing-induced changes in total phenolics and procyanidins in clingstone peaches. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 83, n. 1, p. 56-63, 2003.

CALDWELL, A.; BRITZ, S.J.; MIRECKI, R.M. Effect of temperature, elevated carbon dioxide, and drought during seed development on the isoflavone content of dwarf soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] grown in controlled environments. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 53, n. 4, p. 1125-1129, 2005.

CAMPBELL, M. M.; ELLIS, B. E. Fungal elicitor-mediated responses in pine cell cultures: cell wall-bound phenolics. **Phytochemistry**, New York, v. 31, n. 3, p. 737-742, 1992.

DU, L.; YU, P. Relationship of physicochemical characteristics and hydrolyzed hydroxycinnamic acid profile of barley varieties and nutrient availability in ruminants. **Journal of Cereal Science**, London, v. 53, n. 2, p. 178-187, 2011.

EVARISTO, I.M.; LEITÃO, M. C. Identificação e quantificação por DAD-HPLC, da fração fenólica contida em folhas de *Quercus suber* L. **Silva Lusitana**, Oeiras, v. 9, n. 2, p. 135-141, 2001.

HINNEBURG, I.; NEUBERT, R.H. Influence of extraction parameters on the phytochemical characteristics of extracts from buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) herb. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 53, n. 1, p. 3-7, 2005.

HOWARD, L.R.; CLARK, J.R.; BROWNMILLER, C. Antioxidant capacity and phenolic content in blueberries as affected by genotype and growing season. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 83, n. 12, p. 1238-1247, 2003.

LIU, F.; ANG, C.; SPRINGER, D. Optimization of extraction conditions for active components in *Hypericum perforatum* using response surface methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 48, n. 8, p. 3364-3371, 2000.

LUTHRIA, D.L.; MUKHOPADHYAY, S.; KRIZEK, D.T. Content of total phenolics and phenolic acids in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruits as influenced by cultivar and solar UV radiation. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 19, n. 8, p. 771-777, 2006.

MUKHOPADHYAY, S.; LUTHRIA, D.L.; ROBBINS, R.J. Optimization of extraction process for phenolic acid from black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) by pressurized liquid extraction. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 86, n. 1, p. 156-162, 2006.

NARDINI, M.; CIRILO, E.; NATELLA, F.; MENCARELLI, D.; COMISSO, A.; SCACCINI, C. Detection of bound phenolic acids: prevention by ascorbic and ethylenediamine tetraacetic acid of degradation of phenolic acids during alkaline hydrolysis. **Food Chemistry**, Essex, v. 79, n. 1, p.119-124, 2002.

ROBBINS, R. J. Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 51, n. 10, p. 2866-2887, 2003.

ROBBINS, R. J.; BEAN, S. R. Development of a quantitative high-performance liquid chromatography-photodiode array detection measurement system for phenolic acids. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1038, n. 1-2, p. 97-105, 2004.

ROBINSON, J.M.; BRITZ, S.J. Tolerance of a field grown soybean cultivar to elevated ozone level is concurrent with higher leaflet ascorbic acid level, higher ascorbate-dehydroascorbate redox status, and long term photosynthetic productivity. **Photosynthesis Research**, Dordrecht, v. 64, n. 1, p. 77-87, 2000.

RUHLAND, C. T.; XIONG, F.S.; CLARK, W.D.; DAY, T.A. The influence of ultraviolet-B radiation on growth, hydroxycinnamic acids and flavonoids of *Deschampsia antarctica* during springtime ozone depletion in Antarctica. **Photochemistry and Photobiology**, Oxford, v. 81, n. 5, p. 1086-1093, 2005.

SAIJA, A.; TOMAINO, A.; CASCIO, R. Lo; TROMBETTA, D.; PROTEGGENTE, A.; PASQUALE, A. De; UCCELLA, N.; BONINA, F. Ferulic and caffeic acids as potential protective agents against photooxidative skin damage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 79, n. 3, p. 476-480, 1999.

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SUN, R.; SUN, X.F.; WANG, S.Q.; ZHU, W.; WANG, X.Y. Ester and ether linkages between hydroxycinnamic acids and lignins from wheat, rice, rye, and barley straws, maize stems, and fast-growing poplar wood. **Industrial Crops Products**, v. 15, n. 3, p. 179-188, 2002.

Embrapa

Meio Ambiente

Ministério da
**Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

GOVERNO FEDERAL
BRASIL
PAÍS RICO É PAÍS SEM POBREZA