

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Instrumentação Agropecuária
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

**Rede de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio
Anais do V Workshop 2009**

**Odílio Benedito Garrido de Assis
Wilson Tadeu Lopes da Silva
Luiz Henrique Capparelli Mattoso
Editores**

**Embrapa Instrumentação Agropecuária
São Carlos, SP
2009**

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Instrumentação Agropecuária

Rua XV de Novembro, 1452
Caixa Postal 741
CEP 13560-970 - São Carlos-SP
Fone: (16) 2107 2800
Fax: (16) 2107 2902
<http://www.cnpdia.embrapa.br>
E-mail: sac@cnpdia.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Dr. Luiz Henrique Capparelli Mattoso
Membros: Dra. Débora Marcondes Bastos Pereira Milori,
Dr. João de Mendonça Naime,
Dr. Washington Luiz de Barros Melo
Valéria de Fátima Cardoso
Membro Suplente: Dr. Paulo Sérgio de Paula Herrmann Junior

Supervisor editorial: Dr. Victor Bertucci Neto
Normalização bibliográfica: Valéria de Fátima Cardoso
Capa: Manoela Campos e Valentim Monzane
Imagem da Capa: Imagem de AFM de nanofibra de celulose - Rubens Bernardes Filho
Editoração eletrônica: Manoela Campos e Valentim Monzane

1ª edição

1ª impressão (2009): tiragem 200

Todos os direitos reservados.

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

**CIP-Brasil. Cataiogação-na-publicação.
Embrapa Instrumentação Agropecuária**

Anais do V Workshop da rede de nanotecnologia aplicada ao
agronegócio 2009 - São Carlos: Embrapa Instrumentação
Agropecuária, 2009.

Irregular
ISSN: 2175-8395

I. Nanotecnologia - Evento. I. Assis, Odílio Benedito Garrido de.
II. Silva, Wilson Tadeu Lopes da. III. Mattoso, Luiz Henrique
Capparelli. IV. Embrapa Instrumentação Agropecuária

© Embrapa 2009



DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS VOLTAMÉTRICOS PARA DETERMINAÇÃO DE RUTINA E GENISTEÍNA EM GRÃOS E FOLHAS DE SOJA

Jonatas G. da Silva^{1,2}, Mariana R. L. e Silva^{1,2}, Aline C. de Oliveira^{3,4}, Maria Carolina B. Moraes¹, Luzia Helena C. Lima¹, Jurandir R. de Souza², Lúcia Helena Mascaro⁴, Carlos M. P. Vaz³ e Clarissa S. P. de Castro^{1*}

¹Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, CP 2372, CEP 70.770-917, Brasília DF

²Instituto de Química, Universidade de Brasília, CP 4394, CEP 70.919-970, Brasília DF

³Embrapa Instrumentação Agropecuária, CP 741, CEP 13.560-970, São Carlos SP

⁴Departamento de Química UFSCar, CP 676, CEP 13.565-905, São Carlos - SP

*clarissa@cenargen.embrapa.br

Projeto Componente: PC2

Plano de Ação: 01.05.1.001.02.02

Resumo

A rutina e a genisteína são metabólitos secundários que atuam no sistema de defesa da soja contra insetos-praga. Neste trabalho, dois métodos voltamétricos, empregando os eletrodos de mercúrio (HMDE) e de carbono vítreo e as técnicas voltamétricas de pulso diferencial e de redissolução catódica, foram desenvolvidos para a determinação de rutina e genisteína. Os métodos desenvolvidos apresentaram baixos limites de detecção e quantificação, boa repetibilidade e sensibilidade, tornando-se excelentes alternativas para a determinação de rutina e genisteína em grãos e folhas de soja.

Palavras-chave: rutina, genisteína, soja, eletrodo de mercúrio, eletrodo de carbono vítreo, voltametria.

Introdução

A soja é a oleaginosa mais produzida e consumida no mundo. Uma das conseqüências das grandes áreas cultivadas com soja está relacionada ao aumento de pragas. Nos últimos anos, o desenvolvimento de cultivares de soja resistentes tem sido uma ferramenta alternativa para controle de pragas em substituição aos inseticidas químicos. Um dos principais responsáveis pela resistência da soja a insetos-praga são os metabólitos secundários, principalmente os flavonóides (PIUBELI et al., 2005; ZHU e PARK, 2005). O desenvolvimento de métodos para a determinação destes metabólitos, em diferentes tecidos das plantas de soja, poderá fornecer dados relevantes sobre como esses compostos são usados no meio ambiente pelas

plantas na defesa contra insetos-praga. Atualmente os métodos de cromatografia líquida e de espectrometria de massas têm sido utilizados na determinação de flavonóides; porém, esses métodos são de alto custo, exigem processos laboriosos de preparação de amostra e muitas vezes não preservam a forma química de como esses compostos são encontrados na planta. Os métodos eletroquímicos superam essas desvantagens, pois são métodos não destrutivos, de baixo custo, de alta sensibilidade; podendo ser levados para o campo e por essa razão têm sido aplicados na determinação de flavonóides em suco, chá, medicamentos e fluidos biológicos utilizando eletrodos de mercúrio e carbono (TEMERK et al., 2006; ENSAFI e HAJJAN, 2006). O presente trabalho tem como objetivo desenvolver métodos para a determinação dos flavonóides rutina

e genisteína (Fig. 1) em grãos e folhas de soja, empregando os eletrodos de mercúrio (HMDE) e de carbono vítreo (GC) e as técnicas voltamétricas de pulso diferencial (DPV) e de redissolução catódica (CSV).

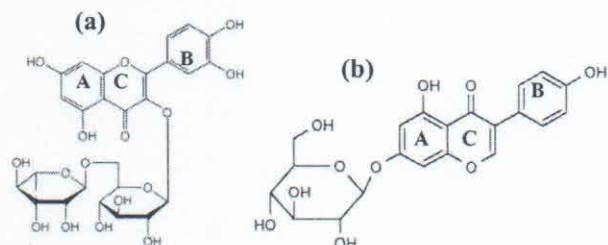


Fig.1. Estruturas Químicas dos flavonóides Rutina (a) e Genisteína (b).

Materiais e métodos

Todas as medidas voltamétricas foram realizadas em triplicata, utilizando-se o analisador voltamétrico Metrohm 797 e uma célula eletroquímica composta pelos eletrodos GC ou HMDE (trabalho), Ag/AgCl (KCl 3 mol L⁻¹) (referência) e platina (auxiliar). As soluções padrão de rutina e genisteína foram preparadas em uma mistura etanol-água 1:1 (v/v). Inicialmente foram otimizados os parâmetros voltamétricos e as condições experimentais dos métodos: eletrólito suporte, potencial de deposição, amplitude de pulso, velocidade de varredura, tempo de deposição e concentração de Cu(II). Em seguida foram obtidas as curvas analíticas pelo método de adição de padrão para cada um dos métodos.

Resultados e discussão

Foram desenvolvidos dois métodos voltamétricos para a determinação de rutina e genisteína em grãos e folhas de soja.

O primeiro método, onde se utilizou a CSV e o HMDE para a determinação de rutina, baseia-se no aparecimento de um sinal ($E = -0,150$ V) nos voltamogramas (Fig. 2) que corresponde ao processo de redução do complexo formado entre os íons Cu(II) e a rutina.

Os parâmetros voltamétricos e as condições experimentais otimizadas para a determinação de rutina utilizando-se a CSV e o HMDE são mostrados na Tabela 1.

A curva analítica (Fig. 2, inserção), para a rutina, apresentou a equação I_{pc} (nA) = $10,07 + 1,86 \times 10^8$ [Rutina] ($r = 0,9999$) e linearidade entre $1,96 \times 10^{-7}$ a $1,35 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, com limite de detecção $7,00 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹ e limite de quantificação

$2,20 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹, calculados a partir de: $LD = 3Sb/b$; $LQ = 10Sb/b$, onde Sb é o desvio padrão das medidas do branco e b é a inclinação da curva analítica.

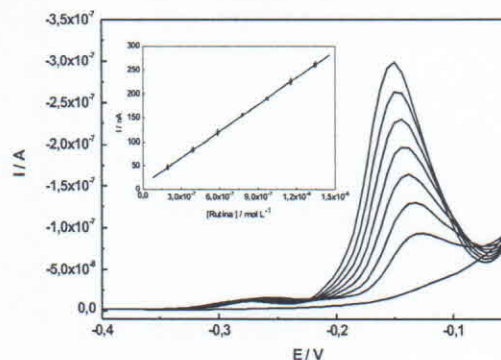


Fig. 2. Voltamogramas de redissolução catódica de pulso diferencial para 160 L de Cu(II) 1×10^{-4} mol L⁻¹ em 10 mL de tampão fosfato pH = 6,00 com adições sucessivas de 20 L de Rutina 1×10^{-4} mol L⁻¹. $E_d = -1,0$ V, $t_d = 180$ s, $E_i = 0,1$ V; $E_f = -0,4$ V, $v = 0,050$ V s⁻¹, Eletrodo de trabalho: HMDE, Eletrodo de referência: Ag/AgCl (KCl 3 mol L⁻¹).

Tabela 1. Parâmetros voltamétricos e condições experimentais otimizadas para a determinação de rutina utilizando-se a CSV e o HMDE.

Parâmetros	Rutina
Eletrólito suporte Tampão	Fosfato pH 6,00
Potencial de deposição	- 1,0 V
Amplitude do pulso	70 mV
Velocidade de varredura	50 mV s ⁻¹
Tempo de deposição	180 s
Concentração de Cu(II)	$1,57 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹

O segundo método, onde se utilizou a DPV e o GC para a determinação de rutina e genisteína, baseia-se no aparecimento de um sinal ($E = 0,250$ V- Fig 3; $E = 0,580$ V- Fig.4) nos voltamogramas (Figs. 3 e 4) que corresponde ao processo de oxidação dos grupos hidroxilas dos anéis B de ambos os flavonóides.

Os parâmetros voltamétricos e as condições experimentais otimizadas para a determinação de rutina e genisteína utilizando-se a DPV e o GC são mostrados na Tabela 2.

O estudo para repetibilidade de resposta do eletrodo de GC para a determinação de rutina e genisteína apresentou RSD menor que 2% ($n=10$). A Figura 3 apresenta os voltamogramas de pulso diferencial obtidos para rutina no intervalo de concentração de $1,96 \times 10^{-6}$ a $4,78 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ e equação I_{pa} (nA) = $-297,79 + 2,66 \times 10^8$ [Rutina] ($r = 0,9991$) (Fig. 3, inserção), com LD $2,06 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e LQ $6,85 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹.

O método desenvolvido para a determinação de rutina, empregando o HMDE e a CSV, apresentou limite de detecção mais baixo que o método utilizando o eletrodo de GC e a DPV.

A Figura 4 apresenta os voltamogramas de pulso diferencial obtidos para genisteína no intervalo de concentração de $9,90 \times 10^{-7}$ a $6,57 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ e equação $I_{pa}(\text{nA}) = -2,55 + 5,89 \times 10^7 [\text{Genisteína}]$, com coeficiente de correlação de 0,9989 (Fig. 4, inserção) e LD $5,89 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e LQ $1,95 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹.

Observou-se que os potenciais de oxidação da rutina (0,25V) e da genisteína (0,58V) são diferentes, possibilitando uma possível determinação dos dois flavonóides em uma única varredura utilizando o segundo método.

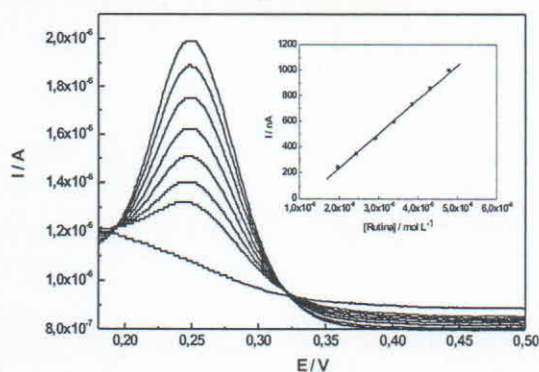


Fig. 3. Voltamogramas de pulso diferencial em 10 mL de tampão fosfato pH = 7,00 com adições sucessivas de 20 L de rutina 1×10^{-4} mol L⁻¹. $E_i = 0,15\text{V}$; $E_f = 0,6\text{V}$, $v = 0,005\text{V s}^{-1}$, Eletrodo de trabalho: GC, Eletrodo de referência: Ag/AgCl (KCl 3 mol L⁻¹).

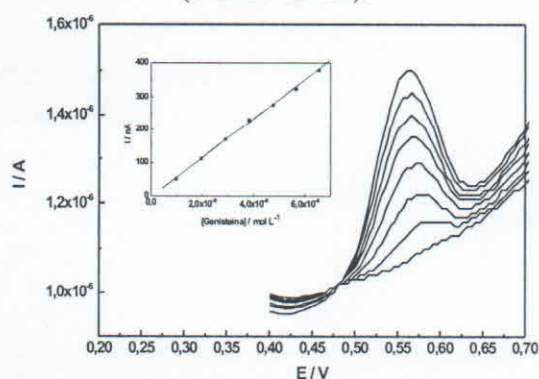


Fig. 4. Voltamogramas de pulso diferencial em 10 mL de tampão fosfato pH = 7,00 com adições sucessivas de 100 L de genisteína 1×10^{-4} mol L⁻¹. $E_i = 0,4\text{V}$; $E_f = 0,7\text{V}$, $v = 0,005\text{V s}^{-1}$, Eletrodo de trabalho: GC, Eletrodo de referência: Ag/AgCl (KCl 3 mol L⁻¹).

Os métodos desenvolvidos estão sendo aplicados na determinação de rutina e genisteína em grãos e folhas de diferentes cultivares de soja (IAC 100, Sylvania, BRQ-903065 e Dowling).

Tabela 2. Parâmetros voltamétricos e condições experimentais otimizadas para a determinação de rutina e genisteína utilizando-se a DPV e o GC.

Parâmetros	Rutina	Genisteína
Eletrolito suporte	Tampão Fosfato pH 7,00	Tampão Fosfato pH 6,00
Amplitude do pulso	50 mV	50 mV
Velocidade de varredura	5 mV s ⁻¹	50 mV s ⁻¹

Conclusões

Os métodos voltamétricos desenvolvidos para a determinação de rutina e genisteína, utilizando os eletrodos HMDE e GC e as técnicas CSV e DPV, apresentaram boa sensibilidade e baixos limites de detecção e quantificação, tornando-se excelentes alternativas para a determinação desses flavonóides em uma única varredura em grãos e folhas de soja. Os primeiros resultados da aplicação dos métodos desenvolvidos na análise de quatro cultivares de soja já estão sendo obtidos e informações relevantes sobre como esses flavonóides são usados no meio ambiente pelas plantas na defesa contra insetos-praga poderão num futuro próximo serem obtidas.

Agradecimentos

CENARGEN, UnB, CNPDIA, UFSCar, CNPq e CAPES.

Referências

- PIUBELI, G.C.; HOFFMANN-CAMPO, C.B.; MOSCARDI, F.; MIYAKUBO, S.H.; OLIVEIRA, M.C.N.; **Journal of Chemical Ecology**, v. 31, n. 7, p.1509-1525, 2005.
- ZHU, J.W.; PARK, K.C.; **Journal of Chemical Ecology**, v. 31, n. 7, p. 1733-1746, 2005.
- TEMERK, Y.M.; IBRAHIM, H.S.M.; SCHUHMANN, W.; **Microchimica Acta**, v. 153, p. 7-13, 2006.
- ENSAFI, A.A.; HAJJAN, R.; **Electroanalysis**, v. 18, n. 6, p. 579-585, 2006.