

Otimização e validação de método para determinação de isoflavonas em leite de soja por HPLC/UV

Bruno Sérgio do Amaral* (IC), Stephane Franco (PG), Mary Rosa R. Marchi (PQ)

*bruno.sergio90@gmail.com

Instituto de Química da UNESP-Araraquara. Rua Francisco Degni, s/n, Araraquara-SP.

Palavras Chave: isoflavonas, leite de soja, HPLC/UV

Introdução

A soja possui características químicas e nutricionais que a qualificam como um alimento funcional: é rica em proteínas, fonte de minerais, possui ácidos graxos insaturados e isoflavonas. As isoflavonas são compostos que se ligam aos receptores estrogênicos, exercendo alguns efeitos similares ao estrogênio e, por esta razão são classificados como fitoestrógenos. Dentre as principais isoflavonas, destacam-se a genisteína e a daidzeína (Figura 1).

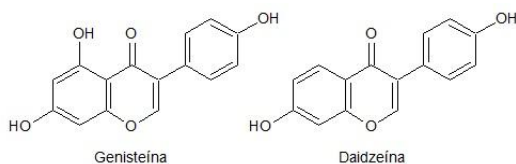


Figura 1. Estruturas das isoflavonas estudadas.

Dentre os vários produtos derivados da soja, o leite de soja é mais consumido. As pesquisas referentes aos benefícios das isoflavonas para saúde humana ainda são inconclusivas, por isso é importante a avaliação do teor de isoflavonas em produtos de largo consumo pela população. Este trabalho visou avaliar diversos métodos para extração de isoflavonas em leite de soja, a fim de otimizar e validar o mais adequado.

Resultados e Discussão

O método de extração escolhido para otimização foi proposto por FERRER, *et al.*¹ e modificado neste trabalho. O método modificado inclui extração de 1 mL de amostra com 2 x 7,5 mL de acetato de etila. Após a evaporação do solvente de extração o resíduo é ressolubilizado em 350 µL de metanol. A análise foi efetuada em um sistema HPLC/UV Varian 920 equipado com coluna C18 (Phenomenex, 4,6 mm x 150 mm x 5 µm). A fase móvel foi composta por MeOH/H₂O acidificada com 0,1% de HAc, em gradiente com vazão de 1 mL/min. O volume de injeção foi 20 µL. A detecção foi obtida em 280 nm. Para construção da curva analítica, 19 concentrações foram injetadas em triplicata, sendo 2 excluídos da curva por não estarem dentro do intervalo de linearidade estabelecido pelo teste de Huber². O método mostrou-se linear com coeficientes de correlação dentro do preconizado pela ANVISA ($r^2 = 0,99$)². Os limites de detecção e quantificação obtidos são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Resposta do sistema cromatográfico: parâmetros da curva analítica e limites obtidos

Analito	Curva analítica		Limites (µg mL ⁻¹)	
	Intervalo (µg mL ⁻¹)	R ²	LD	LQ
Daidzeína	0,04 – 40	0,999	0,02	0,04
Genisteína		0,999	0,03	0,04

Para avaliar o desempenho do método, 8 amostras comerciais de leite de soja foram analisadas e, a que apresentou menor concentração dos analitos de interesse, foi utilizada como amostra testemunha. Os níveis de fortificação foram escolhidos de modo a representar as concentrações encontradas para as amostras comerciais analisadas. As recuperações e CV obtidos estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Resultados obtidos na validação do método para análise de genisteína e daidzeína em leite de soja (n=3).

Analito	Conc.fortif* (µg mL ⁻¹)	Rec** (%)	CV (%)
Daidzeína	2,46	102 ± 6	3
	7,30	96 ± 9	4
	11,52	93 ± 4	2
Genisteína	1,87	98 ± 8	3
	6,60	93 ± 9	4
	10,63	89 ± 4	2

*Concentração da amostra de leite de soja fortificada

**Recuperação com respectivo intervalo de confiança (95%)

Os intervalos aceitáveis para uma recuperação devem estar entre 70% e 120% com CV < 20%². Desta forma, os valores obtidos estão dentro do preconizado para validação de métodos analíticos.

Conclusões

Os resultados mostraram que o método é adequado para a análise de genisteína e daidzeína em leite de soja. Além disso, o método de extração não exige etapas de liofilização e desengorduramento, como a maioria dos métodos encontrados na literatura.

Agradecimentos

FAPESP (proc. 2010/01291-0), FACTE

¹ Ferrer, I. et al., *J. Chromatogr. A.* **2009**, 1216, 6024.

² Ribani, M., et al.; *Química Nova.* **2004**, 27, 771.