



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**  
Centro de Ciências Exatas e Tecnologia  
Programa de Pós Graduação em Química - Doutorado



**ESTUDO DO COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO DE  
FITOESTROGÊNIOS E A DETERMINAÇÃO DESTES EM MATRIZES  
ALIMENTARES UTILIZANDO MÉTODOS ELETROANALÍTICOS**

**Daniela Kárin Fogliatto**

Orientador: Prof. Dr. Valdir Souza Ferreira

CAMPO GRANDE - MS  
2013



# **ESTUDO DO COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO DE FITOESTROGÊNIOS E A DETERMINAÇÃO DESTES EM MATRIZES ALIMENTARES UTILIZANDO MÉTODOS ELETROANALÍTICOS.**

**Daniela Kárin Fogliatto**

Tese apresentada ao Programa de Pós  
Graduação em Química – Nível de  
Doutorado - da Universidade Federal do  
Mato Grosso do Sul para obtenção do título  
de Doutor em Química (área de  
concentração: Química).

Orientador: Prof. Dr. Valdir Souza Ferreira

Colaboradores: Prof(a). Dr(a). Giovana Cristina Giannesi  
Dr. Antonio Marcos Jacques Barbosa

CAMPO GRANDE - MS  
2013

---

Dedico especialmente este trabalho:

À Deus, sabendo que esta dedicação nada Lhe acrescenta, mas em profunda gratidão ao Seu auxílio;

À minha mãe, Dirce, por sua doação e amor;

E ao meu esposo, Raphael, pela paciência e compreensão!

---

---

## *Agradecimentos*

- Ao professor Dr. Valdir Souza Ferreira, pelo direcionamento nas pesquisas, auxílio, pela liberdade de realizar este trabalho e pela amizade.
  - Aos professores doutores que aceitaram o convite de participar desta banca, acrescentando em meu aprendizado e nesta pesquisa com os seus conhecimentos.
  - À Dr<sup>a</sup>. Giovanna Giannesi, do departamento de bioquímica, que se dispôs tão atenciosamente a contribuir com minha pesquisa.
  - Ao professor Dr. Gilberto Maia que foi muito solícito, sanando minhas dúvidas e auxiliando com materiais, artigos e todo o necessário para me enriquecer no ensino da química.
  - A todos os professores que permanecem com carinho em minhas lembranças, todos responsáveis por meu aprimoramento profissional e crescimento pessoal.
  - À Tatianne, obrigada pela orientação e disponibilidade em ajudar sempre.
  - Ao Antonio Marcos, pela contribuição neste trabalho.
  - Aos meus colegas de laboratório agradeço pelos momentos de descontração, conversas, companhia e aprendizado juntos.
  - Aos meus eternos amigos de graduação que compartilharam tantos momentos de minha vida, serão guardados com muito carinho.
  - Ao Ademir, Celestino e professor Dr. Lincoln que foram muito atenciosos, contribuindo para a regularização de todo o processo de fechamento deste doutorado, muito obrigada.
  - A minha tia Nilma e minha madrinha Enedina, pelo carinho todo especial, pela dedicação de mãe e as orações.
  - À minha mãe Dirce, que a vida toda me ensinou os verdadeiros valores não com palavras, mas com ações. Agradeço porque ela me conduziu em uma fé cristã demonstrando-me que toda a força necessária para realização de meus projetos de vida está nas Mãos de Deus, eis a raiz que levou a conclusão deste trabalho hoje!
  - Aos meus irmãos, Katia e Marcos, por saber que sempre poderei contar com eles, pela força e eterna amizade.
  - Ao Raphael, meu esposo, pelo enorme carinho dedicado, pelas palavras de incentivo e fé e pela felicidade de partilhar uma vida em companheirismo e amor.
  - À CAPES, CNPq e Fundect, pela bolsa de estudo e auxílios financeiros concedidos.
-

---

➤ A todos que contribuíram para realização desse trabalho, **MUITO OBRIGADA!**

---

---

*“O que é estulto no mundo, Deus o escolheu para confundir os sábios; e o que é fraco no mundo, Deus o escolheu para confundir os fortes; e o que é vil e desprezível no mundo, Deus o escolheu, como também aquelas coisas que nada são, para destruir as que são”. 1 Coríntios 1: 27-28. “Pois a loucura de Deus é mais sábia do que os homens, e a fraqueza de Deus é mais forte do que os homens.” 1 Coríntios 1:25.*

---



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA – NÍVEL DE MESTRADO E DOUTORADO**

**TERMO DE DEFESA**

( ) – Dissertação (X) – Tese ( ) – Qualificação

| ALUNA                   |
|-------------------------|
| Daniela Kárin Fogliatto |

| TÍTULO DO TRABALHO                                                                                                                           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ESTUDO DO COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO DE FITOESTROGÊNIO E A DETERMINAÇÃO DESTES EM MATRIZES ALIMENTARES UTILIZANDO MÉTODOS ELETROANALÍTICOS. |

Tese de Doutorado em Química/UFMS submetida à Comissão Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Química – Nível de Mestrado e Doutorado/PPGQ, (**Resolução nº 15/2013**), da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos necessários para titulação no curso.

| COMISSÃO EXAMINADORA             |                       |            |
|----------------------------------|-----------------------|------------|
| NOME                             | INSTITUIÇÃO DE ENSINO | ASSINATURA |
| Valdir Souza Ferreira            | UFMS                  |            |
| Marilza Castilho                 | UFMT                  |            |
| Antonio Togério Fiorucci         | UEMS                  |            |
| Lincoln Carlos Silva de Oliveira | UFMS                  |            |
| Giuseppe Abíola Câmara da Silva  | UFMS                  |            |

**Campo Grande, 15 de abril de 2013**

Unidade XI – Curso de Química - CCET  
Cidade Universitária, s/n - Caixa Postal 549 - Fone: 067xx 3345-7009 - Fax 067xx 3345-3552  
79070-900 - Campo Grande (MS)  
<http://www.ufms.br> - <http://www.pgquimica.dqi.ufms.br>  
e-mail: [pgquimica.propp@ufms.br](mailto:pgquimica.propp@ufms.br)

---

## SUMÁRIO

|                                                                                    |               |
|------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| <b>LISTA DE FIGURAS.....</b>                                                       | <i>xi</i>     |
| <b>LISTA DE TABELAS.....</b>                                                       | <i>xxviii</i> |
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....</b>                                       | <i>xxxi</i>   |
| <b>RESUMO.....</b>                                                                 | <i>xxxiii</i> |
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>                                                          | <b>01</b>     |
| <b>1.1. Isoflavonas.....</b>                                                       | <b>03</b>     |
| <b>1.1.1. Mecanismo de ação.....</b>                                               | <b>08</b>     |
| <b>1.1.1.1. Prevenção de câncer.....</b>                                           | <b>09</b>     |
| <b>1.1.1.2. Redução do risco de doenças cardiovasculares e colesterol LDL.....</b> | <b>10</b>     |
| <b>1.1.1.3. Prevenção de doenças ósseas.....</b>                                   | <b>11</b>     |
| <b>1.1.1.4. Agente anti-estafilocócica.....</b>                                    | <b>11</b>     |
| <b>1.1.2. Efeitos adversos.....</b>                                                | <b>12</b>     |
| <b>1.2. Métodos de extração das isoflavonas.....</b>                               | <b>13</b>     |
| <b>1.2.1. Hidrólise ácida.....</b>                                                 | <b>14</b>     |
| <b>1.2.2. Hidrólise enzimática.....</b>                                            | <b>16</b>     |
| <b>1.3. Análise de isoflavonas.....</b>                                            | <b>19</b>     |
| <b>1.3.1. Métodos cromatográficos.....</b>                                         | <b>20</b>     |
| <b>1.3.2. Métodos eletroanalíticos.....</b>                                        | <b>23</b>     |
| <b>1.4. O uso das técnicas eletroquímicas.....</b>                                 | <b>26</b>     |
| <b>1.4.1. Cronocoulometria.....</b>                                                | <b>27</b>     |
| <b>1.4.2. Voltametria Cíclica.....</b>                                             | <b>29</b>     |
| <b>1.4.3. Voltametria de Onda Quadrada.....</b>                                    | <b>32</b>     |
| <b>1.4.4. Eletrodos sólidos de amálgama.....</b>                                   | <b>33</b>     |
| <b>1.5. Surfactantes.....</b>                                                      | <b>35</b>     |
| <b>1.5.1. Uso de surfactantes em estudos eletroquímicos.....</b>                   | <b>36</b>     |
| <b>1.6. OBJETIVOS.....</b>                                                         | <b>38</b>     |
| <b>1.6.1. Geral.....</b>                                                           | <b>38</b>     |
| <b>1.6.2. Específicos.....</b>                                                     | <b>38</b>     |
| <b>2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....</b>                                           | <b>39</b>     |
| <b>2.1. Preparo dos reagentes e soluções.....</b>                                  | <b>39</b>     |

---

---

|                                                                                                                          |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.1.1. Soluções utilizadas nos estudos em eletroquímica.....                                                             | 39        |
| 2.1.2. Soluções para determinação da atividade enzimática.....                                                           | 40        |
| 2.1.3. Soluções para quantificação de proteínas – Método Lowry.....                                                      | 40        |
| 2.2. Especificações gerais dos equipamentos.....                                                                         | 40        |
| 2.3. Produção da enzima $\beta$ -glucosidase.....                                                                        | 42        |
| 2.3.1. Microrganismos.....                                                                                               | 42        |
| 2.3.2. Produção de $\beta$ -glucosidase microbiana por fermentação em meio<br>semi-sólido (FMSS).....                    | 42        |
| 2.3.3. Determinação da atividade de $\beta$ -glucosidase.....                                                            | 43        |
| 2.3.4. Quantificação de proteínas pelo Método Lowry.....                                                                 | 43        |
| 2.3.5. Purificação parcial da $\beta$ -glucosidase.....                                                                  | 44        |
| 2.4. Hidrólise enzimática dos padrões de isoflavonas glicosiladas.....                                                   | 44        |
| 2.5. Preparo das amostras.....                                                                                           | 44        |
| 2.5.1. Extração.....                                                                                                     | 45        |
| 2.5.2. Hidrólise.....                                                                                                    | 46        |
| 2.6. Preparo do eletrodo sólido de amálgama de prata.....                                                                | 46        |
| 2.7. Medidas eletroquímicas.....                                                                                         | 47        |
| 2.8. Medidas cronocoulométricas.....                                                                                     | 47        |
| 2.9. Medidas cromatográficas.....                                                                                        | 48        |
| <b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>                                                                                    | <b>49</b> |
| 3.1. Comportamento eletroquímico das isoflavonas daidzeína e genisteína em<br>eletrodo de Hg.....                        | 49        |
| 3.2. Estudo da interação e comportamento de redução da daidzeína e da<br>genisteína em presença do surfactante BCTA..... | 52        |
| 3.2.1. Influência da velocidade de varredura de potencial por<br>VC.....                                                 | 50        |
| 3.2.2. Diagnóstico do processo eletródico.....                                                                           | 71        |
| 3.3. Estudo da interação e comportamento de redução da daidzeína e da<br>genisteína em presença do surfactante DSS.....  | 73        |
| 3.3.1. Influência da velocidade de varredura de potencial por<br>VC.....                                                 | 78        |
| 3.3.2. Diagnóstico do processo eletródico.....                                                                           | 85        |
| 3.4. Desenvolvimento de metodologia para determinação simultânea de                                                      |           |

---

---

|                                                                                                                                                          |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| daidzeína e genisteína utilizando eletrodo sólido de amálgama de prata.....                                                                              | 88  |
| <b>3.4.1.</b> Comportamento de redução das isoflavonas daidzeína e genisteína e o uso de surfactantes.....                                               | 88  |
| <b>3.4.2.</b> Influência do tipo de eletrólito suporte e pH do meio.....                                                                                 | 91  |
| <b>3.4.3.</b> Influência dos parâmetros instrumentais.....                                                                                               | 102 |
| <b>3.4.3.1.</b> Estudo do tempo de deposição ( $t_{ac}$ ) .....                                                                                          | 102 |
| <b>3.4.3.2.</b> Estudo do potencial de deposição ( $E_{ac}$ ).....                                                                                       | 103 |
| <b>3.4.3.3.</b> Estudo da amplitude dos pulsos ( $E_{sw}$ ) .....                                                                                        | 104 |
| <b>3.4.3.4.</b> Estudo da frequência de aplicação dos pulsos ( $f$ ).....                                                                                | 106 |
| <b>3.4.3.5.</b> Influência do incremento de varredura ( $\Delta E_s$ ).....                                                                              | 108 |
| <b>3.4.4.</b> Parâmetros otimizados do método.....                                                                                                       | 110 |
| <b>3.4.5.</b> Curva analítica para análise simultânea de daidzeína e genisteína.....                                                                     | 110 |
| <b>3.5.</b> Obtenção da enzima $\beta$ -glucosidase e otimização das condições para uso em hidrólise.....                                                | 113 |
| <b>3.5.1.</b> Produção da enzima $\beta$ -glucosidase por fermentação semi-sólida.....                                                                   | 113 |
| <b>3.5.2.</b> Purificação parcial dos extratos brutos enzimáticos.....                                                                                   | 115 |
| <b>3.5.3.</b> Perfis voltamétricos dos extratos enzimáticos de $\beta$ -glicosidase e estudos de hidrólise nos padrões das isoflavonas glicosiladas..... | 118 |
| <b>3.5.4.</b> Aplicação de metodologias eletroanalíticas na determinação das isoflavonas agliconas em produtos de soja.....                              | 126 |
| <b>3.6.</b> Cromatografia líquida de alta eficiência como metodologia comparativa para validação de métodos.....                                         | 135 |
| <b>3.6.1.</b> Curvas analíticas para daidzeína e genisteína.....                                                                                         | 136 |
| <b>3.6.2.</b> Análise de daidzeína e genisteína em produtos de soja por CLAE-UV .....                                                                    | 137 |
| <b>3.7.</b> Desenvolvimento de metodologia para determinação simultânea de biochanina A e formononetina utilizando eletrodo de amálgama de prata.....    | 140 |
| <b>3.7.1.</b> Influência do tipo de eletrólito suporte e pH do meio.....                                                                                 | 142 |
| <b>3.7.2.</b> Influência dos parâmetros instrumentais.....                                                                                               | 153 |
| <b>3.7.2.1.</b> Estudo do tempo de deposição ( $t_{ac}$ ).....                                                                                           | 153 |
| <b>3.7.2.2.</b> Estudo do potencial de deposição ( $E_{ac}$ ).....                                                                                       | 154 |
| <b>3.7.2.3.</b> Estudo da amplitude dos pulsos ( $E_{sw}$ ).....                                                                                         | 155 |
| <b>3.7.2.4.</b> Estudo da frequência de aplicação dos pulsos ( $f$ ).....                                                                                | 157 |

---

---

|                                                                                                                                                                                                                       |            |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 3.7.2.5. Influência do incremento de varredura ( $\Delta E_s$ ).....                                                                                                                                                  | 159        |
| 3.7.3. Parâmetros otimizados do método.....                                                                                                                                                                           | 160        |
| 3.7.4. Curva analítica para análise simultânea de formononetina e biochanina A.....                                                                                                                                   | 161        |
| 3.7.5. Aplicação da metodologia eletroanalítica desenvolvida na análise simultânea da formononetina e biochanina A em medicamento fitoterápico à base de extrato da planta <i>Trifolium pratense</i> .....            | 163        |
| <b>4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>                                                                                                                                                                                   | <b>168</b> |
| <b>5. PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>                                                                                                                                                                                   | <b>171</b> |
| <b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>                                                                                                                                                                             | <b>172</b> |
| <b>7. APÊNDICE.....</b>                                                                                                                                                                                               | <b>186</b> |
| 7.1. Cálculos para obtenção dos resultados por cronocoulometria.....                                                                                                                                                  | 186        |
| 7.1.1. Cronocoulometria com o surfactante catiônico BCTA.....                                                                                                                                                         | 187        |
| 7.1.2. Cronocoulometria com o surfactante aniônico DSS.....                                                                                                                                                           | 188        |
| 7.2. Cromatogramas dos produtos de soja analisados após hidrólise enzimática com $\beta$ -glicosidase de <i>Aspergillus niger</i> (purificado com acetona 2 V) pela técnica CLAE-UV (conforme Song et al., 2008)..... | 189        |
| 7.3. Quadro de créditos cursados no doutorado em química.....                                                                                                                                                         | 191        |

---

---

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                         |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1:</b> Estrutura química do estrogênio feminino, 17- $\beta$ -estradiol, e a semelhança com as estruturas dos compostos fitoestrogênicos: isoflavona, lignana, cumestano e lactona do ácido resorcílico.....                                                                  | 01 |
| <b>Figura 2:</b> Biossíntese dos flavonóides (DI CARLO <i>et al.</i> , 1999).....                                                                                                                                                                                                       | 04 |
| <b>Figura 3:</b> Estrutura planar básica dos flavonóides (núcleo flavano).....                                                                                                                                                                                                          | 05 |
| <b>Figura 4:</b> Principais isoflavonas na forma aglicona contidas nas plantas.....                                                                                                                                                                                                     | 05 |
| <b>Figura 5:</b> As quatro formas químicas das três isoflavonas análogas contidas na soja (Adaptado de KING & BIGNELL, 2000).....                                                                                                                                                       | 07 |
| <b>Figura 6:</b> Esquema de hidrólises: básica, ácida e enzimática em derivados de isoflavonas (DELMONTE <i>et al.</i> , 2006).....                                                                                                                                                     | 14 |
| <b>Figura 7:</b> Estrutura da 4',7-dimetoxi-3'-isoflavona sulfônica de sódio (DISS).....                                                                                                                                                                                                | 24 |
| <b>Figura 8:</b> Esboço do microchip de vidro utilizado e terminologias propostas: PS, reservatório de bombeamento; G, reservatório de calibração ou de genisteína; TI, reservatório de isoflavonas totais (ESCARPA <i>et al.</i> , 2007).....                                          | 25 |
| <b>Figura 9:</b> (A) Resposta de excitação para um salto de potencial. (B) Cronocoulograma: resposta monitorada de carga-tempo (KISSINGER & HEINEMAN, 1996).....                                                                                                                        | 27 |
| <b>Figura 10:</b> Efeito de adsorção das espécies eletroativas em cronocoulometria. (A) Curvas carga-tempo dos componentes individuais que contribuem para carga total ( $Q_{total}$ ). (B) Gráficos de $Q$ vs. $t^{1/2}$ para $Q_{total}$ e $Q_{dc}$ (KISSINGER & HEINEMAN, 1996)..... | 28 |
| <b>Figura 11:</b> Técnica de voltametria cíclica. Perturbação aplicada e resposta ciclovoltagemétrica.....                                                                                                                                                                              | 29 |
| <b>Figura 12:</b> Resposta ciclovoltagemétrica obtida para sistemas reversíveis (a) e                                                                                                                                                                                                   |    |

---

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| irreversíveis (b).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 31 |
| <b>Figura 13:</b> (A) Forma de aplicação do potencial e (B) parâmetros utilizados em VOQ (Adaptado de ALEIXO, 2003; SOUZA <i>et al.</i> , 2003).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 32 |
| <b>Figura 14:</b> Voltamogramas de onda quadrada teórico para um sistema reversível (A) e para um sistema totalmente irreversível (B) (SOUZA <i>et al.</i> , 2003).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 33 |
| <b>Figura 15:</b> Representação figurativa do surfactante em solução aquosa (interface ar-água) e estruturas químicas dos surfactantes: (a) Catiónico: brometo de cetiltrimetilamônio (BCTA); (b) Aniônico: dodecil sulfato de sódio (SDS) e (c) Neutro: Triton X-100.....                                                                                                                                                                                                                      | 36 |
| <b>Figura 16:</b> Processo de formação de micelas com o aumento da concentração de surfactante.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 36 |
| <b>Figura 17:</b> Microrganismos <i>Aspergillus oryzae</i> e <i>Aspergillus niger</i> utilizados na produção da enzima $\beta$ -glicosidase.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 42 |
| <b>Figura 18:</b> Etapas de preparação do eletrodo sólido de amálgama de prata.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 46 |
| <b>Figura 19:</b> Voltamogramas cíclicos para uma solução de $3,82 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ de daidzeína (—) e uma solução de $3,15 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ de genisteína (---), em tampão fosfato:metanol (8:2, v/v), pH 7,5 - 0,04 $\text{mol.L}^{-1}$ (.....); $v = 200 \text{ mV.s}^{-1}$ .....                                                                                                                                                                          | 49 |
| <b>Figura 20:</b> Voltamogramas cíclicos para: (A) Solução de daidzeína ( $3,82 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ) na presença do surfactante catiónico BCTA ( $2,47 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ ); (B) Solução de daidzeína ( $3,82 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ) na presença do surfactante aniônico DSS ( $2,42 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ). (.....) Branco: tampão fosfato:metanol (8:2, v/v), pH 7,5 - 0,04 $\text{mol.L}^{-1}$ ; $v = 200 \text{ mV.s}^{-1}$ .....   | 51 |
| <b>Figura 21:</b> Voltamogramas cíclicos para: (A) Solução de genisteína ( $3,15 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ) na presença do surfactante catiónico BCTA ( $2,47 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ ); (B) Solução de genisteína ( $3,15 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ) na presença do surfactante aniônico DSS ( $2,42 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ). (.....) Branco: tampão fosfato:metanol (8:2, v/v), pH 7,5 - 0,04 $\text{mol.L}^{-1}$ ; $v = 200 \text{ mV.s}^{-1}$ ..... | 52 |
| <b>Figura 22:</b> Voltamogramas cíclicos da daidzeína ( $1,43 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ) no intervalo de                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |    |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| pH 3,0 a 9,0. Eletrólito suporte: tampão BR:metanol (8:2, v/v – 0,04 mol.L <sup>-1</sup> ) na presença de BCTA (2,47.10 <sup>-4</sup> mol.L <sup>-1</sup> ), $\nu$ = 200 mV.s <sup>-1</sup> .....                                                                                                                                                                                                                                                                 | 53 |
| <b>Figura 23:</b> (A) Variação da E <sub>pc</sub> da daidzeína em função do pH do meio. (B) Variação do I <sub>pc</sub> da daidzeína em função do pH do meio. Eletrólito suporte: tampão BR:metanol (8:2, v/v – 0,04 mol.L <sup>-1</sup> ) na presença de BCTA (2,47.10 <sup>-4</sup> mol.L <sup>-1</sup> ), $\nu$ = 200 mV.s <sup>-1</sup> .....                                                                                                                 | 54 |
| <b>Figura 24:</b> Esquema de desprotonação da daidzeína (LIANG <i>et al.</i> , 2008; GAO <i>et al.</i> , 2001).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 55 |
| <b>Figura 25:</b> Voltamogramas cíclicos da genisteína (1,51. 10 <sup>-5</sup> mol.L <sup>-1</sup> ) no intervalo de pH 3,0 a 9,0. Eletrólito suporte: tampão BR:metanol (8:2, v/v – 0,04 mol.L <sup>-1</sup> ) na presença de BCTA (2,47.10 <sup>-4</sup> mol.L <sup>-1</sup> ), $\nu$ = 200 mV.s <sup>-1</sup> .....                                                                                                                                            | 56 |
| <b>Figura 26:</b> (A) Variação da E <sub>pc</sub> da genisteína em função do pH do meio. (B) Variação do I <sub>pc</sub> da genisteína em função do pH do meio. Eletrólito suporte: tampão BR:metanol (8:2, v/v – 0,04 mol.L <sup>-1</sup> ) na presença de BCTA (2,47.10 <sup>-4</sup> mol.L <sup>-1</sup> ), $\nu$ = 200 mV.s <sup>-1</sup> .....                                                                                                               | 57 |
| <b>Figura 27:</b> Esquema de desprotonação da genisteína (ZIELONKA <i>et al.</i> , 2003).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 58 |
| <b>Figura 28:</b> Cronocoulometria do surfactante catiônico BCTA sobre a superfície do eletrodo de gota pendente de mercúrio. Onde: (A) Eletrólito Suporte: tampão fosfato:metanol (8:2, v/v – 0,04 mol.L <sup>-1</sup> ), pH 7,5 e (B) Eletrólito suporte + 2,47.10 <sup>-4</sup> mol.L <sup>-1</sup> de surfactante BCTA. Parâmetros: E <sub>i</sub> = -1,3 V vs. Ag/AgCl; E <sub>f</sub> = -1,7 V vs. Ag/AgCl; duração: 60,1 s, tempo de amostragem 0,01s..... | 59 |
| <b>Figura 29:</b> Voltamogramas cíclicos para: (A) Solução de 1,43.10 <sup>-5</sup> mol.L <sup>-1</sup> de daidzeína; (B) Solução de 1,51. 10 <sup>-5</sup> mol.L <sup>-1</sup> de genisteína. Em tampão BR:metanol (8:2, v/v – 0,04 mol.L <sup>-1</sup> ) pH 7,5 e na presença de BCTA (2,47.10 <sup>-4</sup> mol.L <sup>-1</sup> ), para um aumento da $\nu$ de 10 a 500 mV.s <sup>-1</sup> .....                                                               | 60 |
| <b>Figura 30:</b> Variação do E <sub>pc</sub> com a $\nu$ , para uma solução de daidzeína (1,43.10 <sup>-5</sup> mol.L <sup>-1</sup> ), na presença de BCTA (2,47.10 <sup>-4</sup> mol.L <sup>-1</sup> ), em tampão BR:metanol (8:2, v/v – 0,04 mol.L <sup>-1</sup> ) no intervalo de pH 3,0 a 9,0.....                                                                                                                                                           | 61 |
| <b>Figura 31:</b> Variação do E <sub>pc</sub> com a $\nu$ , para uma solução de genisteína (1,51. 10 <sup>-5</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |    |

mol.L<sup>-1</sup>), na presença de BCTA (2,47.10<sup>-4</sup> mol.L<sup>-1</sup>), em tampão BR:metanol (8:2, v/v – 0,04 mol.L<sup>-1</sup>) no intervalo de pH 3,0 a 9,0..... 62

**Figura 32:** Variação da  $I_{pc}$  com a  $v$ , para uma solução de daidzeína (1,43.10<sup>-5</sup> mol.L<sup>-1</sup>), na presença de BCTA (2,47.10<sup>-4</sup> mol.L<sup>-1</sup>), em tampão BR:metanol (8:2, v/v – 0,04 mol.L<sup>-1</sup>) no intervalo de pH 3,0 a 9,0..... 62

**Figura 33:** Variação da  $I_{pc}$  com a  $v$ , para uma solução de genisteína (1,51. 10<sup>-5</sup> mol.L<sup>-1</sup>), na presença de BCTA (2,47.10<sup>-4</sup> mol.L<sup>-1</sup>), em tampão BR:metanol (8:2, v/v – 0,04 mol.L<sup>-1</sup>) no intervalo de pH 3,0 a 9,0..... 63

**Figura 34:** Variação do  $\log I_{pc}$  com  $\log v$ , para uma solução 1,43. 10<sup>-5</sup> mol.L<sup>-1</sup> de daidzeína (**A**) e para uma solução 1,51. 10<sup>-5</sup> mol.L<sup>-1</sup> de genisteína (**B**), na presença de BCTA (2,47.10<sup>-4</sup> mol.L<sup>-1</sup>) em tampão BR:metanol (8:2, v/v – 0,04 mol.L<sup>-1</sup>), no intervalo de pH 3,0 a 9,0..... 64

**Figura 35:** Variação da  $I_{pc}$  com a  $v^{1/2}$ , para uma solução de daidzeína (1,43.10<sup>-5</sup> mol.L<sup>-1</sup>), na presença de BCTA (2,47.10<sup>-4</sup> mol.L<sup>-1</sup>), em tampão BR:metanol (8:2, v/v – 0,04 mol.L<sup>-1</sup>) no intervalo de pH 3,0 a 9,0..... 65

**Figura 36:** Variação da  $I_{pc}$  com a  $v^{1/2}$ , para uma solução de genisteína (1,51. 10<sup>-5</sup> mol.L<sup>-1</sup>), na presença de BCTA (2,47.10<sup>-4</sup> mol.L<sup>-1</sup>), em tampão BR:metanol (8:2, v/v – 0,04 mol.L<sup>-1</sup>) no intervalo de pH 3,0 a 9,0..... 66

**Figura 37:** Variação da função corrente de pico ( $I_{pc} \cdot v^{-1/2}$ ) com  $v$ , para uma solução de daidzeína (1,43.10<sup>-5</sup> mol.L<sup>-1</sup>), na presença de BCTA (2,47.10<sup>-4</sup> mol.L<sup>-1</sup>), em tampão BR:metanol (8:2, v/v – 0,04 mol.L<sup>-1</sup>) no intervalo de pH 3,0 a 9,0..... 67

**Figura 38:** Variação da função corrente de pico ( $I_{pc} \cdot v^{-1/2}$ ) com a  $v$ , para uma solução de genisteína (1,51. 10<sup>-5</sup> mol.L<sup>-1</sup>), na presença de BCTA (2,47.10<sup>-4</sup> mol.L<sup>-1</sup>), em tampão BR:metanol (8:2, v/v – 0,04 mol.L<sup>-1</sup>) no intervalo de pH 3,0 a 9,0..... 68

**Figura 39:** Variação do  $E_{pc}$  com  $\log v$ , para uma solução de daidzeína 1,43.10<sup>-5</sup> mol.L<sup>-1</sup>, na presença de BCTA (2,47.10<sup>-4</sup> mol.L<sup>-1</sup>), em tampão BR:metanol (8:2, v/v – 0,04 mol.L<sup>-1</sup>) no intervalo de pH 3,0 a 9,0..... 69

**Figura 40:** Variação do  $E_{pc}$  com  $\log v$ , para uma solução de genisteína (1,51. 10<sup>-5</sup> mol.L<sup>-1</sup>), na presença de BCTA (2,47.10<sup>-4</sup> mol.L<sup>-1</sup>), em tampão BR:metanol (8:2,

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| v/v – 0,04 mol.L <sup>-1</sup> ) no intervalo de pH 3,0 a 9,0.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 70 |
| <b>Figura 41:</b> Esquema de interação e adsorção da daidzeína e da genisteína com o surfactante BCTA sobre a superfície eletródica de gota de mercúrio.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 72 |
| <b>Figura 42:</b> Proposta de mecanismo de redução da daidzeína e da genisteína sobre a superfície eletródica de gota de mercúrio na presença de surfactante BCTA.....                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 73 |
| <b>Figura 43:</b> Voltamogramas cíclicos da daidzeína (1,43.10 <sup>-5</sup> mol.L <sup>-1</sup> ) no intervalo de pH: (A) 3,0 a 7,0 e (B) 7,3 a 9,0. Eletrólito suporte: tampão BR:metanol (8:2, v/v – 0,04 mol.L <sup>-1</sup> ) na presença de DSS (2,42.10 <sup>-3</sup> mol.L <sup>-1</sup> ), $\nu$ = 200 mV.s <sup>-1</sup> .....                                                                                                                       | 74 |
| <b>Figura 44:</b> Voltamogramas cíclicos da genisteína (1,51. 10 <sup>-5</sup> mol.L <sup>-1</sup> ) no intervalo de pH: (A) 3,0 a 7,0 e (B) 7,3 a 9,0. Eletrólito suporte: tampão BR:metanol (8:2, v/v – 0,04 mol.L <sup>-1</sup> ) na presença de DSS (2,42.10 <sup>-3</sup> mol.L <sup>-1</sup> ), $\nu$ = 200 mV.s <sup>-1</sup> .....                                                                                                                     | 74 |
| <b>Figura 45:</b> (A) Variação do E <sub>p</sub> da daidzeína em função do pH do meio. (B) Variação do I <sub>p</sub> da daidzeína em função do pH do meio. Eletrólito suporte: tampão BR:metanol (8:2, v/v – 0,04 mol.L <sup>-1</sup> ) na presença de DSS (2,42.10 <sup>-3</sup> mol.L <sup>-1</sup> ), $\nu$ = 200 mV.s <sup>-1</sup> .....                                                                                                                 | 75 |
| <b>Figura 46:</b> (A) Variação do E <sub>p</sub> da genisteína em função do pH do meio. (B) Variação do I <sub>p</sub> da genisteína em função do pH do meio. Eletrólito suporte: tampão BR:metanol (8:2, v/v – 0,04 mol.L <sup>-1</sup> ) na presença de DSS (2,42.10 <sup>-3</sup> mol.L <sup>-1</sup> ), $\nu$ = 200 mV.s <sup>-1</sup> .....                                                                                                               | 76 |
| <b>Figura 47:</b> Cronocoulometria do surfactante aniônico DSS sobre a superfície do eletrodo de gota pendente de mercúrio. Onde: (A) Eletrólito suporte: tampão fosfato:metanol (8:2, v/v – 0,04 mol.L <sup>-1</sup> ), pH 7,5 e (B) Eletrólito suporte + 2,42.10 <sup>-3</sup> mol.L <sup>-1</sup> de surfactante DSS. Parâmetros: E <sub>i</sub> = -1,1 V vs. Ag/AgCl; E <sub>f</sub> = -1,7 V vs. Ag/AgCl; duração: 60,1 s, tempo de amostragem 0,01s..... | 77 |
| <b>Figura 48:</b> Voltamogramas cíclicos para: (A) Solução de 1,43.10 <sup>-5</sup> mol.L <sup>-1</sup> de daidzeína; (B) Solução de 1,51.10 <sup>-5</sup> mol.L <sup>-1</sup> de genisteína. Em tampão BR:metanol (8:2, v/v – 0,04 mol.L <sup>-1</sup> ) pH 7,3 e na presença de DSS (2,42.10 <sup>-3</sup> mol.L <sup>-1</sup> ), para um aumento da $\nu$ de 50 a 500 mV.s <sup>-1</sup> .....                                                              | 78 |
| <b>Figura 49:</b> Variação do E <sub>pc</sub> (A) e E <sub>pa</sub> (B) com a $\nu$ , para uma solução de daidzeína                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |    |

( $1,43 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ), na presença de DSS ( $2,42 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ), em tampão BR:metanol (8:2, v/v –  $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ ) no intervalo de pH 3,0 a 9,0..... 79

**Figura 50:** Variação do  $E_{pc}$  (A) e  $E_{pa}$  (B) com a  $v$ , para uma solução de genisteína ( $1,51 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ), na presença de DSS ( $2,42 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ), em tampão BR:metanol (8:2, v/v –  $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ ) no intervalo de pH 3,0 a 9,0..... 79

**Figura 51:** Variação do  $I_{pc}$  (A) e  $I_{pa}$  (B) com a  $v$ , para uma solução de daidzeína ( $1,43 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ), na presença de DSS ( $2,42 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ), em tampão BR:metanol (8:2, v/v –  $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ ) no intervalo de pH 3,0 a 9,0..... 80

**Figura 52:** Variação do  $I_{pc}$  (A) e  $I_{pa}$  (B) com a  $v$ , para uma solução de genisteína ( $1,51 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ), na presença de DSS ( $2,42 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ), em tampão BR:metanol (8:2, v/v –  $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ ) no intervalo de pH 3,0 a 9,0..... 80

**Figura 53:** Variação do  $\log I_{pc}$  com  $\log v$ , para uma solução  $1,43 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$  de daidzeína (A) e para uma solução  $1,51 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$  de genisteína (B), na presença de DSS ( $2,42 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ), em tampão BR:metanol (8:2, v/v –  $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ ) no intervalo de pH 3,0 a 9,0..... 82

**Figura 54:** Variação da  $I_{pc}$  (A) e  $I_{pa}$  (B) com a  $v^{1/2}$ , para uma solução de daidzeína ( $1,43 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ), na presença de DSS ( $2,42 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ), em tampão BR:metanol (8:2, v/v –  $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ ) no intervalo de pH 3,0 a 9,0..... 83

**Figura 55:** Variação da  $I_{pc}$  (A) e  $I_{pa}$  (B) com a  $v^{1/2}$ , para uma solução de genisteína ( $1,51 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ), na presença de DSS ( $2,42 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ), em tampão BR:metanol (8:2, v/v –  $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ ) no intervalo de pH 3,0 a 9,0..... 83

**Figura 56:** Variação da  $I_{pa}/I_{pc}$  com a  $v$ , para uma solução  $1,43 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$  de daidzeína (A) e para uma solução  $1,51 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$  de genisteína (B), na presença de DSS ( $2,42 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ) em tampão BR:metanol (8:2, v/v –  $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ ) no intervalo de pH 3,0 a 9,0..... 84

**Figura 57:** Esquema de interação e adsorção da daidzeína e da genisteína com o surfactante aniônico DSS sobre a superfície eletródica de gota de mercúrio..... 86

**Figura 58:** Proposta de mecanismo de redução da daidzeína e da genisteína sobre a

superfície eletródica de gota de mercúrio na presença de surfactante DSS..... 87

**Figura 59:** Voltamogramas de onda quadrada de redução da daidzeína e genisteína, onde: (.....) Tampão fosfato:metanol (8:2, v/v), pH 7,5 - 0,04 mol.L<sup>-1</sup>; (—) solução de daidzeína e genisteína a 1,1.10<sup>-5</sup> mol.L<sup>-1</sup>. Parâmetros:  $t_{ac}$ : 0 s;  $E_{ac}$ : 0 V;  $f$ : 60 Hz;  $\Delta E_s$ : 5 mV;  $E_{sw}$ : 30 mV..... 89

**Figura 60:** Voltamogramas de onda quadrada para: (A) Solução de 3,02.10<sup>-5</sup> mol.L<sup>-1</sup> de daidzeína (—); (B) Solução de 3,00.10<sup>-5</sup> mol.L<sup>-1</sup> de genisteína (—). Onde: (.....) Branco: tampão fosfato:metanol (8:2, v/v - 0,04 mol.L<sup>-1</sup>), pH 7,5 e (----) Branco + Surfactante neutro Triton X-100 (3,08.10<sup>-4</sup> mol.L<sup>-1</sup>). Parâmetros:  $t_{ac}$ : 0 s;  $E_{ac}$ : 0 V;  $f$ : 60 Hz;  $\Delta E_s$ : 5 mV;  $E_{sw}$ : 30 mV..... 89

**Figura 61:** Voltamogramas de onda quadrada para: (A) Solução de 1,16.10<sup>-5</sup> mol.L<sup>-1</sup> de daidzeína (—); (B) Solução de 1,05.10<sup>-5</sup> mol.L<sup>-1</sup> de genisteína (—). Onde: (.....) Branco: tampão fosfato:metanol (8:2, v/v - 0,04 mol.L<sup>-1</sup>), pH 7,5 e (----) Branco + Surfactante aniônico DSS (6,56.10<sup>-4</sup> mol.L<sup>-1</sup>). Parâmetros:  $t_{ac}$ : 0 s;  $E_{ac}$ : 0 V;  $f$ : 60 Hz;  $\Delta E_s$ : 5 mV;  $E_{sw}$ : 30 mV..... 90

**Figura 62:** Voltamogramas de onda quadrada para: (A) Solução de 1,16.10<sup>-5</sup> mol.L<sup>-1</sup> de daidzeína (—); (B) Solução de 1,05.10<sup>-5</sup> mol.L<sup>-1</sup> de genisteína (—). Onde: (.....) Branco: tampão fosfato:metanol (8:2, v/v - 0,04 mol.L<sup>-1</sup>), pH 7,5 e (----) Branco + Surfactante catiônico BCTA (2,47.10<sup>-4</sup> mol.L<sup>-1</sup>). Parâmetros:  $t_{ac}$ : 0 s;  $E_{ac}$ : 0 V;  $f$ : 60 Hz;  $\Delta E_s$ : 5 mV;  $E_{sw}$ : 30 mV..... 91

**Figura 63:** Voltamogramas de onda quadrada de redução de 1,17.10<sup>-5</sup> mol.L<sup>-1</sup> de daidzeína no intervalo de pH de 4,5 a 10,5, em tampão BR:metanol (8:2, v/v), 0,04 mol.L<sup>-1</sup>, na presença de 2,47.10<sup>-4</sup> mol.L<sup>-1</sup> de surfactante BCTA. Parâmetros:  $t_{ac}$ : 0 s;  $E_{ac}$ : 0 V;  $f$ : 60 Hz;  $\Delta E_s$ : 5 mV;  $E_{sw}$ : 30 mV..... 92

**Figura 64:** (A) Variação do  $E_{pc}$  da daidzeína em função do pH do meio. (B) Variação da  $I_{pc}$  da daidzeína em função do pH do meio. Eletrólito suporte: tampão BR:metanol (8:2, v/v) - 0,04 mol.L<sup>-1</sup>, na presença de 2,47.10<sup>-4</sup> mol.L<sup>-1</sup> de surfactante catiônico BCTA..... 93

**Figura 65:** Voltamogramas de onda quadrada de redução de 1,17.10<sup>-5</sup> mol.L<sup>-1</sup> de

daidzeína no intervalo de pH de 6,0 a 9,0, em tampão fosfato:metanol (8:2, v/v), 0,04 mol.L<sup>-1</sup>, na presença de 2,47.10<sup>-4</sup> mol.L<sup>-1</sup> de surfactante BCTA. Parâmetros:  $t_{ac}$ : 0 s;  $E_{ac}$ : 0 V;  $f$ : 60 Hz;  $\Delta E_s$ : 5 mV;  $E_{sw}$ : 30 mV..... 94

**Figura 66:** Variação de  $I_{pc}$  de uma solução de daidzeína (1,17.10<sup>-5</sup> mol.L<sup>-1</sup>) em função do pH do meio, na presença de 2,47.10<sup>-4</sup> mol.L<sup>-1</sup> de surfactante catiônico BCTA, onde: (—■—) Tampão BR:metanol (8:2, v/v), pH de 6,0 a 9,0; (—○—) Tampão fosfato:metanol (8:2, v/v), pH 6,0 a 9,0..... 94

**Figura 67:** Voltamogramas de onda quadrada de redução de 1,06.10<sup>-5</sup> mol.L<sup>-1</sup> de genisteína no intervalo de pH de 4,0 a 10,5, em tampão BR:metanol (8:2, v/v), 0,04 mol.L<sup>-1</sup>, na presença de 2,47.10<sup>-4</sup> mol.L<sup>-1</sup> de surfactante BCTA. Parâmetros:  $t_{ac}$ : 0 s;  $E_{ac}$ : 0 V;  $f$ : 60 Hz;  $\Delta E_s$ : 5 mV;  $E_{sw}$ : 30 mV..... 95

**Figura 68:** (A) Variação do  $E_{pc}$  da genisteína em função do pH do meio. (B) Variação da  $I_{pc}$  da genisteína em função do pH do meio. Eletrólito suporte: tampão BR:metanol (8:2, v/v) - 0,04 mol.L<sup>-1</sup>, na presença de 2,47.10<sup>-4</sup> mol.L<sup>-1</sup> de surfactante catiônico BCTA..... 96

**Figura 69:** Voltamogramas de onda quadrada de redução de 1,06.10<sup>-5</sup> mol.L<sup>-1</sup> de genisteína no intervalo de pH de 6,0 a 9,0, em tampão fosfato:metanol (8:2, v/v), 0,04 mol.L<sup>-1</sup>, na presença de 2,47.10<sup>-4</sup> mol.L<sup>-1</sup> de surfactante BCTA. Parâmetros:  $t_{ac}$ : 0 s;  $E_{ac}$ : 0 V;  $f$ : 60 Hz;  $\Delta E_s$ : 5 mV;  $E_{sw}$ : 30 mV..... 98

**Figura 70:** Variação de  $I_{pc}$  de uma solução de genisteína (1,06.10<sup>-5</sup> mol.L<sup>-1</sup>) em função do pH do meio, na presença de 2,47.10<sup>-4</sup> mol.L<sup>-1</sup> de surfactante catiônico BCTA, onde: (—■—) Tampão BR:metanol (8:2, v/v), pH de 6,0 a 9,0; (—○—) Tampão fosfato:metanol (8:2, v/v), pH 6,0 a 9,0..... 98

**Figura 71:** Voltamogramas de onda quadrada de uma solução contendo daidzeína e genisteína (1,1.10<sup>-5</sup> mol.L<sup>-1</sup>) em presença de BCTA 2,47.10<sup>-4</sup> mol.L<sup>-1</sup> para diferentes concentrações do tampão fosfato:metanol (8:2, v/v) em pH 7,5: (a) 0,04 mol.L<sup>-1</sup>, (b) 0,06 mol.L<sup>-1</sup>, (c) 0,08 mol.L<sup>-1</sup>, (d) 0,1 mol.L<sup>-1</sup>..... 99

**Figura 72:** Voltamogramas de onda quadrada de redução da daidzeína e genisteína em diferentes concentrações de BCTA. (....) Tampão fosfato:metanol (8:2, v/v), pH 7,5 - 0,04 mol.L<sup>-1</sup> + solução de daidzeína e genisteína a 1,1.10<sup>-5</sup> mol.L<sup>-1</sup>. (a-j)

Adições do surfactante BCTA: (a)  $6,58 \cdot 10^{-5}$ ; (b)  $7,24 \cdot 10^{-5}$ ; (c)  $7,89 \cdot 10^{-5}$ ; (d)  $9,18 \cdot 10^{-5}$ ; (e)  $9,82 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ; (f)  $1,88 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ ; (g)  $2,55 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ ; (h)  $3,22 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ ; (i)  $3,88 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ ; (j)  $4,53 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ . Parâmetros:  $t_{ac}$ : 0 s;  $E_{ac}$ : 0 V;  $f$ : 60 Hz;  $\Delta E_s$ : 5 mV;  $E_{sw}$ : 30 mV..... 101

**Figura 73:** (A) Variação de  $E_{pc}$  em função da concentração do surfactante BCTA ( $5,26 \cdot 10^{-5}$  a  $5,19 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ ) para uma solução de daidzeína e genisteína ( $\approx 1,1 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ). (B) Variação de  $I_{pc}$  em função da concentração do surfactante BCTA ( $5,26 \cdot 10^{-5}$  a  $5,19 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ ) para uma solução de daidzeína e genisteína ( $\approx 1,1 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ). Eletrólito suporte: tampão fosfato:metanol (8:2, v/v), pH 7,5 -  $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ ..... 101

**Figura 74:** Efeito do tempo de acúmulo sobre  $I_{pc}$  da genisteína e daidzeína ( $\approx 5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ ) em tampão fosfato:metanol (8:2, v/v -  $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ ), pH 7,5, na presença de  $2,55 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  de surfactante BCTA. Parâmetros:  $E_{ac}$ : 0 V;  $E_{sw}$ : 30 mV;  $f$ : 60 Hz;  $\Delta E_s$ : 5 mV..... 102

**Figura 75:** Efeito do potencial de acúmulo sobre  $I_{pc}$  da genisteína e daidzeína ( $\approx 5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ ) em tampão fosfato:metanol (8:2, v/v -  $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ ), pH 7,5, na presença de  $2,55 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  de surfactante BCTA. Parâmetros:  $t_{ac}$ : 60 s;  $E_{sw}$ : 30 mV;  $f$ : 60 Hz;  $\Delta E_s$ : 5 mV..... 103

**Figura 76:** Efeito da amplitude dos pulsos sobre  $I_{pc}$  da genisteína e da daidzeína ( $\approx 5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ ) em tampão fosfato:metanol (8:2, v/v -  $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ ), pH 7,5, na presença de  $2,55 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  de surfactante BCTA. Parâmetros:  $t_{ac}$ : 60 s;  $E_{ac}$ : 0 V;  $f$ : 60 Hz;  $\Delta E_s$ : 5 mV..... 105

**Figura 77:** Efeito da amplitude dos pulsos ( $E_{sw}$ ) sobre  $E_{pc}$  da genisteína e da daidzeína ( $\approx 5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ ) em tampão fosfato:metanol (8:2, v/v -  $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ ), pH 7,5, na presença de  $2,55 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  de surfactante BCTA. Parâmetros:  $t_{ac}$ : 60 s;  $E_{ac}$ : 0 V;  $f$ : 60 Hz;  $\Delta E_s$ : 5 mV..... 105

**Figura 78:** Voltamogramas de onda quadrada de redução da genisteína e daidzeína ( $\approx 5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ ) em diferentes valores de amplitude de pulso. Onde (.....) Branco: tampão fosfato:metanol (8:2, v/v -  $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ ), pH 7,5, na presença de  $2,55 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  de surfactante BCTA. Parâmetros:  $t_{ac}$ : 60 s;  $E_{ac}$ : 0 V;  $f$ : 60 Hz;  $\Delta E_s$ : 5 mV... 106

**Figura 79:** Efeito da frequência de aplicação dos pulsos sobre  $I_{pc}$  da daidzeína e da genisteína ( $\approx 5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ ) em tampão fosfato:metanol (8:2, v/v -  $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ ), pH 7,5, na presença de  $2,55 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  de surfactante BCTA. Parâmetros:  $t_{ac}$ : 60 s;  $E_{ac}$ : 0 V;  $E_{sw}$ : 30 mV;  $\Delta E_s$ : 5 mV..... 107

**Figura 80:** Voltamogramas de onda quadrada de redução da daidzeína e da genisteína ( $\approx 5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ ) em diferentes valores de frequência de aplicação dos pulsos. Onde (.....) Branco: tampão fosfato:metanol (8:2, v/v -  $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ ), pH 7,5, na presença de  $2,55 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  de surfactante BCTA. Parâmetros:  $t_{ac}$ : 60 s;  $E_{ac}$ : 0 V;  $E_{sw}$ : 30 mV;  $\Delta E_s$ : 5 mV..... 108

**Figura 81:** Efeito do incremento de varredura sobre  $I_{pc}$  da daidzeína e da genisteína ( $\approx 5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ ) em tampão fosfato:metanol (8:2, v/v -  $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ ), pH 7,5, na presença de  $2,55 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  de surfactante BCTA. Parâmetros:  $t_{ac}$ : 60 s;  $E_{ac}$ : 0 V;  $E_{sw}$ : 30 mV;  $f$ : 60 Hz..... 109

**Figura 82:** Voltamogramas de onda quadrada de redução da daidzeína e da genisteína ( $\approx 5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ ) em diferentes valores de incremento de varredura. Onde (.....) Branco: tampão fosfato:metanol (8:2, v/v -  $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ ), pH 7,5, na presença de  $2,55 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  de surfactante BCTA. Parâmetros:  $t_{ac}$ : 60 s;  $E_{ac}$ : 0 V;  $E_{sw}$ : 30 mV;  $f$ : 60 Hz..... 109

**Figura 83:** Voltamogramas de redução da daidzeína e genisteína em tampão fosfato:metanol (8:2, v/v) - pH7,5, na presença de BCTA ( $2,55 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ ); onde: (a)  $1,4 \cdot 10^{-6}$ , (b)  $2,7 \cdot 10^{-6}$ , (c)  $4,1 \cdot 10^{-6}$ , (d)  $5,4 \cdot 10^{-6}$ , (e)  $6,8 \cdot 10^{-6}$ , (f)  $8,1 \cdot 10^{-6}$ , (g)  $9,4 \cdot 10^{-6}$ , (h)  $1,1 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ . Parâmetros:  $t_{ac} = 60 \text{ s}$ ,  $E_{ac} = 0 \text{ V}$ ,  $f = 60 \text{ Hz}$ ,  $E_{sw} = 30 \text{ mV}$ ,  $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$ ..... 111

**Figura 84:** Curvas de calibração mostrando a dependência de  $I_{pc}$  em função da concentração de daidzeína e de genisteína, no intervalo de  $1,4 \times 10^{-6}$  a  $1,1 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ..... 112

**Figura 85:** Influência do tempo de incubação na resposta da atividade enzimática. Produção de  $\beta$ -glucosidase por fermentação semi-sólida utilizando *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae*..... 114

**Figura 86:** Influência do tempo de armazenamento dos extratos enzimáticos brutos

e purificados de *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger* na atividade enzimática..... 117

**Figura 87:** Perfis voltamétricos dos extratos brutos e purificados da enzima  $\beta$ -glicosidase a partir dos fungos: **(A)** *Aspergillus niger* bruto; **(B)** *Aspergillus oryzae* bruto; **(C)** *Aspergillus niger* acetona; **(D)** *Aspergillus oryzae* etanol. Onde: (....) Branco: tampão fosfato:metanol (8:2, v/v - 0,04 mol.L<sup>-1</sup>) - pH7,5 + 2,21.10<sup>-4</sup> mol.L<sup>-1</sup> de BCTA; (---) 50  $\mu$ L dos extratos enzimáticos de  $\beta$ -glicosidase; (—) Adição dos padrões de daidzeína e genisteína a 1,1.10<sup>-5</sup> mol.L<sup>-1</sup>. Parâmetros:  $t_{ac}$ : 50s,  $E_{ac}$ : 0 V;  $f$ : 100 Hz,  $E_{sw}$ : 30mV,  $\Delta E_s$ : 6 mV..... 118

**Figura 88:** Perfil voltamétrico das isoflavonas glicosiladas **(A)** Solução contendo 1,2.10<sup>-5</sup> mol.L<sup>-1</sup> de daidzina **(B)** Solução contendo 3,0.10<sup>-6</sup> mol.L<sup>-1</sup> de genistina. Branco: tampão fosfato:metanol (8:2, v/v) - pH7,5 (0,04 mol.L<sup>-1</sup>), na presença de BCTA (2,21.10<sup>-4</sup> mol.L<sup>-1</sup>). Parâmetros:  $t_{ac}$ : 50s,  $E_{ac}$ : 0 V;  $f$ : 100 Hz,  $E_{sw}$ : 30mV,  $\Delta E_s$ : 6 mV, utilizando eletrodo de gota pendente de mercúrio..... 120

**Figura 89:** Voltamogramas de onda quadrada referente às análises de determinação de daidzeína obtida após a conversão pela enzima  $\beta$ -glicosidase a partir dos fungos: **(A)** *Aspergillus niger* bruto; **(B)** *Aspergillus oryzae* bruto; **(C)** *Aspergillus niger* acetona; **(D)** *Aspergillus oryzae* etanol. Onde: (.....) Branco: tampão fosfato:metanol (8:2, v/v - 0,04 mol.L<sup>-1</sup>) - pH7,5 + 2,21.10<sup>-4</sup> mol.L<sup>-1</sup> de BCTA; (-.-.-) adição de 200  $\mu$ L da solução hidrolisada; (—) Adições do padrão de daidzeína. Parâmetros:  $t_{ac}$ : 50s,  $E_{ac}$ : 0 V;  $f$ : 100 Hz,  $E_{sw}$ : 30mV,  $\Delta E_s$ : 6 mV, utilizando eletrodo de gota pendente de mercúrio..... 122

**Figura 90:** Voltamogramas de onda quadrada referente às análises de determinação de genisteína obtida após a conversão pela enzima  $\beta$ -glicosidase a partir dos fungos: **(A)** *Aspergillus niger* bruto; **(B)** *Aspergillus oryzae* bruto; **(C)** *Aspergillus niger* acetona; **(D)** *Aspergillus oryzae* etanol. Onde: (.....) Branco: tampão fosfato:metanol (8:2, v/v - 0,04 mol.L<sup>-1</sup>) - pH7,5 + 2,21.10<sup>-4</sup> mol.L<sup>-1</sup> de BCTA; (-.-.-) adição de 200  $\mu$ L da solução hidrolisada; (—) Adições do padrão de genisteína. Parâmetros:  $t_{ac}$ : 50s,  $E_{ac}$ : 0 V;  $f$ : 100 Hz,  $E_{sw}$ : 30mV,  $\Delta E_s$ : 6 mV, utilizando eletrodo de gota pendente de mercúrio..... 124

**Figura 91:** Influência da quantidade de enzima  $\beta$ -glicosidase de *Aspergillus niger* (extrato purificado com acetona) empregada na hidrólise das isoflavonas

glicosiladas para obtenção das isoflavonas agliconas. Onde: **(A)** Apresenta as concentrações de daidzeína e **(B)** as concentrações de genisteína encontradas pela técnica de VOQ em HMDE, após a hidrólise nas amostras de farinha de soja, proteína de soja e medicamento fitoterápico..... 127

**Figura 92:** Voltamogramas de onda quadrada referente às análises de daidzeína e genisteína em farinha de soja **(A)**, proteína de soja **(B)** e medicamento fitoterápico **(C)**, após hidrólise enzimática; onde: (.....) Branco: tampão fosfato:metanol (8:2, v/v) - pH7,5 ( $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ ), na presença de BCTA ( $2,21 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ ); (---) 30  $\mu\text{L}$  do extrato hidrolizado; (—) adições dos padrões de daidzeína e genisteína. Parâmetros:  $t_{ac}$ : 50s,  $E_{ac}$ : 0 V;  $f$ : 100 Hz,  $E_{sw}$ : 30mV,  $\Delta E_s$ : 6 mV, utilizando eletrodo de gota pendente de mercúrio..... 128

**Figura 93:** Curvas de recuperação da daidzeína e genisteína obtidas após as análises das amostras de farinha de soja **(A)**, proteína de soja **(B)** e medicamento fitoterápico **(C)** utilizando a técnica de VOQ em HMDE..... 129

**Figura 94:** Curvas da dependência de  $I_{pc}$  com a concentração de daidzeína ou de genisteína para a quantificação destas isoflavonas agliconas em farinha de soja **(A)**, proteína de soja **(B)** e medicamento fitoterápico **(C)** utilizando a técnica de VOQ em HMDE..... 130

**Figura 95:** Voltamogramas de onda quadrada referente às análises de daidzeína e genisteína em farinha de soja **(A)**, proteína de soja **(B)** e medicamento fitoterápico **(C)**, após hidrólise enzimática; onde: (.....) Branco: tampão fosfato:metanol (8:2, v/v) - pH7,5 ( $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ ), na presença de BCTA ( $2,55 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ ); (---) 50  $\mu\text{L}$  do extrato hidrolizado; (—) adições dos padrões de daidzeína e genisteína. Parâmetros:  $t_{ac} = 60 \text{ s}$ ,  $E_{ac} = 0 \text{ V}$ ,  $f = 60 \text{ Hz}$ ,  $E_{sw} = 30 \text{ mV}$ ,  $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$ , utilizando eletrodo sólido de amálgama de prata..... 132

**Figura 96:** Curvas de recuperação da daidzeína e genisteína obtidas após as análises das amostras de farinha de soja **(A)**, proteína de soja **(B)** e medicamento fitoterápico **(C)** utilizando a técnica de VOQ em AgSAE..... 133

**Figura 97:** Curvas da dependência de  $I_{pc}$  com a concentração de daidzeína ou de genisteína para a quantificação destas isoflavonas agliconas em farinha de soja **(A)**,

proteína de soja (**B**) e medicamento fitoterápico (**C**) utilizando a técnica de VOQ em AgSAE..... 134

**Figura 98:** Perfil cromatográfico do padrão daidzeína nas concentrações injetadas entre 13,75 e 126,50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  com  $t_R$  de 32,071 minutos. Inserção: Curva analítica obtida para daidzeína. Fase Móvel: gradiente de solvente **A**: 0,1 % de ácido acético glacial em água e solvente **B**: 0,1 % de ácido acético glacial em acetonitrila, coluna C18 OmniSpher, fluxo de 1,5  $\text{mL.min}^{-1}$ , detecção em 260 nm..... 136

**Figura 99:** Perfil cromatográfico do padrão genisteína nas concentrações injetadas entre 13,51 e 124,29  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  com  $t_R$  de 40,242 minutos. Inserção: Curva analítica obtida para genisteína. Fase Móvel: gradiente de solvente **A**: 0,1 % de ácido acético glacial em água e solvente **B**: 0,1 % de ácido acético glacial em acetonitrila, coluna C18 OmniSpher, fluxo de 1,5  $\text{mL.min}^{-1}$ , detecção em 260 nm..... 137

**Figura 100:** Gráficos comparativos das concentrações de daidzeína e de genisteína obtidas pelas técnicas analíticas de VOQ-HMDE, VOQ-AgSAE e CLAE-UV em farinha de soja, proteína de soja e medicamento fitoterápico..... 139

**Figura 101:** Voltamogramas de onda quadrada de redução da formononetina e biochanina A, onde: (.....) Tampão fosfato:metanol (8:2, v/v), pH 7,5 - 0,04  $\text{mol.L}^{-1}$ ; (—) solução de biochanina A ( $2,02 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ) e formononetina ( $1,71 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ). Parâmetros:  $t_{ac}$ : 0 s;  $E_{ac}$ : 0 V;  $f$ : 60 Hz;  $\Delta E_s$ : 5 mV;  $E_{sw}$ : 30 mV..... 141

**Figura 102:** Voltamogramas de onda quadrada para: (**A**) Solução de  $1,71 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$  de formononetina (—); (**B**) Solução de  $2,02 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$  de biochanina A (—). Onde: (.....) Branco: tampão fosfato:metanol (8:2, v/v - 0,04  $\text{mol.L}^{-1}$ ), pH 7,5 e (----) Branco + Surfactante catiônico BCTA ( $2,47 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ ). Parâmetros:  $t_{ac}$ : 0 s;  $E_{ac}$ : 0 V;  $f$ : 60 Hz;  $\Delta E_s$ : 5 mV;  $E_{sw}$ : 30 mV. .... 142

**Figura 103:** Voltamogramas de onda quadrada de redução de  $2,52 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$  de formononetina no intervalo de pH de 3,5 a 9,0 em tampão BR:metanol (8:2, v/v), 0,04  $\text{mol.L}^{-1}$ , na presença de  $2,47 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  de surfactante BCTA. Parâmetros:  $t_{ac}$ : 0 s;  $E_{ac}$ : 0 V;  $f$ : 60 Hz;  $\Delta E_s$ : 5 mV;  $E_{sw}$ : 30 mV..... 143

**Figura 104:** (**A**) Variação do  $E_{pc}$  da formononetina em função do pH do meio. (**B**)

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Variação da $I_{pc}$ da formononetina em função do pH do meio. Eletrólito suporte: tampão BR:metanol (8:2, v/v) - $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ , na presença de $2,47.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de surfactante catiônico BCTA.....                                                                                                                                                               | 144 |
| <b>Figura 105:</b> Esquema de desprotonação da formononetina.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 144 |
| <b>Figura 106:</b> Voltamogramas de onda quadrada de redução de $2,52.10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ de formononetina no intervalo de pH de 6,0 a 8,0, em tampão fosfato:metanol (8:2, v/v), $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ , na presença de $2,47.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de surfactante BCTA. Parâmetros: $t_{ac}$ : 0 s; $E_{ac}$ : 0 V; $f$ : 60 Hz; $\Delta E_s$ : 5 mV; $E_{sw}$ : 30 mV..... | 145 |
| <b>Figura 107:</b> Variação de $I_{pc}$ de uma solução de formononetina ( $2,52.10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ) em função do pH do meio, na presença de $2,47.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de surfactante catiônico BCTA, onde: (—■—) Tampão BR:metanol (8:2, v/v), pH de 6,0 a 8,0; (—○—) Tampão fosfato:metanol (8:2, v/v), pH 6,0 a 8,0.....                                                    | 146 |
| <b>Figura 108:</b> Voltamogramas de onda quadrada de redução de $2,97.10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ de biochanina A no intervalo de pH de 3,0 a 9,0, em tampão BR:metanol (8:2, v/v), $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ , na presença de $2,47.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de surfactante BCTA. Parâmetros: $t_{ac}$ : 0 s; $E_{ac}$ : 0 V; $f$ : 60 Hz; $\Delta E_s$ : 5 mV; $E_{sw}$ : 30 mV.....       | 147 |
| <b>Figura 109:</b> (A) Variação do $E_{pc}$ da biochanina A em função do pH do meio. (B) Variação da $I_{pc}$ da biochanina A em função do pH do meio. Eletrólito suporte: tampão BR:metanol (8:2, v/v) - $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ , na presença de $2,47.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de surfactante catiônico BCTA.....                                                                       | 147 |
| <b>Figura 110:</b> Esquema de desprotonação da biochanina A.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 148 |
| <b>Figura 111:</b> Voltamogramas de onda quadrada de redução de $2,97.10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ de biochanina A no intervalo de pH de 6,0 a 8,0, em tampão fosfato:metanol (8:2, v/v), $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ , na presença de $2,47.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de surfactante BCTA. Parâmetros: $t_{ac}$ : 0 s; $E_{ac}$ : 0 V; $f$ : 60 Hz; $\Delta E_s$ : 5 mV; $E_{sw}$ : 30 mV.....  | 149 |
| <b>Figura 112:</b> Variação de $I_{pc}$ de uma solução de biochanina A ( $2,97.10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ) em função do pH do meio, na presença de $2,47.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de surfactante catiônico BCTA, onde: (—■—) Tampão BR:metanol (8:2, v/v), pH de 6,0 a 8,0; (—○—) Tampão fosfato:metanol (8:2, v/v), pH 6,0 a 8,0.....                                                     | 150 |

**Figura 113:** Voltamogramas de onda quadrada de redução da formononetina ( $2,52 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ) e biochanina A ( $2,97 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ) na presença de  $2,47 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  de surfactante BCTA para diferentes eletrólitos suporte, onde: (a) Tampão BR:metanol (8:2, v/v –  $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ ), pH 6,5; (b) Tampão BR:metanol (8:2, v/v –  $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ ), pH 7,0; (c) Tampão fosfato:metanol (8:2, v/v –  $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ ), pH 7,5; (d) Tampão fosfato:metanol (8:2, v/v –  $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ ), pH 8,0. Parâmetros:  $t_{ac}$ : 0 s;  $E_{ac}$ : 0 V;  $f$ : 60 Hz;  $\Delta E_s$ : 5 mV;  $E_{sw}$ : 30 mV..... 151

**Figura 114:** Voltamogramas de onda quadrada de redução da formononetina e biochanina A em diferentes concentrações de BCTA. Onde: (....) Tampão fosfato:metanol (8:2, v/v -  $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ ), pH 7,5 + solução de formononetina e biochanina A na concentração de aproximadamente  $3 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ . (a-j) Adições do surfactante BCTA: (a)  $5,71 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ; (b)  $6,97 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ; (c)  $8,22 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ; (d)  $9,47 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ; (e)  $1,81 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ ; (f)  $3,10 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ ; (g)  $3,73 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ ; (h)  $4,99 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ . Parâmetros:  $t_{ac}$ : 0 s;  $E_{ac}$ : 0 V;  $f$ : 60 Hz;  $\Delta E_s$ : 5 mV;  $E_{sw}$ : 30 mV..... 152

**Figura 115:** (A) Variação do  $E_{pc}$  da formononetina e da biochanina A e (B) Variação da  $I_{pc}$  da formononetina e da biochanina A em função da concentração do surfactante BCTA ( $5,71 \cdot 10^{-5}$  a  $4,99 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ )..... 152

**Figura 116:** Efeito do tempo de acúmulo sobre  $I_{pc}$  da formononetina ( $1,27 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ) e biochanina A ( $1,02 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ) em tampão fosfato:metanol (8:2, v/v -  $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ ), pH 7,5, na presença de  $3,10 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  de surfactante BCTA. Parâmetros:  $E_{ac}$ : 0 V;  $E_{sw}$ : 30 mV;  $f$ : 60 Hz;  $\Delta E_s$ : 5 mV..... 153

**Figura 117:** Efeito do potencial de acúmulo sobre  $I_{pc}$  da formononetina ( $6,42 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ ) e biochanina A ( $5,06 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ ) em tampão fosfato:metanol (8:2, v/v -  $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ ), pH 7,5, na presença de  $3,10 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  de surfactante BCTA. Parâmetros:  $t_{ac}$ : 60 s;  $E_{sw}$ : 30 mV;  $f$ : 60 Hz;  $\Delta E_s$ : 5 mV..... 154

**Figura 118:** Voltamogramas de onda quadrada de redução da formononetina ( $4,29 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ ) e biochanina A ( $3,04 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ ) em diferentes valores de amplitude de pulso. Onde (.....) Branco: tampão fosfato:metanol (8:2, v/v -  $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ ), pH 7,5, na presença de  $3,10 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  de surfactante BCTA.

Parâmetros:  $t_{ac}$ : 60 s;  $E_{ac}$ : -0,3 V;  $f$ : 60 Hz;  $\Delta E_s$ : 5 mV..... 155

**Figura 119:** Efeito da amplitude dos pulsos ( $E_{sw}$ ) sobre  $E_{pc}$  da formononetina ( $4,29 \cdot 10^{-6}$  mol.L<sup>-1</sup>) e biochanina A ( $3,04 \cdot 10^{-6}$  mol.L<sup>-1</sup>) em tampão fosfato:metanol (8:2, v/v -  $0,04$  mol.L<sup>-1</sup>), pH 7,5, na presença de  $3,10 \cdot 10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup> de surfactante BCTA. Parâmetros:  $t_{ac}$ : 60 s;  $E_{ac}$ : -0,3 V;  $f$ : 60 Hz;  $\Delta E_s$ : 5 mV..... 156

**Figura 120:** Efeito da amplitude dos pulsos sobre  $I_{pc}$  da formononetina ( $4,29 \cdot 10^{-6}$  mol.L<sup>-1</sup>) e biochanina A ( $3,04 \cdot 10^{-6}$  mol.L<sup>-1</sup>) em tampão fosfato:metanol (8:2, v/v -  $0,04$  mol.L<sup>-1</sup>), pH 7,5, na presença de  $3,10 \cdot 10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup> de surfactante BCTA. Parâmetros:  $t_{ac}$ : 60 s;  $E_{ac}$ : -0,3 V;  $f$ : 60 Hz;  $\Delta E_s$ : 5 mV..... 156

**Figura 121:** Efeito da frequência de aplicação dos pulsos sobre  $I_{pc}$  da formononetina ( $4,29 \cdot 10^{-6}$  mol.L<sup>-1</sup>) e biochanina A ( $3,04 \cdot 10^{-6}$  mol.L<sup>-1</sup>) em tampão fosfato:metanol (8:2, v/v -  $0,04$  mol.L<sup>-1</sup>), pH 7,5, na presença de  $3,10 \cdot 10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup> de surfactante BCTA. Parâmetros:  $t_{ac}$ : 60 s;  $E_{ac}$ : -0,3 V;  $E_{sw}$ : 30 mV;  $\Delta E_s$ : 5 mV..... 158

**Figura 122:** Voltamogramas de onda quadrada de redução da formononetina ( $4,29 \cdot 10^{-6}$  mol.L<sup>-1</sup>) e biochanina A ( $3,04 \cdot 10^{-6}$  mol.L<sup>-1</sup>) em diferentes valores de frequência de aplicação dos pulsos. Onde (.....) Branco: tampão fosfato:metanol (8:2, v/v -  $0,04$  mol.L<sup>-1</sup>), pH 7,5, na presença de  $3,10 \cdot 10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup> de surfactante BCTA. Parâmetros:  $t_{ac}$ : 60 s;  $E_{ac}$ : -0,3 V;  $E_{sw}$ : 30 mV;  $\Delta E_s$ : 5 mV..... 158

**Figura 123:** Efeito do incremento de varredura sobre  $I_{pc}$  da formononetina ( $4,29 \cdot 10^{-6}$  mol.L<sup>-1</sup>) e biochanina A ( $3,04 \cdot 10^{-6}$  mol.L<sup>-1</sup>) em tampão fosfato:metanol (8:2, v/v -  $0,04$  mol.L<sup>-1</sup>), pH 7,5, na presença de  $3,10 \cdot 10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup> de surfactante BCTA. Parâmetros:  $t_{ac}$ : 60 s;  $E_{ac}$ : -0,3 V;  $E_{sw}$ : 30 mV;  $f$ : 60 Hz..... 159

**Figura 124:** Voltamogramas de onda quadrada de redução da formononetina ( $4,29 \cdot 10^{-6}$  mol.L<sup>-1</sup>) e biochanina A ( $3,04 \cdot 10^{-6}$  mol.L<sup>-1</sup>) em diferentes valores de incremento de varredura. Onde (.....) Branco: tampão fosfato:metanol (8:2, v/v -  $0,04$  mol.L<sup>-1</sup>), pH 7,5, na presença de  $3,10 \cdot 10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup> de surfactante BCTA. Parâmetros:  $t_{ac}$ : 60 s;  $E_{ac}$ : -0,3 V;  $E_{sw}$ : 30 mV;  $f$ : 60 Hz..... 160

**Figura 125:** Voltamogramas de redução da formononetina e biochanina A em tampão fosfato:metanol (8:2, v/v) - pH7,5, na presença de BCTA ( $3,10 \cdot 10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup>); onde: (a)  $5,21 \cdot 10^{-7}$  mol.L<sup>-1</sup>, (b)  $7,79 \cdot 10^{-7}$  mol.L<sup>-1</sup>, (c)  $1,29 \cdot 10^{-6}$  mol.L<sup>-1</sup>, (d)

$2,05 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ , (e)  $2,80 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ , (f)  $3,54 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ , (g)  $4,27 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ .

Parâmetros:  $t_{ac} = 60 \text{ s}$ ,  $E_{ac} = -0,3 \text{ V}$ ,  $f = 60 \text{ Hz}$ ,  $E_{sw} = 30 \text{ mV}$ ,  $\Delta E_s = 6 \text{ mV}$ ..... 162

**Figura 126:** Curvas de calibração mostrando a dependência de  $I_{pc}$  em função da concentração de formononetina (**A**) e de biochanina A (**B**), no intervalo de  $5,21 \cdot 10^{-7}$  a  $4,99 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ ..... 162

**Figura 127:** Voltamogramas de onda quadrada referente à análise de formononetina e biochanina A em medicamento fitoterápico do extrato de *Trifolium pratense*; onde: (...) Branco: tampão fosfato:metanol (8:2, v/v -  $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ ) - pH7,5, na presença de BCTA ( $3,10 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ ); (**a**) 30  $\mu\text{L}$  do extrato da amostra; (**P<sub>1</sub> – P<sub>4</sub>**) adições dos padrões de formononetina e biochanina A. Parâmetros:  $t_{ac}$ : 60s,  $E_{ac}$ : - 0,3 V;  $f$ : 60 Hz,  $E_{sw}$ : 30mV,  $\Delta E_s$ : 6 mV..... 164

**Figura 128:** Curvas de recuperação da formononetina (**A**) e biochanina (**B**) obtidas após a análise da amostra de medicamento fitoterápico do extrato de *Trifolium pratense* utilizando a técnica de VOQ em AgSAE..... 165

**Figura 129:** Curvas da dependência de  $I_{pc}$  com a concentração de formononetina (**A**) e biochanina (**B**) para a quantificação destas isoflavonas agliconas em medicamento fitoterápico do extrato de *Trifolium pratense* utilizando a técnica de VOQ em AgSAE..... 166

---

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1:</b> Influência do tempo de hidrólise ( $\text{HCl} - 2 \text{ mol.L}^{-1}$ ) para a obtenção de agliconas, a partir do extrato metanólico da farinha de soja desengordurada.....                                          | 16 |
| <b>Tabela 2:</b> Biotransformação de isoflavonas glicosiladas em agliconas.....                                                                                                                                                        | 18 |
| <b>Tabela 3:</b> Porcentagem de recuperação de isoflavonas agliconas após a extração utilizando uma variedade de métodos para remover os carboidratos conjugados.....                                                                  | 19 |
| <b>Tabela 4:</b> Técnicas analíticas empregadas na análise de fitoestrogênios da classe das isoflavonas em diversificados tipos de amostras.....                                                                                       | 20 |
| <b>Tabela 5:</b> Determinação de isoflavonas por CLAE ou CG.....                                                                                                                                                                       | 22 |
| <b>Tabela 6:</b> Testes diagnósticos em VC para processos reversíveis, irreversíveis e quase-reversíveis.....                                                                                                                          | 31 |
| <b>Tabela 7:</b> Dados obtidos para regressão linear dos dois segmentos apresentados no estudo da influência do pH no $E_{pc}$ da daidzeína em surfactante BCTA através da VC.....                                                     | 54 |
| <b>Tabela 8:</b> Dados obtidos para regressão linear dos dois segmentos apresentados no estudo da influência do pH no $E_{pc}$ da genisteína em surfactante BCTA através da VC.....                                                    | 57 |
| <b>Tabela 9:</b> Valores da inclinação obtidos para variação de $\log I_{pc}$ vs. $\log \nu$ nos voltamogramas cíclicos de redução da daidzeína e da genisteína em BCTA.....                                                           | 64 |
| <b>Tabela 10:</b> Cálculo teórico de $an$ e do número de elétrons ( $n$ ), envolvidos na redução da daidzeína para cada valor de pH analisado, a partir do gráfico do $E_{pc}$ vs. $\log \nu$ obtido pelos voltamogramas cíclicos..... | 69 |
| <b>Tabela 11:</b> Cálculo teórico de $an$ e do número de elétrons ( $n$ ), envolvidos na redução da genisteína para cada valor de pH analisado, a partir do gráfico do $E_{pc}$ vs.                                                    |    |

---

---

|                                                                                                                                                                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>log <math>\nu</math></b> obtido pelos voltamogramas cíclicos.....                                                                                                                                            | 70  |
| <b>Tabela 12:</b> Valores da inclinação obtidos para variação de <b>log <math>I_{pc}</math></b> vs. <b>log <math>\nu</math></b> nos voltamogramas cíclicos de redução da daidzeína e da genisteína em DSS.....  | 82  |
| <b>Tabela 13:</b> Cálculo teórico do número de elétrons ( <b><math>n</math></b> ) envolvidos na redução da daidzeína e da genisteína para cada valor de pH na presença do surfactante DSS.....                  | 85  |
| <b>Tabela 14:</b> Dados obtidos para regressão linear dos três segmentos apresentados no estudo da influência do pH sobre o $E_{pc}$ da daidzeína através da VOQ.....                                           | 93  |
| <b>Tabela 15:</b> Dados obtidos para regressão linear dos três segmentos apresentados no estudo da influência do pH sobre o $E_{pc}$ da genisteína através da VOQ.....                                          | 97  |
| <b>Tabela 16:</b> Parâmetros instrumentais para análise de daidzeína e genisteína pela técnica de VOQ em eletrodo sólido de amálgama de prata.....                                                              | 110 |
| <b>Tabela 17:</b> Parâmetros estudados para a validação do método eletroanalítico na análise de daidzeína e genisteína por VOQ em eletrodo sólido de amálgama de prata.                                         | 112 |
| <b>Tabela 18:</b> Estudo do tempo de incubação das linhagens <i>Aspergillus niger</i> e <i>Aspergillus oryzae</i> por fermentação semi-sólida.....                                                              | 115 |
| <b>Tabela 19:</b> Purificação parcial da $\beta$ -glucosidase de <i>Aspergillus niger</i> e <i>Aspergillus oryzae</i> .....                                                                                     | 116 |
| <b>Tabela 20:</b> Produção do extrato bruto e do extrato parcialmente purificado de $\beta$ -glucosidase de <i>Aspergillus niger</i> e <i>Aspergillus oryzae</i> para aplicação nas hidrólises enzimáticas..... | 120 |
| <b>Tabela 21:</b> Determinação de daidzeína nas soluções hidrolisadas, através da técnica de VOQ em eletrodo HMDE.....                                                                                          | 123 |
| <b>Tabela 22:</b> Determinação de genisteína nas soluções hidrolisadas, através da técnica de VOQ em eletrodo HMDE.....                                                                                         | 125 |
| <b>Tabela 23:</b> Resultados dos estudos de recuperação de daidzeína e genisteína nas amostras hidrolisadas dos produtos de soja, através da técnica de VOQ utilizando HMDE.....                                | 129 |

---

---

|                                                                                                                                                                                                                                            |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Tabela 24:</b> Determinação de daidzeína e genisteína em produtos de soja após hidrólise enzimática com $\beta$ -glicosidase de <i>Aspergillus niger</i> purificado com acetona (2 V), através da técnica de VOQ em eletrodo HMDE.....  | 131 |
| <b>Tabela 25:</b> Resultados dos estudos de recuperação de daidzeína e genisteína nas amostras hidrolisadas dos produtos de soja, através da técnica de VOQ utilizando AgSAE.....                                                          | 134 |
| <b>Tabela 26:</b> Determinação de daidzeína e genisteína em produtos de soja após hidrólise enzimática com $\beta$ -glicosidase de <i>Aspergillus niger</i> purificado com acetona (2 V), através da técnica de VOQ em eletrodo AgSAE..... | 135 |
| <b>Tabela 27:</b> Conteúdo de genisteína e daidzeína encontrados nos produtos de soja por CLAE.....                                                                                                                                        | 138 |
| <b>Tabela 28:</b> Comparação entre os resultados obtidos para quantificação de daidzeína e genisteína nos derivados de soja através das metodologias de VOQ-HMDE, VOQ-AgSAE e CLAE-UV.....                                                 | 139 |
| <b>Tabela 29:</b> Dados obtidos para regressão linear dos dois segmentos apresentados no estudo da influência do pH sobre o $E_{pc}$ da formononetina através da VOQ.....                                                                  | 144 |
| <b>Tabela 30:</b> Dados obtidos para regressão linear dos dois segmentos apresentados no estudo da influência do pH sobre o $E_{pc}$ da biochanina A através da VOQ. ....                                                                  | 148 |
| <b>Tabela 31:</b> Parâmetros instrumentais para análise de formononetina e biochanina A pela técnica de VOQ em eletrodo sólido de amálgama de prata.....                                                                                   | 161 |
| <b>Tabela 32:</b> Parâmetros estudados para a validação do método eletroanalítico na análise de formononetina e biochanina A por VOQ em eletrodo sólido de amálgama de prata.....                                                          | 163 |
| <b>Tabela 33:</b> Resultados dos estudos de recuperação de formononetina e biochanina A nas amostras de medicamento fitoterápico, através da técnica de VOQ utilizando AgSAE.....                                                          | 166 |
| <b>Tabela 34:</b> Determinação de formononetina e biochanina A em medicamento fitoterápico do extrato de <i>Trifolium pratense</i> por VOQ em eletrodo AgSAE.....                                                                          | 167 |

---

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$\alpha$  = coeficiente de transferência eletrônica

$v$  = velocidade de varredura

$\Delta E_{p/2}$  = largura da meia altura

$\Delta E_s$  = incremento de varredura de potencial

[ ] = concentração

$a$  = coeficiente linear

$b$  = coeficiente angular

BR = Britton-Robinson

BCTA = brometo de cetiltrimetilamônio

Bioc. = biochanina A

CG = cromatografia gasosa

CG-MS = cromatografia gasosa com espectrometria de massas

CLAE = cromatografia líquida de alta eficiência

CLAE-CEAD = cromatografia líquida de alta eficiência com detector de eletrodo de arranjos coulométricos

CLAE-ED = cromatografia líquida de alta eficiência com detector eletroquímico

CLAE-MS = cromatografia líquida de alta eficiência com espectrometria de massas

CLAE-PAD = cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjos de fotodiodo

CLAE-UV = cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultravioleta

Daid. = daidzeína

$DP_a$  = desvio padrão da média aritmética da corrente do branco

DSS = dodecil sulfato de sódio

$e^-$  = elétron

$E_{ac}$  = potencial de acúmulo

EFS = extração em fase sólida

$E_p$  = potencial de pico

$E_{pa}$  = potencial de pico anódico

$E_{pc}$  = potencial de pico catódico

$E_r$  = erro relativo

$E_{sw}$  = amplitude de pulso para voltametria de onda quadrada e de pulso diferencial

---

Form. = Formononetina

$f$  = frequência de aplicação de pulsos

Gen. = genisteína

Hg = mercúrio

HMDE = eletrodo de gota pendente de mercúrio

Hz = hertz

$I_p$  = corrente de pico

$I_{pa}$  = corrente de pico anódico

$I_{pc}$  = corrente de pico catódico

LD = limite de detecção

LQ = limite de quantificação

$m/v$  = massa/volume

$n$  = número de elétrons

PPD = polarografia de pulso diferencial

$r$  = coeficiente de correlação

$R$  = recuperação

$R_M$  = recuperação média

rpm = rotação por minuto

RSD = desvio padrão relativo

$S$  = desvio padrão

$t_{ac}$  = tempo de acúmulo

$t_R$  = tempo de retenção

$t_{RM}$  = tempo de retenção médio

UV-Vis = ultravioleta-visível

V = volt

VOQ = voltametria de onda quadrada

VPD = voltametria de pulso diferencial

*vs.* = *versus*

$Z$  = número de prótons

## RESUMO

Sabendo da importância dos compostos fitoestrogênicos quanto às propriedades hormonais e da necessidade de um controle de qualidade do conteúdo de compostos bioativos em alimentos e medicamentos fitoterápicos, uma metodologia para determinação simultânea das principais isoflavonas da soja, daidzeína e genisteína, foi desenvolvida através da voltametria de onda quadrada (VOQ) utilizando eletrodo sólido de amálgama de prata (AgSAE). A presença do surfactante catiônico BCTA durante as reduções da daidzeína e genisteína proporcionou uma boa separação e definição dos picos das isoflavonas, com  $E_{pc} = -1,45 \text{ V vs. Ag/AgCl}$  para daidzeína e  $E_{pc} = -1,56 \text{ V vs. Ag/AgCl}$  para genisteína. Os parâmetros instrumentais que influem na técnica de VOQ foram otimizados, assim como o tipo do eletrólito suporte e a concentração do surfactante BCTA. Nas melhores condições, os limites de quantificação foram de  $1,59 \times 10^{-6}$  e  $1,87 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ , para daidzeína e genisteína, respectivamente. Devido à existência de 12 compostos isoflavônicos na soja, sendo que 9 se apresentam sob a forma glicosilada, tornou-se necessário o uso de hidrólise enzimática nas amostras de soja, antes da aplicação da metodologia desenvolvida. A produção de enzimas  $\beta$ -glicosidase utilizando fungos, *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae*, em meio à fermentação semi-sólida foi avaliada quanto às atividades enzimáticas e específicas, à purificação dos extratos enzimáticos, ao grau de conversão das isoflavonas glicosiladas e às melhores condições nas reações de hidrólise. Nestes estudos, o fungo *Aspergillus niger* purificado com acetona forneceu uma ótima atividade específica e elevado grau de conversão das isoflavonas glicosiladas. A metodologia foi aplicada em produtos comerciais de soja, utilizando a hidrólise enzimática no tratamento das amostras. Outro foco desta pesquisa foi o estudo da interação das isoflavonas com os surfactantes catiônico BCTA e aniônico DSS, devido à grande influência observada pelo uso destes no perfil voltamétrico de redução da daidzeína e genisteína. Os estudos do comportamento de redução das isoflavonas na presença de surfactantes foram realizados em eletrodo de mercúrio de gota pendente, utilizando as técnicas de voltametria cíclica (VC) e cronocoulometria. Na presença de BCTA os processos de redução da daidzeína e da genisteína se mostraram completamente irreversíveis e na presença do surfactante DSS estes processos apresentaram características de reversibilidade. Visando complementar o desenvolvimento e a aplicação de metodologias eletroanalíticas, as isoflavonas formononetina e biochanina A foram estudadas em AgSAE através da técnica de

VOQ. Nesta metodologia o uso do surfactante BCTA também se mostrou fundamental, obtendo a separação e definição dos picos de redução das isoflavonas, com  $E_{pc} = -1,43 \text{ V vs. Ag/AgCl}$  para formononetina e  $E_{pc} = -1,56 \text{ V vs. Ag/AgCl}$  para biochanina. A otimização do tipo de eletrólito suporte, pH, concentração de surfactante BCTA e demais parâmetros instrumentais da técnica de VOQ, permitiu alcançar limites de quantificação de  $5,08 \cdot 10^{-7}$  e  $6,86 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  para a formononetina e biochanina A, respectivamente. Esta metodologia foi aplicada com sucesso em amostras do medicamento fitoterápico do extrato da planta *Trifolium pratense* sem a necessidade do uso de hidrólise enzimática.

**Palavras-Chaves:** *Isoflavona aglicona, surfactante BCTA, enzima  $\beta$ -glucosidase, técnicas eletroquímicas.*

---

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOURI, A.; BOYE, J. I.; BELANGER, D. Soybean isoflavones: Efficacy of extraction conditions and effect of food type on extractability. *Food Research International*, **2005**, 38, 1199–1204;

ADLERCREUTZ, H.; MARKKANEN, H.; WATANABE, S. Plasma concentrations of phyto-oestrogens in Japanese men. *The Lancet*, **1993**, 342, 1209-1210;

AGOSTINHO, S. M. L.; VILLAMIL, R. F. V.; AGOSTINHO NETO, A.; ARANHA, H. O eletrólito suporte e suas múltiplas funções em processos de eletrodo. *Química Nova*, **2004**, 27, 813-817;

AGUIAR, C. L. Transformações física e bioquímica de isoflavonas conjugadas de soja (*Glycine max* L.) e o efeito na atividade biológica *in vitro*. **2004**. 313f. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP;

ALBULESCO, M.; POPOVICI, M. Isoflavones – Biochemistry, pharmacology and therapeutic use. *Revue Roumaine de Chimie*, **2007**, 52 (6), 537–550;

ALEIXO, L. M. Voltametria: Conceitos e Técnicas. *Chemkeys*, **2003**, 1-21. Disponível em: [www.chemkeys.com](http://www.chemkeys.com). Acesso em janeiro de 2008;

ALVES, D. L.; SILVA, C. R. *Fitohormônios: abordagem natural da terapia hormonal*. São Paulo: Atheneu, p. 105, 2002;

ANDERSON, J. W.; B.M. JOHNSTONE, B. M.; COOK-NEWELL, M. E. Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. *The New England Journal of Medicine*, **1995**, 333, 276-282;

ANDLAUER, W.; FÜRST, P. Antioxidative power of phytochemistry with special reference to cereals. *Cereal Foods World*, **1998**, 43, 356-360;

ANSON, F. C.; OSTERYOUNG, R. A. Chronocoulometry: A convenient, rapid and reliable technique for detection and determination of adsorbed reactants. *Journal of Chemical Education*, **1983**, 60 (4), 293;

ANTHONY, M. S.; CLARKSON, T. B.; HUGHES, C. L.; MORGAN, T. M.; BURKE, G. L. Soybean isoflavones improve cardiovascular risk factors without affecting the reproductive system of peripubertal rhesus monkeys. *Journal of Nutrition*, **1996**, 126, 43-50;

ANVISA, **2002**. FAQ – Medicamentos Fitoterápicos: Isoflavonas. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/faqdinamica/index.asp?Secao=Usuario&usersecoes=36&userassunto=136> . Acesso em agosto de 2010;

ANVISA, **2006**. *Normas para habilitação segundo NBR ISO/IEC 17025: Herbarium Laboratório Botânico Ltda*. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/reblas/bio/anali/analitico\\_062.htm](http://www.anvisa.gov.br/reblas/bio/anali/analitico_062.htm). Acesso em janeiro de 2013;

ANVISA, **2013**. *Medicamentos fitoterápicos com registro na ANVISA*. Disponível em: [http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/consulta\\_produto/Medicamentos/frmConsultaMedicamentos.asp](http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/consulta_produto/Medicamentos/frmConsultaMedicamentos.asp). Acesso em fevereiro de 2013;

ARAÚJO, J. M. A.; SILVA, M. V.; CHAVES, J. B. P. Supercritical fluid extraction of daidzein and genistein isoflavones from soybean hypocotyl after hydrolysis with endogenous  $\beta$ -glucosidases. *Food Chemistry*, **2007**, 105, 266–272;

ATKINSON, C.; COMPSTON, J. E.; ROBINS, S. P, BINGHAM, S. A. The effects of isoflavone phytoestrogens on bone: Preliminary results from a large randomized controlled trial [abstract]. *The Endocrine Society's 82nd Annual Meeting Program*, **2000**, 82, 43;

AVRANAS, A.; SAZOU, D. Electroreduction of 2,2'-dinitrobiphenyl in anionic, cationic and nonionic micellar systems. *Journal of colloid and interface science*, **1994**, 164, 309-317;

BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. *Electrochemical methods fundamentals and applications*. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, **2001**;

BAREK, J.; FISHER, J.; NAVRÁTIL, T.; PECKOVÁ, K.; YOSYPCHUK, B.; ZIMA, J.; Nontraditional electrode materials in environmental analysis of biologically active organic compounds. *Electroanalysis*, **2007**, 19, 2003-2014;

BARNES, S.; KIM, H.; XU, J. Soy in the prevention and treatment of chronic diseases. CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, Foz do Iguaçu. *Anais do Congresso*, Londrina: Embrapa, **2002**, 295-308;

BARNES, S.; PETERSON, T. G.; GRUBBS, C.; SETCHELL, K. D. R. Potential role of dietary isoflavones in the prevention of cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **1994**, 354, 135-147;

BELTAGI, A. M. Determination of the antibiotic drug pefloxacin in bulk form, tablets and human serum using square wave cathodic adsorptive stripping voltammetry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2003**, 31, 1079-1088.

BRADLOW, H. L.; SEPKOVIC, D. W. Diet and breast cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **2002**, 963, 247-267;

BRAININA, K. Z. Advances in voltammetry. *Talanta*, **1987**, 34, 41-50;

BRANN, D. W.; HENDRY L. B.; MAHESH, V. B. Emerging diversities in the mechanism of action of steroid hormones. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **1995**, 52, 113-133;

BRETT, A. M. O.; BRETT, C. M. A. *Eletroquímica: princípios, métodos e aplicações*. Coimbra: Livraria Almedina, **1996**;

CARDOSO, A. L.; OLIVEIRA, G. G. Alimentos Funcionais. *Nutri Jr. - Empresa Júnior de Consultoria em Nutrição*, Jornal Eletrônico nº5, **2008**. Disponível em: [http://www.nutrijr.ufsc.br/jornal/jornal\\_eletronico\\_06-08.pdf](http://www.nutrijr.ufsc.br/jornal/jornal_eletronico_06-08.pdf). Acesso em janeiro de 2009;

CARRÃO-PANIZZI, M. C. Apresentação. *Documentos da Embrapa*, **2001**, v. 169 (1), p. 6-7;

CARRÃO-PANIZZI, M. C., MANDARINO, J. M. G. Isoflavonas em produtos comerciais de soja. *Ciência & Tecnologia de Alimentos*, **2004**, 24 (4), 582-586;

CARVALHO, A. C. B.; NUNES, D. S. G.; BARATELLI, T. G.; SHUQAIR, N. S. M. S. A. Q.; NETTO, E. M. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. *T&C Amazônia*, **2007**, 11, 26-32;

CASSIDY, A.; BINGHAM, S.; SETCHELL, K.D. Biological effects of a diet of soy protein rich in isoflavones on the menstrual cycle of premenopausal women. *American Journal of Clinical Nutrition*, **1994**, 60, 333-340;

CÉSAR, I. C.; BRAGA, F. C.; VIANNA-SOARES, C. D.; NUNAN, E. A.; BARBOSA, T. A. F.; MOREIRA-CAMPOS, L. M. Determinação de daidzeína, genisteína e gliciteína em cápsulas de isoflavonas por cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **2007**, 17 (4), 616-625;

CHRISTIE, J. H.; OSTERYOUNG, R. A.; ANSON, F. C. Application of double potential-step chronocoulometry to the study of reactant adsorption: Theory. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, **1967**, 13 (3), 236-244;

CHUANKHAYAN, P.; RIMLUMDUAN, T.; SVASTI, J.; CAIRNS, J. R. K. Hydrolysis of soybean isoflavonoid glycosides by Dalbergia  $\beta$ -glucosidases. *Journal of agricultural and food chemistry*, **2007**, 55, 2407-2412;

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Safras: custos de produção, **2008**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>> Acesso em maio de 2010;

COWARD, L.; SMITH, M.; KIRK, M.; BARNES, S. Chemical modification of isoflavones in soyfoods during cooking and processing. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **1998**, 68, 1486S-1491S;

DANHEL, A.; SHIU, K. K.; YOSYPCHUK, B.; BAREK, J.; PECKOVA, K.; VYSKOCIL, V. The use of silver solid amalgam working electrode for determination of nitrophenols by HPLC with electrochemical detection. *Electroanalysis*, **2009**, 21 (3-5), 303-308;

DE ANGELIS, M.; STROSSI, F.; WAIBEL, M.; KATZENELLENGOBEN, B. S.; KATZENELLENGOBEN, J. A. Isocoumarins as estrogen receptor beta selective ligands: Isomers of isoflavone phytoestrogens and their metabolites. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2005**, 13 (23), 6529-6542;

DE MATOS, M. P.; CASTILHO, M. C.; CAMPOS, M. G.; RAMOS, F.; SILVEIRA, I. Quais os benefícios de uma alimentação rica em fitoestrogênios? *Medicina Interna: Artigos de Revisão*, **2005**, 12, 171-182;

DELMONTE, P.; PERRY, J.; RADER, J. I. Determination of isoflavones in dietary supplements containing soy, Red Clover and kudzu: Extraction followed by basic or acid hydrolysis. *Journal of Chromatography A*, **2006**, 1107, 59–69;

DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A. A.; CAPASSO, F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Science*, **1999**, 65 (4), 337-353;

DIEL, P.; GEIS, R. B.; CALDARELLI, A.; SCHMIDT, S.; LESCHOWSKY, U. L.; VOSS, A.; VOLLMER, G. The differential ability of the phytoestrogen genistein and of estradiol to induce uterine weight and proliferation in the rat is associated with a substance specific modulation of uterine gene expression. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **2004**, 221, 21-32;

DONG, S.; ZHENG, J.; GAO, H. Voltammetric behaviour of 4',7-dimethoxy-isoflavone sulfonic sodium and its enhancement determination in the presence of surfactant. *Analytical Biochemistry*, **2003**, 323, 151-155;

DONKOR, O. N.; SHAH, N. P. Production of  $\beta$ -glucosidase and hydrolysis of isoflavone phytoestrogens by *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*, and *Lactobacillus casei* in soymilk. *Journal of Food Science*, **2008**, 73 (1), M15-M20;

ERDMAN, J. W. Soy protein and cardiovascular disease: A statement for healthcare professionals from the nutrition committee of the AHA. *Circulation*, **2000**, 102, 2555-2559;

ESCARPA, A.; GONZÁLEZ, M. C.; BLASCO, A. J.; ROGERIO, M. C.; HERVÁS, M. Evaluation of Accuracy of Electrochemical Isoflavonoid Index for the Determination of Total Isoflavones in Soy Samples. *Electroanalysis*, **2007**, 19, 952-957;

EVANS, B. A.; GRIFFITHS, K.; MORTON, M. S. Inhibition of 5  $\alpha$ -reductase in genital skin fibroblasts and prostate tissue by dietary lignans and isoflavonoids. *Journal of Endocrinology*, **1995**, 147, 295-302.

FERRARI, C.; KUSANO, B. Bioquímica dos Alimentos Funcionais, Nutrição e Saúde – *Revista Nutrição Profissional*, **2005**, 1, 21-25;

FOGLIATTO, D. K. *Desenvolvimento de metodologia para determinação de daidzeína e genisteína em produtos de soja por voltametria de onda quadrada*. **2010**. 114 f. Dissertação (Mestrado em Química, área Físico-Química) – Departamento de Química, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande-MS;

FOGLIATTO, D. K.; BARBOSA, A. M. J.; FERREIRA, V. S. Voltammetric determination of the phytoestrogen genistein in soy flours and soy based supplements using cationic surfactant cetyltrimethylammonium bromide. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **2010**, 78, 243–249;

- FRANKE, A. A.; CUSTER, L. J. Daidzein and genistein concentrations in human milk after soy consumption. *Clinical Chemistry*, **1996**, 42, 955-964;
- FREITAS, S. M. de; BARBOSA, M. Z.; FRANCA, T. J. F. Cadeia de produção de soja no Brasil: o caso do óleo. *Informações Econômicas*, **2000**, 30 (12), 30-40;
- FUHRMAN, B.; AVIRAM, M. Flavonoids protect from oxidation and attenuate atherosclerosis. *Current Opinion in Lipidology*, **2001**, 12 (1), 41-48;
- GAO, G. Y.; LI, D. J.; KEUNG, W. M. Synthesis of potential antidipsotropic isoflavones: Inhibitors of the mitochondrial monoamine oxidase-aldehyde dehydrogenase pathway. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2001**, 44, 3320-3328;
- GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Determinação de isoflavonas em derivados de soja. *Ciência & Tecnologia de Alimentos*, **2001**, 21, 86-93;
- GHONEIM, M. M.; TAWFIK, A. Assay of anti-coagulant drug warfarin sodium in pharmaceutical formulation and human biological fluids by square-wave adsorptive cathodic stripping voltammetry. *Analytica Chimica Acta*, **2004**, 511, 63-69.
- GÓES-FAVONI, S. P.; BELÉIA, A. D. P.; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; MANDARINO, J. M. G. Isoflavonas em produtos comerciais de soja. *Ciência & Tecnologia de Alimentos*, **2004**, 24, 582-586;
- GOUVEIA, F. Indústria de alimentos: no caminho da inovação e de novos produtos. *Inovação Uniemp* [online], **2006**, v. 2, n. 5, 32-37;
- GRÄBNITZ, F.; STAUDENBAUER, W. L. Characterization of 2 beta-glucosidase genes from *Clostridium thermocellum*. *Biotechnology Letters*, **1988**, 10 (2), 73-78;
- GRACE, P. B; TAYLOR, J. I.; BOTTING, N. P.; FRYATT, T.; OLDFIELD, M. F.; BINGHAM, S. A. Quantification of isoflavones and lignans in urine using gas chromatography/mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, **2003**, 315, 114-121;
- GREEF, R.; PEAT, R.; PETER, L. M.; PLETCHER, D.; ROBINSON, J. *Instrumental methods in electrochemistry*. John Wiley, Ellis Horwood Limited, New York, cap. 1, **1985**;
- GRYNKIEWICZ, G.; KSYCIŃSKA, H.; RAMZA, J.; ZAGRODZKA, J. Chromatographic quantification of isoflavones (why and how). *ACTA Chromatographica*, **2005**, 15, 31-65;
- HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, **2000**, 55 (6), 481-504;
- HARRIS, D. M.; BESSELINK, E.; HENNING, S. M.; GO, V. L. W.; HEBER, D. Phytoestrogens Induce Differential Estrogen Receptor Alpha- or Beta-Mediated Responses in Transfected Breast Cancer Cells. *Experimental Biology & Medicine*, **2005**, 230 (8): 558-568;
-

HASLER, C.M. The cardiovascular effects of soy products. *Journal of Cardiovascular Nursing*, **2002**, 16 (4) 50-63;

HEINONEN, S.-M.; WÄLÄLÄ, K.; ADLERCREUTZ, H. Identification of urinary metabolites of the red clover isoflavones formononetin and biochanin A in human subjects. *Journal of agricultural and food chemistry*, **2004**, 52, 6802-6809;

HERRMANN, A. P.; WILLEMS, M; JANKE, H. D. Degradation of natural polyphenols by methanogenic consortia enriched from digested municipal sludge. *Water Research*, **2001**, 35 (11), 2575-2582;

HORWITZ, W. Quality assurance in the analysis of foods for trace constituents. *Journal Association Official Analytical Chemistry*, **1980**, 63, 1344-1354;

HSIEH, C. Y.; SANTELL, R. C.; HASLAM, S. Z.; HELFERICH, W. G. Estrogenic effects of genistein on the growth of estrogen receptor-positive human breast cancer (MCF-7) cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Research*, **1998**, 58, 3833-3838;

HU, J. LI, Q. Voltammetric behaviour of puerarin and its determination by single-sweep oscillopolarography. *Analyst*, **1995**, 120, 1073-1076;

IEH (2000). Phytoestrogens in the Human Diet (Web Report W3), Leicester, UK, Institute for Environment and Health. Disponível em: <http://www.le.ac.uk/ieh/webpub/webpub.html> Acesso em fevereiro de 2013;

INMETRO, **2003**. Tópicos em Validação de Métodos – Escola Avançada de Metrologia em Química. Disponível em: [http://www.inmetro.gov.br/noticias/eventos/MetQuim\\_palestras/Valida%E7%E3o%20de%20Metodos%20Anal%EDticos\\_Oscar%20Bahia.pdf](http://www.inmetro.gov.br/noticias/eventos/MetQuim_palestras/Valida%E7%E3o%20de%20Metodos%20Anal%EDticos_Oscar%20Bahia.pdf). Acesso em julho de 2010;

IRVINE, C.H.G.; FITZPATRICK, M.G.; ALEXANDER, S.L. Phytoestrogens in Soy-Based Infant Foods: Concentrations, Daily Intake and Possible Biological Effects. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, **1998**, 217, 247-253;

JAYAGOPAL, V.; ALBERTAZZI, P.; KILPATRICK, E. S.; HOWARTH, E. M.; JENNINGS, P. E.; HEPBURN, D. A.; ATKIN, S. L. Beneficial effects of soy phytoestrogen intake in postmenopausal women with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, **2002**, 25 (10), 1709-1714;

JENKINS, D. J. A.; KENDALL, C. W. C.; D'COSTA, M. A.; JACKSON, C.; VIDGEN, E.; SINGER, W.; SILVERMAN, J. A.; KOUMBRIDIS, G.; HONEY, J.; VENKET, R. A.; FLESHNER, N.; KLOTZ, L. Soy consumption and phytoestrogens: effect on serum prostate specific antigen when blood lipids and oxidized low-density lipoprotein are reduced in hyperlipidemic men. *Journal of Urology*, **2003**, 169 (2), 507-511;

JOHNS, P.; DOWLATI, L.; WARGO, W. Determination of isoflavones in ready-to-feed soy-based infant formula. *The Journal of AOAC International*, **2003**, 86, 72-78;

KAYA, M.; ITO, J.; KOTAKA, A.; MATSUMURA, K.; BANDO, H.; SAHARA, H.; OGINO, C.; SHIBASAKI, S.; KURODA, K.; UEDA, M.; KONDO, A.; HATA, Y.

Isoflavone aglycones production from isoflavone glycosides by display of  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus oryzae* on yeast cell surface. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **2008**, 79, 51–60;

KEY, P. E.; FINGLAS, P. M.; COLDHAM, N.; BOTTING, N.; OLDFIELD, M. F.; WOOD, R. An international quality assurance scheme for the quantitation of daidzein and genistein in food, urine and plasma. *Food Chemistry*, **2005**, 96, 261–272;

KING, R. A.; BIGNELL, C. M. Concentrations of isoflavone phytoestrogens and their glucosides in Australian soya beans and soya foods. *Australian Journal of Nutrition and Dietetics*, **2000**, 57 (2), 70–78;

KISSINGER, P. T.; HEINEMAN, W. R. *Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry*, 2. ed. New York: Marcel Dekker, Inc, **1996**;

KLEJDUS, B.; VACEK, J.; ADAM, V.; ZEHNÁLEK, J.; KIZEK, R.; TRNKOVÁ, L.; KUBÁN, V. Determination of isoflavones in soybean food and human urine using liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography B*, **2004**, 806, 101–111;

KLEJDUS, B.; VITAMVÁSOVÁ-STERBOVÁ, D.; KUBÁN, V. Identification of isoflavone conjugates in red clover (*Trifolium pratense*) by liquid chromatography-mass spectrometry after two-dimensional solid-phase extraction. *Analytica Chimica Acta*, **2001**, 450 (1), 81–97;

KNIGHT, D. C.; EDEN, J. Á. Phytoestrogens – a short review. *Maturitas*, **1995**, 22, 167–175;

KOOPAL, L. K.; LEE, E. M.; BÖHMER, M. R. Adsorption of cationic and anionic surfactants on charged metal oxide surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, **1995**, 170 (1), 85–97;

KRENN, L.; UNTERRIEDER, I.; RUPRECHTER, R. Quantification of isoflavones in red clover by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, **2002**, 777, 123–128;

KUDOU, S.; FLEURY, Y.; WELTI, D.; MAGNOLATO, D.; UCHIDA, T.; KITAMURA, K.; OKUBO, K. Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds (*Glycine max* Merrill). *Agricultural and Biological Chemistry*, **1991**, 55, 2227–2233;

KUHNLE, G. G. C.; DELL'AQUILA, C.; LOW, Y. L.; KUSSMAUL, M.; BINGHAM, S. A. Extraction and Quantification of Phytoestrogens in Foods Using Automated Solid Phase Extraction and LC/MS/MS. *Analytical Chemistry*, **2007**, 79, 9234–9239;

KUIPER, G. G. J. M.; CARLSSON, B.; GRANDIEN, K.; ENMARK, E.; HAGGBLAD, J.; NILSSON, S.; GUSTAFSSON, J. A. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . *Endocrinology*, **1997**, 138 (3), 863–870;

- KUO, H. W.; DING, W. H. Trace determination of bisphenol A and phytoestrogens in infant formula powders by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **2004**, 1027, 67–74;
- LIANG, J.; TIAN, Y. X.; FU, L. M.; WANG, T. H.; LI, H. J.; WANG, P.; HAN, R. M.; ZHANG, J. P.; SKIBSTED, L. H. Daidzein as an antioxidant of lipid: Effects of the microenvironment in relation to chemical structure. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **2008**, 56, 10376–10383;
- LICHTENSTEIN, A. H. Soy protein, isoflavones and cardiovascular disease risk. *Journal of Nutrition*, **1998**, 128 (10), 1589-1592;
- LIGGINS, J.; BLUCK, L. J.; COWARD, W. A.; BINGHAM, S. A. Extraction and quantification of daidzein and genistein in food. *Analytical Biochemistry*, **1998**, 264, 1-7;
- LIMA, A. F. *Produção e caracterização de  $\beta$ -glicosidase vegetal e microbiana e sua aplicação para conversão de isoflavonas glicosiladas em isoflavonas agliconas*. **2003**. 167 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP;
- LISSIN, L. W.; COOKE, J. P. Phytoestrogens and cardiovascular health. *Journal of the American College of Cardiology*, **2000**, 35, 1403-1410;
- LIU, K. *Soybeans: chemistry, technology and utilization*. New York: Chapman & Hall, **1999**, p. 532;
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *Journal of Biological Chemistry*, **1951**, 193, 265-275;
- LUND, H.; HAMMERICH, O. *Organic Electrochemistry*, 4<sup>th</sup> ed. New York: Marcel Dekker, **2001**;
- MALEŠEV, D.; KUNTIC, V. Investigation of metal–flavonoid chelates and the determination of flavonoids *via* metal–flavonoid complexing reactions. *Journal of the Serbian Chemical Society*, **2007**, 72, 921–939;
- MANIASSO, N. Ambientes micelares em química analítica. *Química Nova*, **2001**, 24 (1), 87-93;
- MATSUURA, M.; SASAKI, J.; MURAO, S. Studies on  $\beta$ -glucosidases from soybeans that hydrolyse daidzin and genistin: isolation and characterization of an isozyme. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **1995**, 59, 1623-1627;
- MERKEN, H. M.; BEECHER, G. R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **2000**, 48, 577-599;
- MESSINA, M. J. Legumes and soybeans: an overview of their nutritional profiles and health effects. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **1999**, 70, 439S-450S;
-

MESSINA, M. J.; LOPRINZI, C. L. Soy for breast cancer survivors: A critical review of the literature. *The Journal of Nutrition*, **2001**, 131, 3095S-3108S.

MESSINA, M. J.; PERSKY, V.; SETCHELL, K. D.; BARNES, S. Soy intake and cancer risk: a review of the *in vitro* and *in vivo* data. *Nutrition and Cancer*, **1994**, 21, 113-121;

MEYER, G.; NADJO, L.; SAVEANT, J. M. Electrochemistry in micellar media. Effect of cationic surfactants on the stability of eletrogenerated anion radicals in water. *Journal of Eletroanalytical Chemistry*, **1981**, 119, 417-419;

MIKKELSEN, Ø.; STRASUNSKIENE, K.; SKOGVOLD, S.; SCHRÖDER, K. H.; JOHNSEN, C. C.; RYDNINGEN, M.; JONSSON, P.; JONSSON, A. Automatic Voltammetric System for Continuous Trace Metal Monitoring in Various Environmental Samples. *Electroanalysis*, **2007**, 19 (19-20), 2085-2092;

MOON, Y. J.; SAGAWA, K.; FREDERICK, K.; ZHANG, S.; MORRIS, M. E. Pharmacokinetics and Bioavailability of the Isoflavone Biochanin A in Rats. *The AAPS Journal*, **2006**, 8, E433-E442;

MOORS, S.; BLASZKEWICZ, M.; BOLT, H. M.; DEGEN, G. H. Simultaneous determination of daidzein, equol, genistein and bisphenol A in human urine by a fast and simple method using SPE and GC-MS. *Molecular Nutrition & Food Research*, **2007**, 51, 787-798;

MORAIS, A. A. C.; SILVA, A. L. *Soja: suas aplicações*. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica, **1996**, p. 259;

MORTON, M; ARISAKA, O.; MIYAKE, A.; EVANS, B. Analysis of phytoestrogens by gas chromatography-mass spectrometry. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **1999**, 7, 221-225;

MÜLLNER, C.; SONTAG, G. Determination of some phytoestrogens in soybeans and their processed products with HPLC and coulometric electrode array detection. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, **1999**, 364, 261-265;

NESTEL, P. Isoflavones: their effects on cardiovascular risk and functions. *Current Opinions on Lipidology*, **2003**, 14 (1), 3-8;

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. *Química Nova*, **2002**, 25 (5), 772-776;

NURMI, T.; MAZUR, W.; HEINONEN, S.; KOKKONEN, J.; ADLERCREUTZ, H. Isoflavone content of the soy based supplements. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2002**, 28, 1-11;

OSTERYOUNG, J. G.; OSTERYOUNG, R. A. Square wave voltammetry. *Analytical chemistry*, **1985**, 57 (1), 101A-110A;

PACHECO, M.T.B.; SGARBIERI, V.C. Alimentos Funcionais: conceituação e importância na saúde humana. In: Simpósio Brasileiro Sobre os Benefícios da Soja para a Saúde Humana, Londrina: Embrapa Soja, **2001**, 1;

PANORAMA BRASIL. Soja, **2003**. Disponível em:<<http://br.news.yahoo.com/030228/13/atpa.html>>. Acesso em março de 2011.

PARIA, S.; KHILAR, K. C. A review on experimental studies of surfactant adsorption at the hydrophilic solid-water interface. *Advances in Colloid and Interface Science*, **2004**, 110, 75-95;

PARK, Y. K.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; SCAMPARINI, A. R. P. Biotransformação de isoflavonas de soja: Aplicação de biotecnologia enzimática na conversão de isoflavonas com maior atividade biológica. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, **2001**, 20, 12-14;

PARK, Y. K.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; MASCARENHAS, H. A. A.; SCAMPARINI, A. R. P. Conversão de malonil-beta-glicosil isoflavonas em isoflavonas glicosiladas presentes em alguns cultivares de soja brasileira. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, **2002**, 22 (2), 130-135;

PAUCAR-MENACHO, L. M.; BERTHOW, M. A.; MANDARINO, J. M. G.; MEJIA, E. G.; CHANG, Y. K. Optimisation of germination time and temperature on the concentration of bioactive compounds in Brazilian soybean cultivar BRS 133 using response surface methodology. *Food Chemistry*, **2010**, 119, 636–642;

PAXTON, J. S. - Soy Protein: Your Key To Better Health, Phytoestrogens: The Biochemistry, Physiology, and Implications for Human Health of Soy Isoflavones. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **1998**, 68, 1333S-1346S;

PELIZZETTI, E.; PRAMAURO, E. Analytical applications of organized molecular assemblies. *Analytica Chimica Acta*, **1985**, 169, 1-29;

PEREIRA, A. C; SANTOS, A. S.; KUBOTA, L. T. Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. *Química Nova*, **2002**, 25, 1012-1021;

PESHIN, A.; MATHUR, J. M. S. Purification and characterization of  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus niger* strain 322. *Letters in Applied Microbiology*, **1999**, 28, 401–404;

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, **2000**, 63, 1035-1102;

POTTER, S. M.; BAUM, J. A.; TENG, H.; STILLMAN, R. J.; SHAY, N. F.; ERDMAN, J. W. Jr. Soy protein and isoflavones: their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **1998**, 68 (6), 1375S-1379S;

QUEIROZ, S. C. N; NOGUEIRA, R. T.; SCRAMIN, S. Importância dos fitoestrógenos, presentes na soja, para a saúde humana. *Embrapa: Meio Ambiente*, **2006**. Disponível

em:[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/recursos/Queiroz\\_Nogueira\\_Scramin\\_importanciaID-5nX98pWTxk.pdf](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/recursos/Queiroz_Nogueira_Scramin_importanciaID-5nX98pWTxk.pdf). Acesso em julho de 2010;

RAMALEY, L.; KRAUSE, M. S. Theory of square wave voltammetry. *Analytical Chemistry*, **1969**, 41 (11), 1362-1365;

RIBEIRO, M. L. L.; MANDARINO, J. M. G.; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; DE OLIVEIRA, M. C. N.; CAMPO, C. B. H.; NEPOMUCENO, A. L.; IDA, E. I. Isoflavone content and  $\beta$ -glucosidase activity in soybean cultivars of different maturity groups. *Journal of Food Composition and Analysis*, **2007**, 20, 19–24;

RICHELLE, M.; PRIDMORE-MERTEN, S.; BODENSTAB, S.; ENSLEN, M.; OFFORD, E. A. Hydrolysis of isoflavone glycosides to aglycones by  $\beta$ -glycosidase does not alter plasma and urine isoflavone pharmacokinetics in postmenopausal women. *Human Nutrition and Metabolism*, **2002**, 2587-2592;

ROSTAGNO, M. A.; PALMA, M.; BARROSO, C. G. Fast analysis of soy isoflavones by high-performance liquid chromatography with monolithic columns. *Analytica Chimica Acta*, **2007(a)**, 582, 243-249;

ROSTAGNO, M. A.; PALMA, M.; BARROSO, C. G. Ultrasound-assisted extraction of isoflavones from soy beverages blended with fruit juices. *Analytica Chimica Acta*, **2007(b)**, 597, 265–272;

RUPP, E. B.; ZUMAN, P. Polarographic determination of some pesticides. Application to a study of their adsorption on lignin. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **1992**, 40, 2016-2021;

RUSLING, J. F. Molecular aspects of electron transfer at electrodes in micellar solutions. *Colloids and Surfaces*, **1997**, 123, 81-88;

SADOWSKA-KROWICKA, H.; MANNICK, E. E.; OLIVER, P. D.; SANDOVAL, M.; ZHANG, X. -J.; ELOBY-CHILDESS, S.; CLARK, D. A.; MILLER, M. J. S. Genistein and gus inflammation: role of nitric oxid. *Proceedings of the Society for Experimental Biology & Medicine*, **1998**, 217 (3), 315-357;

SALAGER, J. L. *Surfactants Types and Uses*. **2002**. 50 f. FIRP BOOKLET # E 300-A. Teaching aid in surfactant science & engineering – Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela;

SALGADO, J. M.; ALMEIDA, M. A. Mercado de alimentos funcionais – desafios e tendências. *SBAF*, **2008**. Disponível em: [http://www.sbafe.org.br/\\_artigos/200806\\_Mercado\\_Alimentos\\_Funcionais\\_-\\_Desafios\\_Tendencias.pdf](http://www.sbafe.org.br/_artigos/200806_Mercado_Alimentos_Funcionais_-_Desafios_Tendencias.pdf). Acesso em janeiro de 2009;

SANTELL, R. C.; KEWU, N.; HELFERICH, W. G. The effect of genistein upon estrogen receptor negative human breast cancer cell growth *in vitro* and *in vivo*. *FASEB Journal*, **1998**, 12 (5), A3807;

SBAF (Sociedade Brasileira de Alimentos Funcionais), **2007**. MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos Funcionais e Nutracêuticos: Definições, Legislação e Benefícios à Saúde. Disponível em: [http://www.sba.org.br/artigos\\_cientificos.htm](http://www.sba.org.br/artigos_cientificos.htm). Acesso em janeiro de 2009;

SCHABATH, M. B.; HERNANDEZ, L. M.; WU, X.; PILLOW, P. C.; SPITZ, M. R. Dietary phytoestrogens and lung cancer risk. *JAMA*, **2005**, 294(12), 1493-504.

SCHWARTZ, H.; SONTAG, G. Determination of isoflavones in nutritional supplements by HPLC with coulometric electrode array detection. *Monatshefte für Chemie Chemical Monthly*, **2008**, 139, 865–872;

SETCHELL, K. D. R. Phytoestrogens: The biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **1998**, 134, 1333S-1343S;

SETCHELL, K. D. R.; CASSIDY, A. dietary isoflavones: Biological effects and relevance to human health. *Journal of Nutrition*, **1999**, 129, 758S-767S;

SHVEDENE, N. V.; CHERNYSHOV, D. V.; PLETNEV, I. V. Ionic liquids in electrochemical sensors. *Russian Journal of General Chemistry*, **2008**, 78 (12), 2507–2520;

SKOOG, D. A; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. *Principles of Instrumental Analysis*, 5<sup>a</sup> ed., Philadelphia: Saunders, **1998**;

SONG, T.; BARUA, K.; BUSEMAN, G.; MURPHY, P. A. Soy isoflavones analysis: quality control and a new internal standard. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **1998**, 68, 1474S-1479S;

SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de Onda Quadrada. Primeira parte: Aspectos Teóricos. *Química Nova*, **2003**, 26, 81-89;

SOUZA, D.; MELO, L. C.; CORREIA, A. N.; LIMA-NETO, P. Utilização de eletrodos sólidos de amálgama para a determinação analítica de compostos orgânicos e inorgânicos. *Química Nova*, **2011**, 34 (3), 487-496;

STÜRTZ, M.; LANDER, V.; SCHMID, W.; WINTERHALTER, P. Quantitative determination of isoflavones in soy based nutritional supplements by high-performance liquid chromatography. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, **2008**, 3, 127-136;

TRINDADE, M. A. G. *Estudo do comportamento eletroquímico e determinação da moxifloxacin através de técnicas voltamétricas*. **2004**. 108f. Dissertação (Mestrado em Química, área Físico-Química) – Departamento de Química, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande-MS;

TSAO, R.; PAPADOPOULOS, Y.; YANG, R.; YOUNG, J. C.; MCRAE, K. Isoflavone profiles of red clovers and their distribution in different parts harvested at different growing stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2006**, 54, 5797-5805;

- TSUKAMOTO, C.; KUDOU, S.; KIKUCHI, A.; CARRÃO-PANIZZII, M.C.; ONO, T.; KITAMURA, K.; OKUBO, K. Isoflavones in soybean products: composition, concentration and physiological effects. In: Simpósio Brasileiro Sobre os Benefícios da Soja Para a Saúde Humana, Londrina: Embrapa Soja, **2001**, 1, 9-14;
- TSUNODA, N.; POMEROY, S.; NESTEL, P. Absorption in Humans of Isoflavones from Soy and Red Clover Is Similar. *The Journal of Nutrition*, **2002**, 132, 2199–2201;
- TWADDLE, N. C.; CHURCHWELL, M. I.; DOERGE, D. R. High-throughput quantification of soy isoflavones in human and rodent blood using liquid chromatography with electro-spray mass spectrometry and tandem mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography B*, **2002**, 777, 139-145;
- VACEK, J.; KLEJDUS, B.; LOJKOVÁ, L.; KUBÁN, V. Current trends in isolation, separation, determination and identification of isoflavones: A review. *Journal of Separation Science*, **2008**, 31, 2054-2067;
- VAZ, C. M. P.; CRESTANA, S.; MACHADO, S. A. S.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A. Electroanalytical determination of the herbicide atrazine in natural waters. *International Journal of Environmental and Analytical Chemistry*, **1996**, 62, 65-76;
- VERDRENGH, M.; COLLINS, L. V.; BERGIN, P.; TARKOWSKI, A. Phytoestrogen genistein as an antistaphylococcal agent, *Microbes Infect.*, **2004**, 6, 86-92.
- VITTAL, R.; H. GOMATHI, H.; KIM, K.-J. Beneficial role of surfactants in electrochemistry and in the modification of electrodes. *Advances in Colloid and Interface Science*, **2006**, 119, 55-68;
- WANG, C.; KURZER, M. S. Phytoestrogen concentration determines effects on DNA synthesis in human breast cancer cells. *Nutrition and Cancer*, **1997**, 28 (3), 236-247;
- WANG, H.; MURPHY, P.A. Isoflavone Content in Commercial Soybean Foods. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **1994**, 42, 1666-1673;
- WANG, T. T. Y.; SATHYAMOORTHY, N.; PHANG, J. M. Molecular effects of genistein on estrogen receptor mediated pathways. *Carcinogenesis*, **1996**, 17, 271-275;
- WEISBURGER, J. H. Eat to live, not live to eat. *Nutrition*, **2000**, 16 (4), 767-773;
- WILCOX, J. N.; BLUMENTHAL, B. F. Thrombotic mechanisms in atherosclerosis: potential impact of soy proteins. *Journal of Nutrition*, **1995**, 125, 631S- 638S;
- WILKINSON, A.P.; WÄHÄLÄ, K.; WILLIAMSON, G. Identification and quantification of polyphenol phytoestrogens in foods and human biological fluids. *Journal of Chromatography B*, **2002**, 777, 93–109;
- WU, Q.; WUANG, M.; SIMON, J. E. Determination of isoflavones in red clover and related species by high-performance liquid chromatography combined with ultraviolet and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, **2003**, 1016, 195-209;
-

WU, A. H.; ZIEGLER, R. G.; HORN-ROSS, P. L. Tofu and risk of breast cancer in Asian-Americans. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, **1996**, 5, 901-906;

XIE, L.; HETTIARACHCHY, N. S.; CAI, R.; TSURUHAMI, K.; KOIKEDA, S. Conversion of isoflavone glycosides to aglycones in soybean and soybean meal using  $\beta$ -glucosidase. *Journal of Food Science*, **2003**, 68 (2), 427-430;

XU, Z.; WU, Q.; GODBER, S. J. Stabilities of daidzin, glycitin, genistin and generation of derivatives during heating. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **2002**, 50, 7402-7406;

YANG, S.; WANG, L.; YAN, Q.; JIANG, Z.; LI, L. Hydrolysis of soybean isoflavone glycosides by a thermostable  $\beta$ -glucosidase from *Paecilomyces thermophila*. *Food Chemistry*, **2009**, 115, 1247-1252;

YOSYPCHUK, B.; BAREK, J. Analytical applications of solid and paste amalgam electrodes. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, **2009**, 39, 189-203;

YOSYPCHUK, B.; NOVOTNÝ, L. Electrodes of Nontoxic Solid Amalgams for Electrochemical Measurements. *Electroanalysis*, **2002**, 14 (24), 1733-1738;

YUAN, D.; PAN, Y.; CHEN, Y.; UNO, T.; ZHANG, S.; KANO, Y. An improved method for basic hydrolysis of isoflavone malonylglucosides and quality evaluation of Chinese soy materials. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **2008**, 56 (1), 1-6;

ZHANG, X.; ZHENG, J.; GAO, H. Electrochemical behavior of genistein and its polarographic determination in soybeans. *Analytical Letters*, **2001**, 34, 1901-1912;

ZIELONKA, J.; GEBICKI, J.; GRYNKIEWICZ, G. Radical scavenging properties of genistein. *Free Radical Biology & Medicine*, **2003**, 35 (8), 958-965;

ZUBIK, L.; MEYDANI, M. Bioavailability of soybean isoflavones from aglycone and glucoside forms in American women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **2003**, 77 (6), 1459-1465;

ZUMAN, P. *Progress in Polarography*, v. 3, New York: Wiley, **1972**.

---