

Brasília, DF
Dezembro, 2009**Autores****Mariana Rodrigues Lopes e Silva**
Graduanda, Química
Universidade de Brasília
marynana_lopes@yahoo.com.br**Jonatas Gomes da Silva**
Doutorando, Química
Universidade de Brasília
jonatasg@yahoo.com.br**Aline Carlos de Oliveira**
Pós-doutoranda, Química
Universidade Federal de
São Carlos
alineplis@yahoo.com.br**Maria Carolina Blassioli Moraes**
PhD, Química
Embrapa Recursos Genéticos e
Biotecnologia
mcbmoraes@cenargen.embrapa.br**Luzia Helena Corrêa Lima**
PhD, Bióloga
Embrapa Recursos Genéticos e
Biotecnologia
luzia@cenargen.embrapa.br**Jurandir Rodrigues de Souza**
PhD, Químico
Universidade de Brasília
rodsouza@unb.br**Carlos Manoel Pedro Vaz**
PhD, Físico
Embrapa Instrumentação
Agropecuária
Vaz@cnpdia.embrapa.br**Clarissa Silva Pires de Castro**
PhD, Química
Embrapa Recursos Genéticos e
Biotecnologia
clarissa@cenargen.embrapa.br

Desenvolvimento e validação de um método eletroquímico para a determinação de rutina em soja utilizando-se eletrodo de mercúrio

Introdução

A cultura de soja (*Glycine max*) apresentou um aumento de mais de 100% em termos de áreas cultivadas desde a década de 70, expandindo-se não só para o Cerrado, mas também para as regiões Norte e Nordeste (PORTUGAL, 1999). Essa expansão se deve, principalmente, à grande importância dessa cultura, uma vez que é a principal fonte de óleo e proteína vegetal para o consumo animal e humano.

Uma das consequências desse crescimento de áreas cultivadas foi um aumento no número de pragas, sendo o percevejo o principal exemplo (BELORE et al., 2003). Esses insetos atuam, preferencialmente, sugando os grãos da oleaginosa e causando danos crescentes à produção, uma vez que afetam o rendimento e a qualidade das sementes, além de causar distúrbios fisiológicos.

As plantas possuem um sistema de defesa que lhes confere resistência contra insetos, fungos e bactérias. Um eficiente sistema de defesa da planta que pode ser manipulado e utilizado no monitoramento integrado de pragas é o sistema químico, composto geralmente por metabólitos secundários voláteis e não voláteis, que podem ser induzidos ou constitutivos (DICKE e van LOON, 2000; ARAB e BENTO, 2006; HEIL, 2008). Estudos apontam que algumas variedades de soja apresentam uma eficiente defesa contra insetos herbívoros (RIBEIRO et al., 2007, MICHEREFF et al., 2009). Estas variedades mais resistentes a pragas apresentam diferentes características físicas e químicas que as tornam mais resistentes. Dentre as características químicas, os principais compostos responsáveis pela resistência a pragas são os flavonoides. Portanto, a identificação e a quantificação desses metabólitos secundários nas diferentes cultivares podem gerar importantes informações para os melhoristas na escolha das cultivares, visando ao melhoramento, tanto o clássico quanto o transgênico. Desta forma, é possível avaliar e conhecer mais claramente quais os efeitos e o porquê da resistência, e inclusive auxiliar a busca de genes responsáveis pela produção desses metabólitos secundários (PEREZ e ORMENONUNEZ, 2005; PICKETT et al., 2007; PIUBELLI et al., 2003a, 2003b; MORAES et al., 2005; PAREJA et al., 2007; BUKOVINSZKY et al., 2005).

Para a utilização correta dos metabólitos secundários no monitoramento integrado de pragas, faz-se necessário o conhecimento a respeito da forma como esses compostos são usados no meio ambiente pelas plantas, isto é, importa conhecer a taxa de liberação, a quantidade produzida e sua interação alelopática entre planta-herbívoro e planta-herbívoro-inimigo natural (MORAES et al., 2008, 2009, HEIL, 2008). Atualmente, vários métodos analíticos têm sido propostos para a identificação e a quantificação de metabólitos secundários em soja, tais como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e a cromatografia gasosa (CG), combinados ou não a espectrometria de massas (MS). No entanto, essas técnicas apresentam algumas desvantagens: são de grande porte, o que dificulta

a adaptação delas ao campo; têm altos custos, devido à manutenção dos equipamentos e a gastos com reagentes; exigem laboriosos processos de preparação da amostra (como etapas de separação e pré-tratamento), grandes quantidades de solventes de alta pureza e técnicos especializados; e as análises são mais suscetíveis a interferentes e não preservam a amostra.

Nesse contexto, os métodos eletroquímicos apresentam vantagens, uma vez que podem ser adaptados ao campo, possuem tempo de análise e custos reduzidos, apresentam alta sensibilidade e baixos limites de detecção, além de permitirem a análise direta da amostra e não serem destrutivos. Por isso, os métodos eletroquímicos vêm sendo utilizados para avaliar a capacidade antioxidante de flavonoides e ácidos fenólicos e quantificá-los em alimentos, medicamentos e fluidos biológicos.

A possibilidade de uso desses compostos se deve à sua eletroatividade, ou seja, à facilidade com que os metabólitos secundários sofrem reações de óxido-redução em eletrodos inertes. Na maioria dos trabalhos publicados, a voltametria adsorbtiva de redissolução catódica (CAdSV), combinada com os eletrodos de mercúrio gota pendente (HMDE) e de carbono, têm sido o método e os eletrodos de trabalho mais utilizados para a determinação de diversos flavonoides (rutina, naringina, fisetina, galangina, morina, quercetina, ramelina, hesperidina, hesperitina) em sucos, chás, medicamentos e fluidos biológicos, na forma livre ou complexada com íons metálicos – (Cu(II) e Hg(II)). Dessa forma, esses métodos eletroanalíticos proporcionam processos de análise mais eficientes (rápidos, diretos e com custos reduzidos) e com limites de detecção da ordem de 10^{-9} mol L⁻¹ e quantificação da ordem de 10^{-8} mol L⁻¹ (TEMERK et al., 2006; ENSAFI e HAJJAN, 2006; ZOULIS e CONSTANTINOS, 1996; REICHART e OBENDORF, 1998).

A CAdSV consiste basicamente em duas etapas: na primeira, ocorre adsorção ou acumulação do complexo formado pela molécula orgânica (rutina) com o metal – (Cu(II)), sobre a superfície do HMDE, por um tempo determinado; na segunda etapa, empregando-se a técnica de pulso diferencial (DP), ocorre a redução do complexo Cu(II)-rutina (TEMERK et al., 2006; ENSAFI e HAJJAN, 2006). No voltamograma adsorbtivo de redissolução catódica (Figura 1), para

rutina $5,87 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ em tampão fosfato pH 6 na presença de Cu(II) $1,57 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, observa-se um sinal em -0,150 V correspondente à redução do complexo Cu(II)-rutina. Este sinal é proporcional à concentração de rutina na célula eletroquímica, podendo ser utilizado na detecção e quantificação desse flavonoide em grãos e folhas de soja.

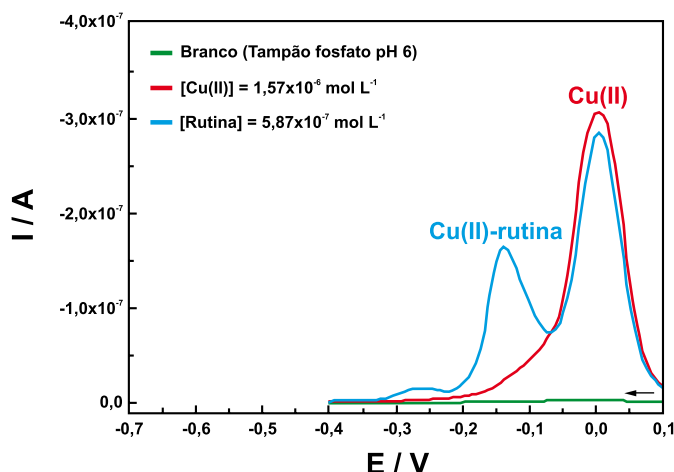


Figura 1. Voltamogramas adsorbtivos de redissolução catódica de pulso diferencial para 160 µL de Cu(II) $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ em 10 mL de tampão fosfato pH 6 com 60 µL Rutina $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. $E_{ac} = -1,000$ V, $t_{ac} = 180$ s, $E_i = 0,100$ V; $E_f = -0,400$ V, $v = 50$ mV s⁻¹, Eletrodo de trabalho: HMDE, Eletrodo de referência: Ag/AgCl (KCl 3 mol L⁻¹).

O objetivo deste trabalho é o desenvolvimento e a validação de um método de análise para a determinação de rutina (Figura 2) em grãos e folhas de soja, empregando a CAdSV com DP.

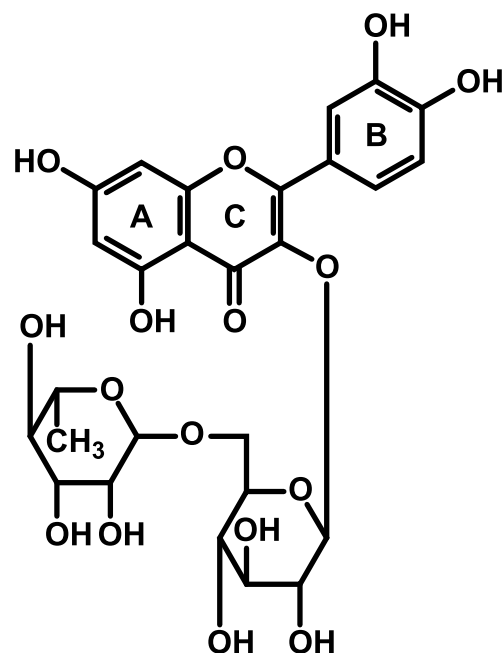


Figura 2. Estrutura química da rutina.

Parte experimental

Equipamentos

As medidas voltamétricas foram realizadas em triplicata, utilizando-se o analisador voltamétrico 797 VA Computrace (Metrohm, Suíça) e uma célula eletroquímica composta pelos eletrodos HMDE (eletrodo de trabalho), Ag/AgCl (KCl 3 mol L⁻¹) (eletrodo de referência) e platina (eletrodo auxiliar). As medidas de CAAdSV foram realizadas no intervalo de potencial de -0,100 V (potencial inicial, E_i) a -1,100 V (potencial final, E_f) com os seguintes parâmetros: potencial de acumulação (E_{ac}) de -1,000 V, tempo de acumulação (t_{ac}) de 180 s, tempo de equilíbrio (t_e) de 10 s, área do eletrodo de mercúrio de 0,3 mm², amplitude de pulso de 70 mV e velocidade de varredura (v) de 50 mV s⁻¹. Determinou-se o pH das soluções com a utilização do medidor de pH 3030 Jenway (Reino Unido) e o eletrodo de pH combinado DME-CV1/Digimed (Brasil).

Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e as soluções foram preparadas com água ultrapura (Millipore, EUA). Preparou-se a solução estoque de rutina (Sigma-Aldrich, Brasil) 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹ em uma mistura etanol-água 1:1 (v/v). A solução-padrão de cobre 1000 mg L⁻¹ foi adquirida da Fluka (Suíça). As soluções de tampão Britton-Robinson (B-R) na faixa de pH 3 – 12 foram preparadas com a utilização dos ácidos fosfórico, acético e bórico (Sigma-Aldrich, Brasil). As soluções de tampão fosfato no intervalo de pH 3 – 12 foram preparadas com a utilização de fosfato de sódio dibásico, fosfato de potássio monobásico e ácido fosfórico (Sigma-Aldrich, EUA). Utilizaram-se hidróxido de sódio e ácido clorídrico (Sigma-Aldrich, Alemanha), ambos concentrados, para ajustar os valores de pH. As folhas de soja IAC-100 (Embrapa Hortaliças, Brasil), produzidas em casa de vegetação (T = 27 ± 2 °C, UR = 70%), foram colhidas no estágio de crescimento V6 (FEHR e CAVINESS, 1977). Os grãos de soja P98R62 (Pioneer Sementes, Brasil) foram coletados na região Centro-Oeste do país (15°56'20.06"S Latitude, 47°34'54.14"O Longitude). As folhas e os grãos de soja foram preparados para a análise voltamétrica por meio da utilização do procedimento padrão da Embrapa Soja para extração de isoflavonoides (CARRÃO-PANIZZI et al., 2002; PARK, 2001).

Procedimento

A influência do eletrólito suporte e do pH na corrente do complexo Cu(II)-rutina, utilizando-se a CAAdSV, foi estudada por meio da adição de 100 µL de Cu(II) 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ e 100 µL de rutina 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ na célula eletroquímica contendo 10 mL de tampão B-R (4,0 x 10⁻² mol L⁻¹ H₃PO₄, 4,0 x 10⁻² mol L⁻¹ CH₃COOH e 4,0 x 10⁻² mol L⁻¹ H₃BO₃) ou tampão fosfato (2,0 x 10⁻² mol L⁻¹ H₃PO₄; 1,2 x 10⁻³ – 5,7 x 10⁻² mol L⁻¹ Na₂HPO₄; 1,2 x 10⁻¹ – 4,5 x 10⁻³ mol L⁻¹ KH₂PO₄ e 4,6 x 10⁻³ – 7,7 x 10⁻² mol L⁻¹ Na₃PO₄) no intervalo de pH 3 – 12.

Realizou-se o estudo da influência do potencial de acumulação (no intervalo de -1,200 – -0,500 V), da amplitude de pulso (no intervalo de 10 – 100 mV), da velocidade de varredura (no intervalo de 5 – 600 mV s⁻¹) e do tempo de acumulação (no intervalo de 30 – 300 mV) na corrente do complexo Cu(II)-rutina, utilizando-se a CAAdSV, por meio da adição de 100 µL de Cu(II) 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ e 100 µL de rutina 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ na célula eletroquímica contendo 10 mL de tampão fosfato pH 6.

Verificou-se o efeito da concentração de cobre na corrente do complexo Cu(II)-rutina, utilizando-se a CAAdSV, por meio da adição de 100 µL de rutina 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ com adições sucessivas de 20 µL de Cu(II) 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ na célula eletroquímica contendo 10 mL de tampão fosfato pH 6.

Obteve-se a curva analítica, utilizando-se a CAAdSV, por meio de adições sucessivas de 20 µL de rutina 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ na célula eletroquímica contendo 10 mL de tampão fosfato pH 6 e 160 µL de Cu(II) 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹.

Determinou-se a rutina em amostra de soja por meio de adições sucessivas de 20 ou 50 µL de rutina 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ na célula eletroquímica contendo 10 mL de tampão fosfato pH 6, 160 µL de Cu(II) 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ e 40 ou 50 µL da amostra de soja.

Resultados e discussão

Os parâmetros voltamétricos e as condições experimentais otimizadas para a determinação de rutina, utilizando-se a CAAdSV com DP, são mostrados na tabela abaixo:

Tabela 1. Parâmetros voltamétricos e condições experimentais otimizadas para a determinação de rutina, utilizando-se a CAdSV com DP.

Parâmetros	
Eletrólito suporte e pH	Tampão fosfato pH 6
Potencial de acumulação	-1,000 V
Amplitude de pulso	70 mV
Velocidade de varredura	50 mV s ⁻¹
Tempo de acumulação	180 s
Concentração de Cu ²⁺	1,6 x 10 ⁻⁶ mol L ⁻¹

Após a otimização dos parâmetros voltamétricos, obteve-se a curva analítica para a rutina em tampão fosfato pH 6. A curva analítica (Figura 3), no intervalo de concentração de 2,0 x 10⁻⁷ a 1,4 x 10⁻⁶ mol L⁻¹, apresentou a equação $I_{pc} \text{ (nA)} = 10,070 + 1,9 \times 10^8 [\text{Rutina}]$ ($r = 0,999$), com Limite de Detecção (LD) 7,0 x 10⁻⁹ mol L⁻¹ e Limite de Quantificação (LQ) 2,2 x 10⁻⁸ mol L⁻¹, calculados a partir de: LD = 3Sb/b; LQ = 10Sb/b, em que Sb é o desvio padrão das medidas do branco e b é a inclinação da curva analítica (MILLER e MILLER, 1993).

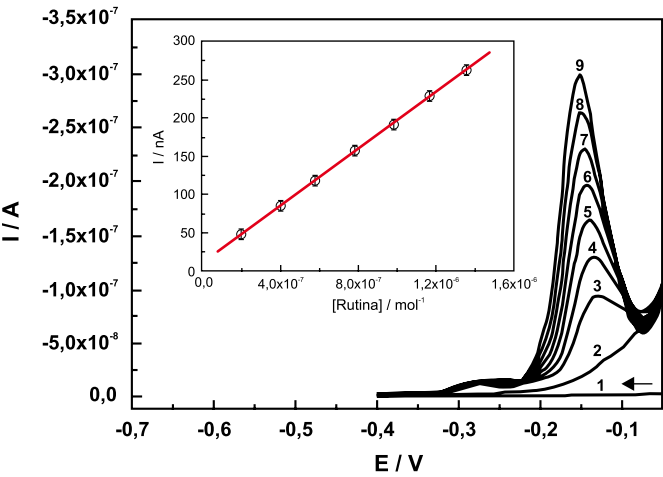


Figura 3. Voltamogramas adsorptivos de redissolução catódica de pulso diferencial obtidos para Cu(II) 1,6 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ (2) em 10 mL de tampão fosfato pH 6 (1) em diferentes concentrações de rutina: 2,0 x 10⁻⁷ (3); 3,9 x 10⁻⁷ (4); 5,9 x 10⁻⁷ (5); 7,8 x 10⁻⁷ (6); 9,7 x 10⁻⁷ (7); 1,2 x 10⁻⁶ (8) e 1,4 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ (9). Inserção: Curva analítica. E_{ac} = -1,000 V, t_{ac} = 180 s, E_i = 0,100 V; E_f = -0,400 V, amplitude de pulso = 70 mV, v = 50 mV s⁻¹, Eletrodo de trabalho: HMDE, Eletrodo de referência: Ag/AgCl (KCl 3 mol L⁻¹).

Utilizou-se o método desenvolvido, juntamente com o método de adição de padrão, para a determinação de rutina em duas cultivares de soja. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 2. Observa-se que

nos grãos da cultivar P98R62 não foi detectada rutina. Este resultado já era esperado, pois em grãos de soja os principais isoflavonoides presentes são a genistina, daidzina e suas formas agliconas (CARRÃO-PANIZZI et al., 2002). No entanto, para as folhas da cultivar IAC 100, este flavonoide foi detectado com concentração média de 0,197 mg/g. Este valor foi muito inferior ao encontrado por Piubelli et al. (2005) utilizando HPLC na determinação de rutina em folhas de soja do mesmo genótipo (IAC 100), produzidas em casa de vegetação (T = 23 ± 2 °C, UR = 78%) na região Sul do Brasil (temperatura média local de 23°C). Entretanto, esta diferença pode ser atribuída às altas temperaturas da região Centro-Oeste do Brasil (temperatura média de 27°C, reproduzida em casa de vegetação) durante o desenvolvimento dos grãos, pois demonstrou-se que a temperatura foi o principal fator na determinação dos níveis de flavonoides em grãos de soja (TSUKAMOTO et al., 1995). Carrão-Panizzi et al. (1995, 1999) também observaram uma variação na concentração de flavonoides entre cultivares de soja produzidas em diferentes regiões do país. A recuperação de rutina adicionada variou de 94 a 105%, indicando ausência de efeito de matriz.

Tabela 2. Determinação de rutina em amostras de soja.

Amostras de soja	Rutina ^a (mg/g)	
P98R62 (Grãos)	-	-
IAC 100 (Folhas)	0.197 ± 0.038	0.972 ± 0.082 ^b

^aValores médios para três determinações independentes.
^bPiubelli et al. (2005).

Conclusão

O método eletroanalítico desenvolvido, baseado na acumulação do complexo Cu(II)-rutina no HMDE, apresentou baixos limites de detecção e quantificação para a rutina, além de uma faixa de recuperação indicativa de que não há interferência de matriz. Aplicou-se este método com sucesso na determinação de rutina em grãos e folhas de duas cultivares de soja. A diferença entre o resultado obtido na determinação de rutina nas folhas da cultivar IAC 100 (cultivada na região Centro-Oeste), utilizando-se CAdSV, e o resultado encontrado na literatura para a mesma cultivar produzida na região Sul do Brasil, utilizando-se HPLC, sugere que a temperatura durante o desenvolvimento do grão é um fator importante na determinação

dos níveis de flavonoides em grãos de soja. Os resultados obtidos podem ser aplicados futuramente no manejo integrado de pragas e em programas de melhoramento genético, contribuindo para a sustentabilidade de sistemas agrícolas baseados na produção de soja.

Referências bibliográficas

ARAB, A.; BENTO, J. M. S. Plant volatiles: new perspectives for research in Brazil. **Neurotropical Entomology**, Londrina, v. 35, n. 2, p. 151-158, 2006.

BELORE, L. C.; RAMIRO, Z. A.; FARIA, A. M.; MARINO, C. A. B. Danos causados por percevejo (Hemiptera: Pentatomidae) em cinco cultivares de soja (GLYCINE MAX) no município de Araçatuba, SP. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 70, n. 2, p. 169-175, 2003.

BUKOVINSZKY, T.; GOLS, R.; POSTHUMUS, M. A.; VET, L. E. M.; VAN LENTEREN, J. C. Variation in plant volatiles and attraction of the parasitoid *Diadegma semiclausum* (Hellen). **Journal of Chemical Ecology**, Amsterdam, v. 31, n. 3, p. 461-480, 2005.

CARRÃO-PANIZZI, M. C.; BELÉIA, A. D. P.; KITAMURA, K.; OLIVEIRA, M. C. N. Effects of genetics and environment on isoflavone content of soybean from different regions of Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 10, p. 1787-1795, 1999.

CARRÃO-PANIZZI, M. C.; FAVONI, S. P. G.; KIKUCHI, A. Extration time for soybean isoflavone determination. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 45, n. 4, p. 515-518, 2002.

CARRÃO-PANIZZI, M. C.; KITAMURA, K.; Isoflavone content in Brazilian soybean cultivars. **Breeding Science**, Kyoto, v. 45, n. 3, p. 295-300, 1995.

DICKE, M.; van LOON, J. J. A. Multitrophic effects of herbivore- induced plant volatiles in an evolutionary context. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v.9, p. 237-249, 2000.

ENSAFI, A. A.; HAJJAN, R. Determination of rutin in pharmaceutical compounds and tea using cathodic adsorptive stripping voltammetry. **Electroanalysis**, Weinheim, v. 18, n. 6, p. 579-585, 2006.

FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. **Stages of soybean development**. Ames: Iowa State University, 1977. 12p. (Special Report, 80).

HEIL, M. Indirect defence via tritrophic interactions. **New Phytologist**, London, v. 178, n. 1, p. 41-61, 2008.

MICHEREFF, M. F. F.; MORAES, M. C. B.; DINIZ, I. R.; LAUMANN, R. A.; BORGES, M. Interação tri-trófica soja-Euschistus heros (Hemiptera: Pentatomidae) - *Telenomus podisi* (Hymenoptera: Scelionidae). In: ENCONTRO BRASILEIRO DE ECOLOGIA QUÍMICA, 6, 2009, Viçosa, MG. **Resumos**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2009. p. 59.

MILLER, J. A.; MILLER, J. N. Statistics for analytical chemistry. 3.ed. New York: Ellis Horwood, 1993. 233 p.

MORAES, M. C. B.; LAUMANN, R. A.; PIRES, C. S.; SUJI, E. R.; BORGES, M. Induced volatiles in soybean and pigeon pea plants artificially infested with the neotropical brown stink bug, *Euschistus heros*, and their effect on the egg parasitoid, *Telenomus podisi*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 33, p. 227-237, 2005.

MORAES, M. C. B.; LAUMANN, R. A.; PAREJA, M.; SERENO, F. T. P. S.; MICHEREFF, M. F. F.; BIRKETT, M. A.; PICKETT, J. A.; BORGES, M. Attraction of the stink bug egg parasitoid *Telenomus podisi* to defence signals from soybean activated by treatment with *cis*-jasnone. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 131, n. 2, p. 178-188, 2009.

MORAES, M. C. B.; PAREJA, M.; LAUMANN, R. A.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; BORGES, M. Response of the parasitoid *Telenomus podisi* to induced volatiles from soybean damaged by stink bug herbivory and oviposition. **Journal of Plant Interactions**, London, v. 3, n. 2, p. 1742-1756, 2008.

PAREJA, M.; MORAES, M. C. B.; CLARK, S. J.; BIRKETT, M. A.; POWELL, W. Response of the aphid parasitoid *Aphidius funebris* to volatiles from undamaged and aphid-infested *Centaurea nigra*. **Journal of Chemical Ecology**, Amsterdam, v. 33, n. 4, p. 695-710, 2007.

PARK, Y. K.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; MASCARENHAS, H. A. A.; SCAMPARINI, A. R. P. Avaliação do teor de isoflavonas em soja brasileira. **Ciencia y Tecnología Alimentaria**, Ciudad de México, v. 3, n. 3, p. 156-160, 2001.

PEREZ, F. J.; ORMENONUNEZ, J. Difference in hydroxamic acid content in roots and root exudates of wheat (*Triticum aestivum* L.) and rye (*Secale cereale* L.): possible role in allelopathy. **Journal of Chemical Ecology**, Amsterdam, v. 17, n. 6, p. 1037-1043, 1991.

PICKETT, J. A.; BIREKTT, M. A.; MORAES, M. C. B.; BRUCE, T. J. A.; CHAMBERLAIN, K.; GORDON-WEEKS, R.; MATTHES, J. A.; NAPIER, J. A. SAMRT, L. E.; WADHAMS, L. J., WOODCOCK, C. M. *Cis*-Jasmone as allelopathic agent in inducing plant defence. **Allelopathy journal**, v. 19, n. 1, p. 109-118, 2007.

PIUBELLI, G. C.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; ARRUDA, I. C.; FRANCHINI, J. C.; LARA, F. M. Flavonoid Increase in Soybean as a Response to *Nezara viridula* Injury and its effect on insect-feeding preference. **Journal of Chemical Ecology**, Amsterdam, v. 29, n. 5, p. 1223-1233, 2003b.

PIUBELLI, G. C.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; ARRUDA, I. C.; LARA, F. M. Nymphal development, lipid content, growth and weight gain of *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera; pentatomidae) fed on soybean genotypes. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 32, n. 1, p. 127-132, 2003a.

PIUBELLI, G. C.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; MOSCARDI, F.; MIYAKUBO, S. H.; OLIVEIRA, M. C. N. Are chemical compounds important for soybean resistance to *Anticarsia gemmatilis*? **Journal of Chemical Ecology**, Amsterdam, v. 31, n. 7, p. 1509-1525. 2005.

PORTUGAL, A. D. State of the soybean agribusiness in Brazil. In: KAUFFMANN (Ed.). World soybean research conference, 6., Soybean Feeds the World, 1999, Chicago. **Proceeding**. Superior printing: Champaign, IL, 1999. p. 39-45.

REICHART, E.; OBENDORF, D. Determination of naringin in grapefruit juice by cathodic stripping differential pulse voltammetry at the hanging

mercury drop electrode **Analytica Chimica Acta**, Shannon, v. 360, n. 1-3, p. 179-187, 1998.

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

TEMERK, Y. M.; IBRAHIM, H. S. M.; SCHUHMANN, W. Cathodic adsorptive stripping voltammetric determination of the antitumor drug rutin in pharmaceuticals, human urine, and blood serum. **Microchimica Acta**, Vienna, v. 153, n. 1-2, p. 7-13, 2006.

TSUKAMOTO, C.; SHIMADA, S.; IGITA, K.; KUDOU, S.; KOKUBUN, M.; OKUBO, K.; KITAMURA, K. Factors affecting isoflavone content in soybean seeds: changes in isoflavones, saponins, and composition of fatty acids at different temperatures during seed development. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Davis, v. 43, n. 5, p. 1184-1192, 1995.

UNDERTRUP, A. G.; RAVNSKOV, S.; HANSEN, H. C. B.; FOMSGAARD, I. S. Biotransformation of 2-Benzoxazolinone to 2-Amino-(3*H*)-Phenoxazin-3-one and 2-Acetylamino-(3*H*)-Phenoxazin-3-one in Soil. **Journal of Chemical Ecology**, Amsterdam, v. 31, n. 5, p. 1205-1222, 2005.

WU, L.; JAMES B. LAUGHLIN JUNIOR, J. B.; DEWALD, H. D. Voltammetry and LCEC of isoflavones. **Electroanalysis**, Weinheim, v. 9, n. 10, p. 796-799, 1997.

ZOULIS, N. E.; CONSTANTINOS, E. E. Preconcentration at a carbon-paste electrode and determination by adsorptive-stripping voltammetry of rutin and other flavonoids. **Analytica Chimica Acta**, Shannon, v. 320, n. 2-3, p. 255-261, 1996.

**Circular
Técnica, 85**

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Endereço: Parque Estação Biológica (PqEB) - Avenida
W5 Norte; Caixa Postal 02372 - Brasília, DF - Brasil;
CEP: 70770-900
Fone: (61) 3448-4700
Fax: (61) 3340-3624
E-mail: sac@cenargen.embrapa.br
1ª edição
Publicação *on line* (2009)

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



**Comitê
Local de
Publicações**

Presidente: *Lúcio Brunale*
Secretária-Executiva: *Lígia Sardinha Fortes*
Membros: *José Roberto de Alencar Moreira, Diva Maria de Alencar Dusi, Regina Maria Dechechi G. Carneiro, Samuel Rezende Paiva e Jonny Everson Scherwinski Pereira.*
Membros suplentes: *João Batista Tavares da Silva e Margot Alves Nunes Dode.*

Expediente

Revisão de texto: *José Cesamildo Cruz Magalhães*
Normalização bibliográfica: *Ana Flávia do Nascimento Dias*
Tratamento das ilustrações: *Cíntia Pereira da Silva*
Editoração eletrônica: *Cíntia Pereira da Silva*