



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

JOSÉ TIAGO PEREIRA BARBOSA

**INVESTIGAÇÃO DE METAIS, METALOIDES, HALOGÊNIOS
E ISOFLAVONAS EM AMOSTRAS DE SOJA E DERIVADOS**

Salvador

2012

JOSÉ TIAGO PEREIRA BARBOSA

**INVESTIGAÇÃO DE METAIS, METALOIDES, HALOGÊNIO
E ISOFLAVÓNAS EM AMOSTRAS DE SOJA E DERIVADOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria das Graças A. Korn

Co-Orientador: Prof. Dr. Jorge Maurício David

Salvador

2012

Sistema de Bibliotecas – IQ/UFBA

Barbosa, José Tiago Pereira.

Investigação de metais, metaloides, halogênios e isoflavonas em amostras de soja e derivados / José Tiago Pereira Barbosa. - 2012.
177 f. : il.

Orientadora: Profª. Drª. Maria das Graças Andrade Korn.

Co-orientador: Prof. Dr. Jorge Mauricio David.

Tese (doutorado) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química, Salvador, 2011.

1. Soja. 2. Soja - Metais. 3. Soja – Isoflavonas. 4. Cromatografia líquida de alta eficiência. 5. Análise espectral. I. Korn, Maria das Graças Andrade. II. David, Jorge Mauricio. III. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Química. III. Título.

CDD – 583.74

CDU – 543.42:633.34

TERMO DE APROVAÇÃO

JOSÉ TIAGO PEREIRA BARBOSA

INVESTIGAÇÃO DE METAIS, METALÓIDES, HALOGÊNIO E ISOFLAVONAS
EM AMOSTRAS DE SOJA E DERIVADOS

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Química,
Universidade Federal da Bahia, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. Geraldo Domingues Matos Geraldo Domingues Matos
Doutorado em Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Hugo Neves Brandão Hugo Neves Brandão
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Jorge Mauricio David – Co-Orientador Jorge Mauricio David
Doutorado em Química Orgânica, Universidade de São Paulo (USP)
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dra. Lícia Passos Santos Cruz Lícia Passos Santos Cruz
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dra. Maria das Graças Andrade Korn – Orientadora Maria das Graças Andrade Korn
Doutorado em Química, Universidade de São Paulo (USP)
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Mauro Korn Mauro Korn
Doutorado em Química, Universidade de São Paulo (USP)
Universidade do Estado da Bahia

Salvador, 30 de novembro de 2011.

A

Beatriz Galvão, avó querida, pelas orações, amor e direcionamento (*in memoriam*).

Maria José Pacheco dos Santos, avó querida, pelo amor e orações (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e oportunidades.

Aos meus pais, Djalma e Lea, e a minha irmã Beatriz.

A Vanessa pelo amor e compreensão.

A toda a minha família.

A Adriana pelo apoio incondicional e incentivo.

Aos membros da Comissão Examinadora pela contribuição.

A Maria das Graças Korn pela amizade e orientação neste trabalho.

Ao professor Jorge Maurício David pela orientação neste trabalho.

Ao professor Mauro Korn pela amizade e por promover o interesse pela Química Analítica juntamente com a oportunidade na iniciação científica.

Ao professor Madson pela amizade e orientação na iniciação científica.

Ao professor Leonardo pela amizade e apoio constante.

Ao professor Alaílson pela amizade e discussões científicas.

Aos meus amigos Gabriel, Geovani, Jorginho, Cláudio, Geraldo, Daniel, Eduardo, Tiago, Tadeu e Sadi, por tudo.

A Telmisson e Luiz pela amizade de longa data.

Ao meu amigo Mauro Guida (*in memoriam*) pela amizade, apoio e ensinamentos grandiosos.

A Daniele, Denílson e Elane pela amizade e apoio.

A Lilia pela oportunidade de co-orientação na iniciação científica e pelo auxílio no trabalho.

Aos meus alunos que me apoiaram e me ensinaram muito durante os últimos dois anos de doutorado.

Aos alunos e professores do Grupo de Pesquisa em Produtos Naturais (GPPN), em especial a Hugo Medrado pela amizade e apoio constante, e a Raul pelo auxílio com o trabalho.

Aos alunos e professores do Laboratório de Análises Químicas Industriais e Ambientais (LAQUIA) do Departamento de Química da UFSM em especial ao professor Érico Flores pela amizade e orientação no trabalho, à Clarissa pelo apoio constante durante todo o desenvolvimento do trabalho, à Fernanda pela amizade e demasiado auxílio durante toda a execução dos experimentos, aos amigos Jucelino e Ederson pela amizade e momentos de diversão.

Aos alunos do GRPQQ, Adriana, Arlene, Cleber, Daniela, Danilo, Débora, Fernanda, Geovani, Geovane, Ivanice, Jeane, Laiana, Lidiane, Marcelo, Mário, Raineldes, Robson, Rogete e Uenderson pela amizade e auxílio.

A todos os professores do Curso de Licenciatura em Química da UNEB e do Instituto de Química da UFBA, pela contribuição na minha formação.

A todos os funcionários do Instituto de Química da UFBA que estão sempre dispostos a colaborar em especial a Wilson, Dona Margarida, Cláudio e Vivaldino.

Aos alunos e ex-alunos do GPQA: Fernanda, Geysa, Thaís, Milena, Jacira, Taiana, Wdson, Elecy, Fátia, Larissa, Isa, Wagna e Leandro.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro na forma de bolsa de estudo e ao Programa de Pós – Graduação em Química da UFBA pela oportunidade.

A todos os meus verdadeiros amigos que torcem pelo meu sucesso e a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Crê em ti mesmo, age e verás os resultados. Quando te esforças, a vida também se esforça para te ajudar.

Chico Xavier

BARBOSA, José Tiago Pereira. Investigação de metais, metaloides, halogênios e isoflavonas em amostras de soja e derivados. 177 f. 2012. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2012.

RESUMO

A soja é uma leguminosa que possui notável relevância no cenário internacional essencialmente em função de suas características funcionais e nutracêuticas. O consumo da soja é considerado benéfico não somente pela potencialidade nutricional associada, como também pelo efeito preventivo contra inúmeras doenças crônicas principalmente em virtude da presença de isoflavonas em sua constituição. O objetivo do trabalho consistiu no desenvolvimento de estratégias para a determinação da composição multielementar e do teor das isoflavonas daidzeína e genisteína em amostras de soja em grãos e derivados comercializadas/cultivadas nas cidades de Salvador e Barreiras, Bahia e Uberlândia, Minas Gerais. Para a avaliação multielementar foram propostos dois procedimentos: decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas empregando ácidos diluídos (PAD) e decomposição utilizando combustão induzida por micro-ondas (MIC), empregando técnicas espectrométricas (ICP OES e ICP-MS) para detecção dos analitos. O procedimento de análise cromatográfica foi desenvolvido para a determinação de daidzeína e genisteína nas amostras estudadas empregando a técnica HPLC-DAD. Para o procedimento PAD foram avaliadas diferentes concentrações de HNO_3 (2,1 – 14,5 mol L^{-1}) utilizando H_2O_2 como agente oxidante auxiliar para a decomposição de aproximadamente 250 mg de amostra. A eficiência de decomposição para as diferentes concentrações ácidas foi avaliada considerando os parâmetros acidez e teor de carbono residual e percentual de recuperação dos analitos, de modo que a concentração de 2,1 mol L^{-1} em HNO_3 foi selecionada. O procedimento de decomposição empregando MIC permitiu a decomposição de uma massa de amostra de 400 mg, utilizando como solução absorvedora HNO_3 a 6,0 mol L^{-1} para a determinação multielementar. Para a determinação dos halogênios Cl, Br e I, foi utilizada como solução absorvedora NH_4OH a 100 mmol L^{-1} . A exatidão dos procedimentos PAD e MIC foi avaliada com material de referência certificado (NIST-1568a) e o desempenho quanto à precisão e LOQ foi também avaliado. Estes procedimentos se mostraram adequados para a determinação multielementar nas amostras sendo considerados alternativas promissoras, devido à minimização do consumo de reagentes e de geração de efluentes, de acordo com os princípios da química verde. Na determinação das isoflavonas, foi proposto um procedimento de análise cromatográfica empregando-se extração acelerada (ASE) com solvente (metanol) e posterior separação e detecção destes analitos por HPLC-DAD utilizando os solventes acetonitrila e ácido acético em eluição isocrática. Para a validação do método foram considerados os parâmetros: seletividade, linearidade, precisão, limites de detecção e quantificação. Os resultados obtidos estiveram nas faixas: daidzeína (10,3 a 34,0 $\mu\text{g g}^{-1}$) e genisteína (18,5 a 77,8 $\mu\text{g g}^{-1}$). Este procedimento se mostrou adequado para a identificação e quantificação destas isoflavonas nas amostras. O presente trabalho contribuiu para traçar um perfil preliminar das amostras de soja em grãos e derivados em termos de micronutrientes, contaminantes e as isoflavonas daidzeína e genisteína.

Palavras chave: soja; preparo de amostra; espectrometria; cromatografia.

BARBOSA, José Tiago Pereira. Investigation of metals, metalloids, halogens and isoflavones in soy samples and its derivatives. 177 pp. 2012. Doctoral Thesis – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2012.

ABSTRACT

Soy is a crop with considerable importance due its nutraceutical and functional proprieties. The consumption of soyfoods is considered a benefit because of their nutritional proprieties and preventive effect against many chronic diseases mainly due to the presence of isoflavones in their constitution. The objective of this study was to develop strategies for the determination of several elements besides daidzein and genistein in soybeans and commercial soy products samples from Brazilian Bahia and Minas Gerais states. Two different procedures were proposed to evaluate the soy multielement composition: a closed-vessel microwave-assisted acid decomposition procedure employing diluted acid (PAD) and a procedure using microwave-induced combustion (MIC), for further determination of the analytes by ICP-OES and ICP-MS. The concentrations of daidzein and genistein in the samples were determined by HPLC-DAD. For the PAD procedure, different concentrations of HNO_3 (2.1 to 14.5 mol L^{-1}) associated to hydrogen peroxide as auxiliary oxidant agent were evaluated to the decomposition of approximately 250 mg of sample. The efficiency of decomposition for different acid concentrations was evaluated considering the parameters: residual acidity and residual carbon content, and the percentage recovery of the analytes, so that the nitric acid concentration selected was 2.1 mol L^{-1} . The MIC procedure was performed using sample masses of 400 mg and the combustion was carried out using HNO_3 (6.0 mol L^{-1}) as absorbing solution for the multielement determination. For the halogens determination (Cl, Br and I), NH_4OH to 100 mmol L^{-1} was used as the absorbing solution. The accuracy of the both procedures was verified with certified reference material (NIST – 1568a) and the performance regarding to precision and LOQ was also evaluated. These procedures were suitable for multielement determination in the samples analyzed. They are considered promising alternatives due to minimization of reagent consumption and effluent generation, according to the green chemistry recommendations. For the isoflavones determination, a HPLC method was optimized employing the solvents acetonitrile and acetic acid in isocratic elution after accelerated solvent (ASE) extraction (methanol) procedures. The method validation was performed considering the following parameters: selectivity, linearity, precision, limits of detection and quantification. Between the different samples the daidzein e genistein content varied from 10.3 to 34.0 $\mu\text{g g}^{-1}$ and 18.5 to 77.8 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectively. This procedure is adequate for the identification and quantification of these isoflavones in the samples. The present work is important, since it was possible obtain the profile of the soybean samples and commercial soy products in terms of micronutrients, contaminants and the daidzein and genistein isoflavones.

Keywords: soy, sample preparation, spectrometry; chromatography.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Centro de origem e disseminação da soja.....	23
Figura 2 Evolução da produção de soja no Oeste da Bahia.....	25
Figura 3 Estrutura geral de isoflavonas.....	32
Figura 4 Estrutura química das principais isoflavonas da soja.....	33
Figura 5 Gráfico de pesos.....	102
Figura 6 Gráfico de escores.....	103
Figura 7 Esquema do frasco de quartzo utilizado para decomposição por MIC.....	114
Figura 8 Equipamento de extração acelerada com solvente, Dionex (ASE 100 TM).....	134
Figura 9 Esquema do procedimento de extração acelerada com solvente.....	135
Figura 10 Cromatograma obtido para separação de daidzeína e genisteína nas condições iniciais estudadas.....	138
Figura 11 Cromatograma obtido para separação de daidzeína e genisteína durante a otimização.....	139
Figura 12 Cromatograma obtido para separação de daidzeína e genisteína para as condições ótimas de análise.....	140
Figura 13 Espectros no ultravioleta para a daidzeína.....	142
Figura 14 Espectros no ultravioleta para a genisteína.....	142
Figura 15 Curva analítica para a daidzeína.....	144
Figura 16 Curva analítica para a genisteína.....	144
Figura 17 Estrutura geral para as isoflavonas daidzeína e genisteína.....	149
Figura 18 Cromatograma referente à determinação de daidzeína e genisteína na amostra SG1.....	151
Figura 19 Espectro no UV para pico não identificado no tempo de retenção 0,77 min.....	152
Figura 20 Espectro no UV para pico não identificado no tempo de retenção 1,02 min.....	152
Figura 21 Espectro no UV para pico não identificado no tempo de retenção 1,29 min.....	152
Figura 22 Espectro no UV para pico não identificado no tempo de retenção 2,55 min.....	153

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Composição Média das diferentes partes do grão de soja.	26
Tabela 2 Distribuição dos carboidratos na semente de soja.	28
Tabela 3 Teores de vitaminas na soja.....	29
Tabela 4 Composição em minerais da soja.....	30
Tabela 5 Classificação e estruturas de isoflavonas de soja.	32
Tabela 6 Distribuição logarítmica da concentração de alguns metais na crosta terrestre e no homem, associada a algumas funções e deficiências.....	37
Tabela 7 Procedimentos para determinação de isoflavonas em grãos de soja e derivados..	52
Tabela 8 Procedimentos para determinação de minerais em soja em grãos e derivados.....	67
Tabela 9 Programa de aquecimento para o procedimento de digestão em forno de micro-ondas com cavidade.	74
Tabela 10 Parâmetros instrumentais para as medidas por ICP OES axial, Varian.....	75
Tabela 11 Parâmetros operacionais do ICP-MS.	76
Tabela 12 Concentrações (mg Kg^{-1}) dos analitos no material de referência certificado NIST 1568a após decomposição em forno de micro-ondas com cavidade empregando ácido nítrico $14,5 \text{ mol L}^{-1}$. Valores médios ($n=3$) e desvio padrão (s).....	78
Tabela 13 Concentrações ($\mu\text{g g}^{-1}$) dos analitos na amostra de soja em grãos, após decomposição em forno de micro-ondas com cavidade em diferentes concentrações de HNO_3 . Valores médios ($n=3$) e desvio padrão (s).....	79
Tabela 14 Eficiência da extração (%) de micro elementos em amostras de soja em grãos, nas diferentes proporções ácidas avaliadas em comparação com o procedimento de referência ($\text{HNO}_3 14,5 \text{ mol L}^{-1}$).....	80
Tabela 15 Valores de acidez residual (mol L^{-1}) para os digeridos obtidos a partir da digestão de amostra de soja em grãos em forno de micro-ondas com cavidade, nas diferentes concentrações ácidas.	81
Tabela 16 Teores de carbono residual (RCC \% m v^{-1}) para amostra de soja em grãos, após a aplicação do procedimento de digestão em forno de micro-ondas com cavidade nas diferentes concentrações ácidas.....	81
Tabela 17 Dados de regressão para as curvas analíticas, usando soluções padrão em $\text{HNO}_3 2,1 \text{ mol L}^{-1}$ e com adição de analito no digerido com $\text{HNO}_3 2,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($n=6$).....	84
Tabela 18 Valores de CV% para amostras de proteína texturizada de soja, soja em grãos e extrato de soja com detecção por ICP OES e ICP-MS.....	85

Tabela 19 Concentrações (mg Kg^{-1}) dos analitos no material de referência certificado NIST 1568a após decomposição em forno de micro-ondas com cavidade empregando ácido nítrico $2,1 \text{ mol L}^{-1}$. Valores médios ($n=3$) e desvio padrão (s).....	86
Tabela 20 Teste de adição e recuperação em quatro níveis de concentração para microelementos com detecção por ICP OES.	87
Tabela 21 Teste de adição e recuperação na concentração de $30,0 \mu\text{g L}^{-1}$ para microelementos com detecção por ICP-MS.	88
Tabela 22 Estimativa dos limites e detecção e quantificação para ICP OES.....	89
Tabela 23 Estimativa dos limites e detecção e quantificação para ICP-MS.....	90
Tabela 24 Comparativo entre os valores de LOQ obtidos para os procedimentos de decomposição utilizando HNO_3 a $14,5$ e $2,1 \text{ mol L}^{-1}$	90
Tabela 25 Relação de amostras utilizadas na avaliação da composição multielementar.	92
Tabela 26 Concentrações ($\mu\text{g g}^{-1}$) de micro-elementos presentes em 22 amostras de soja em grãos e derivados com detecção por ICP OES.	93
Tabela 27 Concentrações ($\mu\text{g g}^{-1}$) de micro-elementos presentes em 22 amostras de soja em grãos e derivados com detecção por ICP-MS.	94
Tabela 28 Teores em $\mu\text{g g}^{-1}$ de Cr, Cu, Fe, Mn, Ni e Zn para amostras de soja em grãos adquiridas em cinco países.....	97
Tabela 29 Teores em $\mu\text{g g}^{-1}$ de Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Se e Zn em para amostras de farinha de soja adquiridas em cinco países.	97
Tabela 30 Resultados da ANOVA fator único.	100
Tabela 31 Relação entre as componentes principais e a variância da análise.	101
Tabela 32 Pesos das variáveis em relação às duas primeiras componentes principais.	101
Tabela 33 Parâmetros instrumentais para as medidas por ICP OES, ICP-MS e FI-HG-ICP-MS.	112
Tabela 34 Valores de CV% para a decomposição por MIC e DA-MO ($n=8$).....	117
Tabela 35 Resultados para as concentrações de microelementos e halogênios em material de referência certificado por ICP OES e ICP-MS e após digestão por MIC e DA-MO. Resultados em $\mu\text{g g}^{-1}$ (média e desvio padrão para $n=3$).	118
Tabela 36 Resultados obtidos para LOD e LOQ do método por ICP OES e ICP-MS.....	120
Tabela 37 Resultados ($\mu\text{g g}^{-1}$) para determinação multielementar em derivados de soja por ICP OES após decomposição por MIC e DA-MO ($n=3$).	122
Tabela 38 Concentrações de halogênios em amostras de produtos derivados de soja por ICP-MS após digestão por MIC. Resultados em $\mu\text{g g}^{-1}$ (média e desvio padrão para $n=3$).	123

Tabela 39 Concentrações ($\mu\text{g g}^{-1}$) de daidzeína e genisteína em amostra de soja em grãos (SG1) para os procedimentos de extração PEM e PEAS.....	141
Tabela 40 Equações referentes às curvas analíticas e valores de coeficientes de correlação para as isoflavonas de interesse.....	144
Tabela 41 Resultados para a precisão do método.	145
Tabela 42 Limites de detecção e quantificação obtidos para daidzeína e genisteína.....	146
Tabela 43 Valores de concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$) de daidzeína e genisteína para amostras de soja em grãos e derivados.	147
Tabela 44 Correlação linear de Pearson (r) para Cu, Fe, Mn, Zn, daidzeína e genisteína para amostras de soja em grãos (n=4).....	154
Tabela 45 Correlação linear de Pearson (r) para Cu, Fe, Mn, Zn, daidzeína e genisteína para amostras de proteína texturizada de soja (n=4).	155

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ADIN	Acetildaidzina
AGIN	Acetilgenistina
AGLIN	Acetilglicitina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BIOA	Biochanina A
CAL	Calicosina
CCT	do inglês: <i>Collision Cell Technology</i> . Tecnologia de Célula de Colisão
CE-ED	do inglês: <i>Capillary Electrophoresis with Electrochemical Detection</i> . Eletroforese Capilar com Detecção Eletroquímica
CP	Componente Principal
CV	Coeficiente de Variação
DA	Daidzeína
DA-MO	Digestão Ácida Assistida por Micro-ondas
DIN	Daidzina
DMFS	Dispersão de Matriz em Fase Sólida
DPSA	do inglês: <i>Derivative Potentiometric Stripping Analysis</i> . Análise de Redissolução Potenciométrica Derivativa
DTPA	Ácido Dietilenotriamino Pentacético
EAS	Extração Acelerada com Solvente
ECC	do inglês: European Economic Community

ES	Extrato de Soja
FAAS	do inglês: <i>Flame Atomic Absorption Spectrometry</i> . Espectrometria de Absorção Atômica com Chama
FAES	do inglês: <i>Flame Atomic Emission Spectrometry</i> . Espectrometria de Emissão Atômica com Chama
FI-HG-ICP-MS	do inglês: <i>Flow Injection-Hydride Generation-Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i> . Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado com geração de hidretos por injeção em fluxo
FOR	Formononetina
FS	Farinha de Soja
GC	do inglês: <i>Gas Chromatography</i> . Cromatografia Gasosa
GE	Genisteína
GF AAS	do inglês: <i>Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry</i> . Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite
GIN	Genistina
GLI	Gliciteína
GLIN	Glicitina
HG AAS	do inglês: <i>Hidride Generation Atomic Absorption Spectrometry</i> . Espectrometria de Absorção Atômica com Geração de Hidreto
HPLC	do inglês: <i>High Performance Liquid Chromatography</i> . Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HPLC-DAD	do inglês: <i>High Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection</i> . Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção por Arranjo de Diodos
HPLC-UV	do inglês: <i>High Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection</i> . Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

	com Detecção por Absorção no Ultravioleta
HPLC-UV/DAD	do inglês: <i>High Performance Liquid Chromatography with Simultaneous Ultraviolet and Diode-Array Detection.</i> Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção por Absorção no Ultravioleta e por Arranjo de Diodos
HPLC-UV/MS	do inglês: <i>High Performance Liquid Chromatography with Simultaneous Ultraviolet Detection and Mass Spectral Analysis.</i> Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção por Absorção no Ultravioleta e por Espectrometria de Massas
ICH	do inglês: International Conference on Harmonization. Conferência Internacional em Harmonização
IC-ICP-MS	do inglês: <i>Ion Chromatography coupled to Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry.</i> Cromatografia Iônica acoplada a Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado.
ICP OES	do inglês: Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry. Espectrometria de Emissão Ótica com Plasma Indutivamente Acoplado
ICP-MS	do inglês: <i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry.</i> Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado
KED	do inglês: <i>Kinetic Energy Discrimination.</i> Discriminação por Energia Cinética
LC-APCI-MS	do inglês: <i>Liquid Chromatography with Atmospheric-Pressure Chemical Ionization Coupled to Mass Spectrometry.</i> Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massa Empregando Ionização Química à Pressão Atmosférica
LC-MS	do inglês: <i>Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry.</i> Cromatografia Líquida com Detecção por Espectrometria de Massas
LC-UV	do inglês: <i>Liquid Chromatography with UV Detection.</i> Cromatografia Líquida com Detecção por Absorção no

	Ultravioleta
LOD	do inglês: <i>Limit of Detection</i> . Limite de Detecção
LOQ	do inglês: <i>Limit of Quantification</i> Limite de Quantificação
MDIN	Malonildaidzina
MGIN	Malonilglicitina
MIC	do inglês: <i>Microwave Induced Combustion</i> . Combustão Iniciada por Micro-ondas
MRC	Material de Referência Certificado
ONO	Ononina
PCA	do inglês: <i>Principal Components Analysis</i> . Análise de Componentes Principais
PEAS	Procedimento de Extração Acelerada com Solvente
PEM	Procedimento de Extração por Maceração
PFA	Polifluoro-alcoxi
PRA	Pratenseina
PRU	Prunetina
PSEUB	Pseudobaptigenina
PTFE	Politetrafluoretileno
PTS	Proteína Texturizada de Soja
PUE	Puerarina
RCC	Teor de carbono residual
RSD	do inglês: <i>Relative Standard Deviation</i> . Desvio Padrão Relativo
SG	Soja em Grãos
SGT	Soja em Grãos Transgênica

SIS	Sissotrina
SPME(<i>in tube</i>)- HPLC	do inglês: <i>Solid Phase Micro-Extraction in tube coupled to High Performance Liquid Chromatography</i> . Microextração em Fase Sólida no tubo Acoplada a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
TFM	Teflon Quimicamente Modificado
TGF b	Fator b de Crescimento Tumoral
TR	Tempo de Retenção
VBP	Valor Bruto de Produção
VM	Valor Máximo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
1.1 A SOJA	22
1.2 CLASSIFICAÇÃO DA SOJA	25
1.3 ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO DOS GRÃOS DE SOJA.....	26
1.4 AS ISOFLAVONAS DE SOJA.....	30
1.5 OS METAIS NO ORGANISMO – CONTAMINANTES E NUTRIENTES.....	35
1.6 OBJETIVOS.....	38
1.6.1 Objetivo Geral	38
1.6.2 Objetivos Específicos	38
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	40
2.1 MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE ISOFLAVONAS DE SOJA.....	40
2.2 MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO MULTIELEMENTAR EM AMOSTRAS DE ALIMENTOS	55
3 AVALIAÇÃO DE PROCEDIMENTOS DE DIGESTÃO USANDO ÁCIDO NÍTRICO DILUÍDO PARA A DETERMINAÇÃO MULTIELEMENTAR POR ICP OES E ICP-MS	70
3.1 PARTE EXPERIMENTAL	72
3.1.1 Reagentes e Soluções	72
3.1.2 Amostras	73
3.1.3 Instrumentação	73
3.1.3.1 <i>Procedimentos de decomposição das amostras empregando sistema pressurizado e radiação micro-ondas</i>	73
3.1.3.2 <i>Equipamentos empregados para a determinação multielementar</i>	74
3.2 ESTRATÉGIAS DE PREPARO DE AMOSTRA UTILIZANDO ÁCIDO DILUÍDO	76
3.3 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	77
3.3.1 Acidez Residual e Teor de Carbono Residual	80
3.3.2 Validação do Procedimento Proposto	82
3.3.2.1 <i>Faixa linear de trabalho</i>	83
3.3.2.2 <i>Efeito de matriz</i>	83
3.3.2.3 <i>Precisão</i>	85
3.3.2.4 <i>Exatidão</i>	86
3.3.2.5 <i>Limites de detecção e quantificação</i>	88

3.4	APLICAÇÃO DO PROCEDIMENTO PROPOSTO NA DETERMINAÇÃO MULTIELEMENTAR EM AMOSTRA DE GRÃOS DE SOJA E DERIVADOS	91
3.5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	104
4	COMBUSTÃO INICIADA POR MICRO-ONDAS PARA POSTERIOR DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS TRAÇO E HALOGENIOS EM PRODUTOS DE SOJA POR ICP OES E ICP-MS	106
4.1	PARTE EXPERIMENTAL	110
4.1.1	Reagentes e soluções	110
4.1.2	Amostras	111
4.1.3	Instrumentação	111
4.1.3.1	<i>Procedimento de decomposição de amostras por combustão iniciada por micro-ondas</i>	111
4.1.3.2	<i>Equipamentos empregados para a determinação multielementar</i>	112
4.2	ESTRATÉGIAS DE PREPARO DAS AMOSTRAS POR MIC	113
4.3	APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	115
4.3.1	Validação do procedimento empregando MIC	115
4.3.1.1	<i>Faixa linear de trabalho</i>	115
4.3.1.2	<i>Teor de Carbono Residual</i>	115
4.3.1.3	<i>Precisão</i>	116
4.3.1.4	<i>Exatidão</i>	117
4.3.1.4.1	<i>Avaliação da exatidão com MRC</i>	118
4.3.1.4.2	<i>Comparação com procedimento de digestão ácida assistida por micro-ondas</i>	119
4.3.1.5	<i>Limites de Detecção e Quantificação</i>	119
4.3.2	Aplicação do Procedimento MIC para Decomposição das Amostras	121
4.3.2.1	<i>Determinação multielementar por ICP OES e ICP-MS após decomposição por MIC</i>	121
4.3.2.2	<i>Determinação de Halogênios por ICP-MS após decomposição por MIC</i>	123
4.3.2.3	<i>Determinação de Hg por FI-HG-ICP-MS após decomposição por MIC</i>	126
4.4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	127
5	DETERMINAÇÃO DE DAIDZEÍNA E GENISTEÍNA EM AMOSTRAS DE SOJA EM GRÃOS E DERIVADOS POR HPLC-DAD	129
5.1	PARTE EXPERIMENTAL	131
5.1.1	Reagentes e soluções	131
5.1.2	Amostras	132

5.1.3 Instrumentação	132
5.1.3.1 <i>Procedimentos de extração</i>	132
5.1.3.2 <i>Determinação dos analitos</i>	132
5.2 ESTRATÉGIAS DE PREPARO DAS AMOSTRAS	133
5.2.1 Preparação dos extratos	133
5.2.1.1 <i>Procedimento de extração por maceração (PEM)</i>	133
5.2.1.2 <i>Procedimento de extração acelerada com solvente (PEAS)</i>	134
5.2.2 Otimização das condições da análise cromatográfica por HPLC-DAD	135
5.2.3 Validação do método analítico	136
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	137
5.3.1 Otimização das condições da análise cromatográfica por HPLC-DAD	137
5.3.2 Otimização dos procedimentos de extração PEM e PEAS	140
5.3.3 Validação do método analítico	141
5.3.3.1 <i>Seletividade / Especificidade</i>	141
5.3.3.2 <i>Linearidade</i>	143
5.3.3.3 <i>Precisão</i>	145
5.3.3.4 <i>Limites de Detecção e Limites de Quantificação</i>	146
5.3.4 Determinação das concentrações de Daidzeína e Genisteína em amostras de soja em grãos e derivados	146
5.4 AVALIAÇÃO COMPARATIVA ENTRE A COMPOSIÇÃO MULTIELEMENTAR E OS TEORES DE DAIDZEÍNA E GENISTEÍNA NAS AMOSTRAS ESTUDADAS	153
5.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	156
6 CONCLUSÕES	158
7 REFERÊNCIAS	161

Capítulo I

Considerações sobre a soja

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

A importância da quantificação de macro e micronutrientes, elementos traço assim como a de constituintes orgânicos em alimentos, está associada à evidente necessidade de implementação de nutrientes essenciais na dieta, além do controle da composição nutricional dos alimentos e prevenção de quaisquer distúrbios no organismo causados pela ingestão excessiva de determinados componentes. Dentre os alimentos funcionais conhecidos, a soja além de funções nutricionais básicas, promove benefícios à saúde, reduzindo riscos de ocorrência de doenças crônicas e degenerativas, o que mostra a importância da análise desta matriz objetivando a determinação de sua composição nutricional.

1.1 A SOJA

A inexistência de informações consistentes sobre o local exato da origem da soja ainda constitui um ponto de discordância entre autores. No entanto, é usualmente aceito que esta planta herbácea se origina de espécies de plantas rasteiras que se desenvolviam no oeste da Ásia, mais provavelmente do norte da China. Alguns autores acreditam que o cultivo desta planta na China antecedeu a qualquer registro efetuado e sua evolução teve início com cruzamentos de espécies de soja selvagem (MORAIS, 1996). A sua importância na dieta alimentar daquela época era ímpar, a tal ponto de serem realizados rituais nas vésperas da semeadura e colheita, pois a soja era considerada um dos cinco WuKu, ou seja grãos sagrados, sendo os outros o arroz, o trigo, a cevada e o painço (MORAIS, 1996 e EMBRAPA, 2006).

A expansão do cultivo da soja teve seu início provável entre o ano 200 a.C. e 300 d.C. Coréia e Japão foram os primeiros países a cultivarem a soja além dos limites territoriais da China (Figura 1).

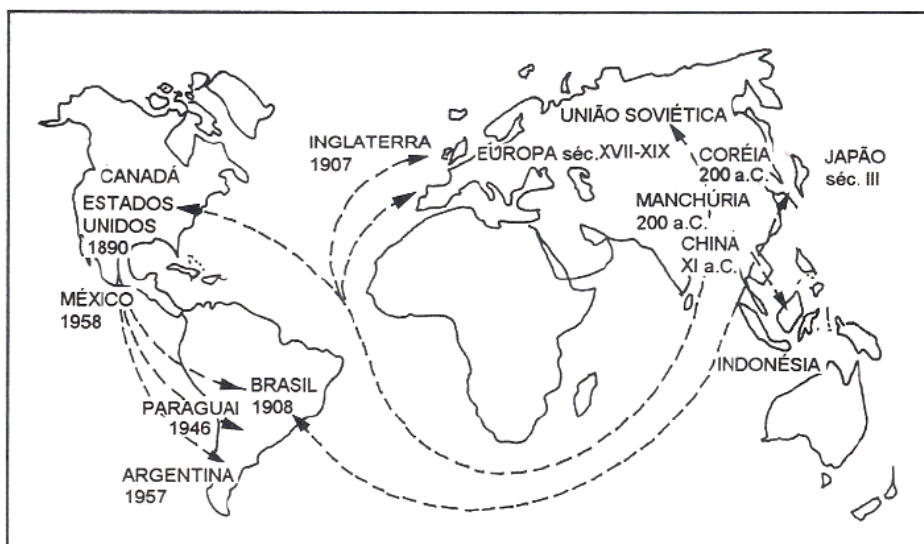


Figura 1. Centro de origem e disseminação da soja no mundo.

Fonte: Bonetti, 1981

Somente entre o final do século XV e início do XVI a soja chegou ao ocidente, mas durante os quatro séculos seguintes foi considerada apenas como curiosidade botânica. A introdução da soja em países ocidentais (França e Inglaterra) ocorreu entre os séculos XVII e XIX. Com a expansão do intercâmbio com o Oriente, a partir de 1900, a importância desta planta cresceu consideravelmente, de modo que a primeira grande importação ocorreu em 1907 com o embarque de cerca de 500 toneladas de soja de Hankow para Liverpool, na Inglaterra (MORAIS, 1996). No continente americano, a soja adquiriu importância a partir de 1880, essencialmente nos Estados Unidos, ainda como uma cultura forrageira e em 1940, foram plantados cerca de dois milhões de hectares desta planta. Desde 1941, a produção de grãos

superou o cultivo forrageiro e iniciou um crescimento exponencial no cultivo mundial da soja, não somente nos E.U.A, como no resto do mundo (MORAIS, 1996).

No continente africano, a introdução desta planta ocorreu em 1910 em áreas restritas. Na Austrália seu cultivo data de cerca de 50 anos, entretanto a importância dispensada a este cultivo ocorreu nos últimos 20 anos (MORAIS, 1996).

No Brasil, a soja foi introduzida em 1882 e os primeiros estudos de avaliação foram desenvolvidos pelo professor Gustavo Dutra, da Escola de Agronomia da Bahia. O primeiro registro de cultivo de soja no país data de 1914, no município de Santa Rosa (RS). Entretanto, foi somente em 1949 que o Brasil, com 25.000 toneladas de grãos, já se colocava no cenário internacional como um grande produtor de soja (CISOJA, 2006).

A partir da década de 60, o cultivo de soja consolidava-se como uma das principais culturas do agronegócio brasileiro. Entre os anos de 1954 e 1958 o Brasil participava com apenas 0,5% da produção mundial de soja. Mas em 1976 respondia por 16% da produção mundial. Isso ocorreu devido à fatores como mecanização total da cultura, geração de tecnologias adaptadas às diferentes condições do país, sua utilização como cultura sucessória ao trigo, possibilitando o aproveitamento da área e de equipamentos, dentre outros. Atualmente o Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja (27%), seguido da Argentina (19%), China (6%) e Índia (4%). Os Estados Unidos são o maior produtor mundial deste grão (35%) (SOYSTATS, 2011). Para a safra 2011/12, a produção brasileira deve crescer 1% somando 75,34 milhões de toneladas (EMBRAPA, 2011), sendo que a produção brasileira de grãos deve ficar entre 157,2 e 160,5 milhões de toneladas para esta safra. A produtividade média da soja brasileira é de 2823 kg por hectares, chegando a alcançar cerca de 3000 kg/ha no centro oeste brasileiro, o maior produtor brasileiro de soja, com um volume estimado entre 17,9 e 18,2 milhões de toneladas, seguido do Paraná (12,8 e 13,0 milhões de toneladas) e do Rio Grande do Sul, onde a pesquisa indica uma produção entre 8,2 e 8,3 milhões de toneladas (SOJA, 2010 e EMBRAPA 2011).

No Estado da Bahia, a produção de soja concentra-se na região oeste, com um valor bruto de produção (VBP) de 3,6 milhões de toneladas (Figura 2) para a safra 2010/2011 (AIBA, 2011), destacando-se o município de São Desidério, com a maior produção deste grão no Estado, tendo registrado o valor de 810 mil toneladas para a safra 2010/2011 (IBGE, 2011).

A estimativa nacional para a safra 2011/2012 é de 72,7 milhões de toneladas, o que indica uma variação negativa de 2,9% em relação ao volume informado para esta safra (IBGE, 2011).

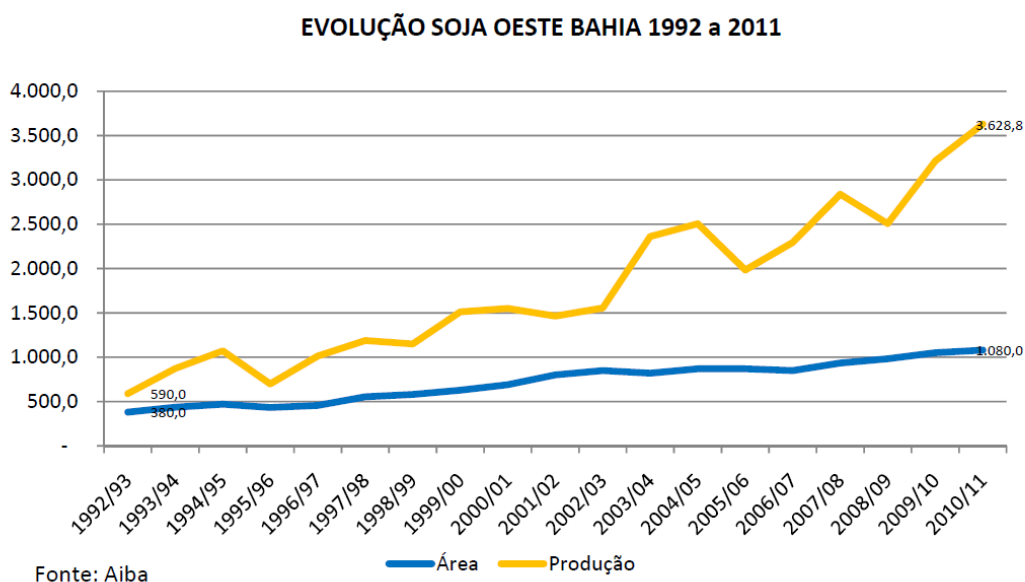


Figura 2. Evolução da produção de soja no Oeste da Bahia.

Fonte: AIBA, 2011)

1.2 CLASSIFICAÇÃO DA SOJA

A soja possui nome científico *Glycine max* (L.) Merrill, e assim como o feijão, lentilha, grão de bico e ervilha é uma leguminosa. Esta planta pertence ao ramo Fanerogama, divisão Angiospermae, classe Dicotyledoneae, ordem Rosales, família

Leuminosae, subfamília Papilionideae e ao gênero *Glycine* L (MORAIS, 1996). O gênero *Glycine* possui 10 espécies, com poucas variedades. As espécies estão distribuídas em três subgêneros: *Glycine*, *Bacytreata* e *Soja*, nos quais o mais importante economicamente é o subgênero *Glycine*, pois neste está incluída a soja cultivada (*Glycine Max* (L.) Merrill), que se constitui como importante fonte de alimento para seres humanos e animais, tendo em vista seu elevado teor de nutrientes (MORAIS, 1996).

1.3 ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO DOS GRÃOS DE SOJA

A semente ou grão compreende três partes principais: a casca, os cotilédones e o hipocótilo, de modo que a composição média dos grãos em proteínas, lipídios, carboidratos e fibras, e as proporções respectivas de suas partes principais são mostradas na Tabela 1.

Tabela 1. Composição Média das diferentes partes do grão de soja.

	%	Composição % (base seca)			
		Proteínas (N x 6,25)	Lipídios	Carboidratos (Incluindo Fibras)	Cinzas
Grão inteiro	100	40	20	35	4,9
Cotilédones	90	43	23	29	5,0
Casca	8	8,8	1	86	4,3
Hipocótilo	2	41	11	43	4,4

Fonte: MORAIS, 1996

Esta composição varia, essencialmente, com o genótipo e fatores climáticos, principalmente: temperatura, umidade do solo e luminosidade (MORAIS, 1996).

Os carboidratos constituem 34% da soja aproximadamente, e correspondem a polissacarídeos insolúveis (como pectinas), e oligossacarídeos solúveis (como hexose e sacarose). A composição em carboidratos da soja é descrita na Tabela 2. As cinzas são ricas nos minerais ferro e zinco. Os lipídios da soja incluem de 1,0 a 3,0% de substâncias não saponificáveis, como alguns esteróides (estigmasterol, campesterol e sistosterol), tocoferóis e vitamina A, de modo que o óleo de soja contém cerca de 15% de ácidos graxos saturados e 85% de insaturados (MORAIS, 1996). A casca é formada por quatro ou cinco camadas sobrepostas contendo células de diferentes tipos. Os cotilédones são constituídos por células denominadas “corpos protéicos” e contêm a maior parte das proteínas do grão, (como as globulinas), que constituem cerca de 90% do teor de proteína da soja. As globulinas têm solubilidade mínima em torno de pH 4,5 e servem como substrato nutritivo para o crescimento do embrião. As proteínas restantes a exemplo das proteínas estruturais e funcionais estão localizadas no restante da semente (CHEFTEL et al., 1989). A casca da soja contém também 87% das fibras de (40 a 53%) celulose, (14 a 33%) hemicelulose e (1 a 3%) lignina (MORAIS, 1996).

Tabela 2. Distribuição dos carboidratos na semente de soja.

Carboidratos	Teor Médio (%)
Celulose	4,0
Hemicelulose	15,0
Estaquiose	3,8
Rafinose	1,1
Sacarose	5,0
Outros açúcares	5,1

Fonte: MORAIS, 1996

Os grãos de soja contêm vários tipos de vitaminas. Quando verde o grão é rico em riboflavina, niacina e ácido ascórbico. Porém, quando está madura ela é rica nas vitaminas E e K. Apresenta-se como boa fonte de tiamina e ácido fólico, mas pobre em vitamina A, não contendo as vitaminas D e B12 (Tabela 3) (MORAIS, 1996).

Tabela 3. Teores de vitaminas na soja.

Vitaminas	Teor ($\mu\text{g g}^{-1}$ de soja)
Tiamina	11,0 – 17,5
Riboflavina	3,4 – 3,6
Niacina	21,4 – 23,0
Piridoxina	7,1 – 12,0
Biotina	0,8
Ácido pantotênico	13,0 – 21,5
Ácido fólico	1,9
Colina	3400
Caroteno	0,18 – 2,43
Vitamina E	1,4
Vitamina K	1,9

Fonte: MORAIS, 1996

O grão da soja contém também muitos minerais, com destaque para potássio, magnésio, fósforo, ferro e cobre, sendo considerada uma fonte moderada de cálcio e rica em sódio. O teor de cálcio presente nos grãos se apresenta pouco disponível para a nutrição humana, diferentemente para os produtos industrializados os quais são enriquecidos com este mineral (MORAIS, 1996). A Tabela 4 descreve a composição em minerais presentes na soja.

Tabela 4. Composição em minerais da soja.

Minerais	Teor (mg/100g)
Cálcio	220 – 280
Fósforo	590 – 660
Ferro	8 – 18
Potássio	340 – 380
Sódio	1670 – 2090
Magnésio	220 – 240
Enxofre	410
Iodo (ppm)	0,01
Cobre (ppm)	12

Fonte: MORAIS, 1996

Além destas espécies, são encontrados também nos grãos de soja substâncias em menor concentração como os fitatos, saponinas, antivitaminas, etc. Estes compostos, assim como alguns polissacarídeos, seja no aspecto nutricional e/ou toxicológico, são indesejáveis quando em elevadas concentrações, havendo a necessidade de desnaturalização pelo calor ou eliminação por extração (CHEFTEL et al., 1989).

1.4 AS ISOFLAVONAS DE SOJA

Estudos apontam que o consumo de soja e derivados promovem benefícios à saúde, colocando a soja em posição de destaque no que se refere ao estudo dos alimentos denominados nutracêuticos (MORAES et al., 2006). Dentre os componentes da soja, aqueles que mais têm despertado interesse da comunidade

científica são as isoflavonas. As boas condições de saúde constatadas em países orientais têm sido associadas à presença de isoflavonas nestes alimentos (FERRARI et al., 2001).

As isoflavonas são uma subclasse dos flavonoides, os quais possuem importantes atividades biológicas como antioxidantes. Além disso, no caso dos isoflavonoides, que apresentam estrutura semelhante ao estrógeno humano e sintético, mimetizam esta atividade. Além disso, apresentam atividade antifúngica e anticancerígena (TRISOJA, 2009). Estas substâncias têm distribuição extremamente limitada na natureza, principalmente na família Leguminosae. Somente na soja as isoflavonas estão presentes em quantidades nutricionalmente relevantes (MESSINA et al., 2000). Nos grãos de soja as isoflavonas são encontradas glicosiladas ou livres (FERRARI et al., 2001). As isoflavonas mais comuns são genisteína, daidzeína e gliciteína (Figura 3) que ocorrem sob a forma de agliconas, glicosídeos, acetilglicosídeos e malonilglicosídeos (WANG et al., 1994). As formas agliconas são as mais ativas do ponto de vista biológico. (TRISOJA, 2009). A estrutura básica da aglicona consiste de um esqueleto 3-fenilcromona com grupos hidroxílicos nas posições 4'- e 7-. Dependendo dos substituintes nos carbonos 5- e 6-, podem existir na soja principalmente três tipos de agliconas, nominados como daidzeína, genisteína e gliciteína. Na soja, as isoflavonas ocorrem como 7-O-glicosídeos com os nomes usuais de daidzina, genistina e glicitina. Adicionalmente, todos estes glicosídeos podem também ocorrer como ésteres na posição 6''-O- do glicosídeo ligados a grupos acetilas ou malonilas originando outros seis compostos conhecidos comumente como acetildaidzina, acetilgenistina, acetilglicitina, malonildaidzina, malonilgenistina e malonilglicitina (Tabela 5) (PENALVO et al., 2004). As duas principais isoflavonas são a genisteína e daidzeína ou em suas respectivas formas com glicosídeos, a genistina e daidzina. Estes compostos não apresentam características nutricionais, no entanto são bioativos, apresentando parte de sua estrutura química semelhante a dos estrógenos humanos, tal como o 17- β -estradiol, principal hormônio feminino, possuindo a capacidade de se encaixar nos receptores de estrógeno. Deste modo, estas substâncias apresentam, portanto, atividade estrogênica, sendo comumente referenciados como fitoestrógenos (QUEIROZ et al., 2006), o que caracteriza o interesse científico neste tipo de estudo considerando a

possibilidade de constatação de benefícios à saúde e reposição hormonal (EMBRAPA, 2009).

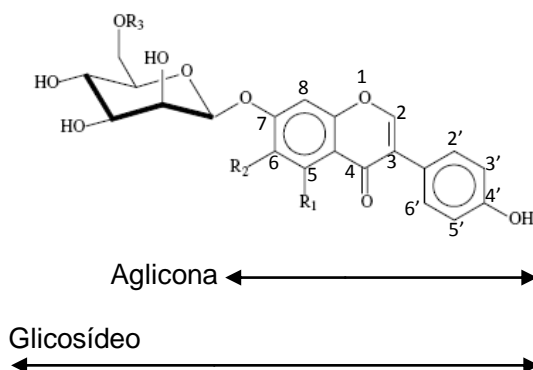


Figura 3. Estrutura geral de isoflavonas.

Fonte: WANG et al., 1994

Tabela 5. Classificação e estruturas de isoflavonas de soja.

Nome	Abreviatura	R1	R2	R3
Genisteína	Ge	OH	H	-
Gliciteína	Gli	H	OCH ₃	-
Daidzeína	DA	H	H	-
Daidzina	Din	H	H	H
Genistina	Gin	OH	H	H
Glicitina	Glin	H	OCH ₃	H
6''-O- Acetildaidzina	Adin	H	H	COCH ₃
6''-O- Acetilgenitsina	Agin	OH	H	COCH ₃
6''-O- Acetilglicitina	Aglin	H	OCH ₃	COCH ₃
6''-O- Malonildaidzina	Mdin	H	H	COCH ₂ COOH
6''-O- Malonilgenistina	Mgin	OH	H	COCH ₂ COOH
6''-O- Malonilglicitina	Mglin	H	OCH ₃	COCH ₂ COOH

Fonte: PENALVO et al., 2004

Quando consumidas, as isoflavonas glicosídicas são hidrolisadas no intestino delgado por enzimas denominadas beta-glicosidases intestinais, disponibilizando as agliconas biologicamente ativas, as quais são absorvidas ou fermentadas pela microflora intestinal, dando origem a seus metabólitos, as agliconas daidzeína, genisteína e gliciteína (Figura 4), que são as formas biologicamente ativas e atuarão beneficemente no organismo humano (TRISOJA, 2009 e QUEIROZ et al., 2006). Estudos apontam que a saliva humana é capaz de converter glicosídeos em agliconas (PENALVO, 2004) o que explica o fato de que as agliconas podem ser absorvidas em certa extensão no estômago, antes da absorção no intestino delgado. Efetivamente, somente agliconas são absorvidas, e por isso a diferenciação entre as possíveis formas de isoflavonas em produtos de soja parece ser um tanto quanto irrelevante, tendo em vista que os efeitos fisiológicos são devidos às agliconas.

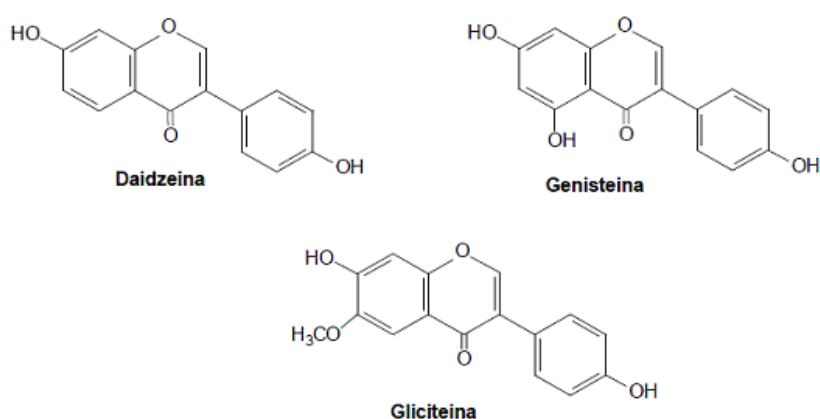


Figura 4. Estrutura química das principais isoflavonas da soja.

Fonte: QUEIROZ, 2006

As isoflavonas absorvidas são então transportadas para o fígado, sendo removidas da circulação sanguínea, retornando ao intestino pela via biliar, podendo ser excretada pelas fezes. No entanto, uma porcentagem consegue desviar da rota e entrar na circulação periférica, alcançando os tecidos, sendo eliminadas pelos rins, de maneira similar aos estrógenos endógenos. A biodisponibilidade das isoflavonas

da soja é, portanto, influenciada por um intestino saudável, com a microflora capaz de converter estas isoflavonas às suas formas ativas (QUEIROZ et al., 2006). As isoflavonas da soja podem agir de três formas diferentes: (i) como estrógenos e antiestrógenos, (ii) como inibidores de enzimas ligadas ao desenvolvimento do câncer e (iii) como antioxidantes. Quando associadas aos receptores de estrógeno, exercem ação estrogênica ou antiestrogênica, dependendo do nível de hormônios sexuais. Embora estudos mostrem que os efeitos estrogênicos das isoflavonas sejam muito pequenos (1/1.000 a 1/100.000 menos que a atividade do estradiol), elas podem ao mesmo tempo exercer um efeito agonístico sobre os estrogênios endógenos. Na presença dos estrogênios elas funcionam como antiestrógenos, competindo pelos sítios de ligação nos receptores de estrógenos presentes na célula, evitando que este hormônio exerça seus efeitos indesejáveis, a exemplo do aumento do risco de câncer de mama nas mulheres (TRISOJA, 2009). Na menopausa, é constatada a ausência de estrogênio e essas substâncias encontradas na soja apresentam efeito estrogênico e substituem o hormônio que se apresenta em baixas concentrações, aliviando os sintomas indesejáveis da menopausa e reduzindo os riscos de doenças cardiovasculares e de osteoporose adquiridos pela ausência do estrogênio humano (FERRARI e DEMIATE, 2001).

Atualmente, a genisteína tem sido muito estudada, não somente por causa do seu potencial efeito anti-estrogênico, mas também por que inibe várias enzimas envolvidas em processos de carcinogênese, a exemplo da tiroxina proteína quinase responsável pela indução tumoral promovida pela fosforilação dos oncogenes que controlam o crescimento e a regulação celular; aumentando a concentração do fator b de crescimento tumoral (TGF b), que atua na inibição do crescimento de células cancerosas (KONDO et al., 2002). A concentração da genisteína na maioria dos derivados de soja varia de 1-2 mg/g. As populações orientais, que apresentam baixa incidência de câncer de mama e próstata, consomem cerca de 28 g de genisteína por dia, enquanto que nos E.U.A. o consumo é somente de 1-3 mg/dia (QUEIROZ et al., 2006).

O efeito antioxidante das isoflavonas está associado à atuação dos fitoestrógenos genisteína e daidzeína, que inibem a produção de espécies reativas

do oxigênio, as quais estão envolvidas na formação de radicais livres. Estudos mostram que como antioxidantes, têm a capacidade de neutralizar ou tornar mais lenta a taxa de oxidação do LDL – colesterol. A genisteína inibe também a agregação plaquetária e a migração e proliferação de células da musculatura lisa (ABMBN, 2010).

A concentração de isoflavonas na soja e seus derivados pode variar muito, pois depende da variedade do grão, solo, clima, local onde foi cultivada e principalmente o tipo de processamento utilizado no preparo do alimento. O departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América bem como vários outros grupos de pesquisa têm publicado valores para o teor de isoflavonas em uma variedade de produtos de soja. Uma porção de um alimento de soja tradicionalmente consumido, como um copo de leite de soja ou 100 a 120 g de tofu, contém cerca de 30 mg de isoflavonas. Proteína isolada de soja (<90% de proteína) e farinha desengordurada de soja (cerca de 50% de proteína) contém cerca de 0,5 a 2 mg e 2 a 3 mg de isoflavonas por gramas de proteína, respectivamente. As Isoflavonas são termicamente estáveis. A ação de assar ou fritar alguns destes alimentos não altera o conteúdo de isoflavonas total (MESSINA e MESSINA, 2000).

1.5 OS METAIS NO ORGANISMO – CONTAMINANTES E NUTRIENTES

Os metais podem ser subdivididos em três grupos principais, de acordo com sua abundância no organismo: (i) macrossubstâncias (Ca, K, Mg e Na), (ii) microssubstâncias (Cu, Fe, Zn) e (iii) elementos traços (Co, Cr, Mn, Mo, Ni) (DEMICHELI e MAIA, 2005). No organismo humano, os íons metálicos são essenciais para diversas funções vitais, de modo que sua ausência pode ocasionar doenças, a exemplo de: retardamento do crescimento de crianças, por falta de zinco; anemia, por deficiência de ferro; e má formação óssea em crianças, por falta de cálcio. Alguns elementos, no entanto, quando presentes no organismo humano, podem ser tóxicos, como: o chumbo, o cádmio, que pode causar graves irritações pulmonares e até a morte e o

mercúrio cujos principais sintomas de intoxicação consistem na irritabilidade e crises nervosas (CHEDL, 2009).

A maioria dos elementos químicos presentes na tabela periódica pode ser encontrada no organismo humano. Normalmente ocorrem combinados à diversas substâncias, desempenhando diferentes funções, estando em contínuo estado de rotatividade, sendo formadas e consumidas a velocidades que variam de frações de segundos até anos. Um homem adulto, de 70 kg, apresenta em seu organismo cerca de 7,0 kg de hidrogênio, 12,6 kg de carbono, 2,1 kg de nitrogênio, 45,5 kg de oxigênio, 700 g de fósforo, 175 g de enxofre, 105 g de sódio, 140 g de potássio, 1,0 kg de cálcio, 35 g de magnésio, 2,3 g de zinco e 4,2 g de ferro. Considerando os metais e suas funções no corpo humano, pode-se destacar o cálcio, presente nas estruturas ósseas e no esmalte dos dentes, na forma de hidroxiapatita, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$, o sódio e o potássio que contribuem para o balanço osmótico em membranas celulares, e o ferro que está presente na estrutura da hemoglobina, responsável pela absorção e transporte de oxigênio no sangue. Vale ressaltar a relevância de alguns metais como o cromo, o manganês, o cobalto, o níquel, o cobre e o molibdênio, envolvidos em processos metabólicos que regulam a produção de energia e o bom funcionamento do corpo humano (CHEDL, 2009).

A Tabela 6 mostra a distribuição de alguns elementos, bem como as principais biofunções e consequências relacionadas à sua deficiência (LIPPARD e BERG, 1994 e TOMA, 1984).

Efetivamente, a ausência ou excesso de metais ou qualquer outro elemento químico pode promover danos ao organismo humano, de modo que um desequilíbrio na concentração de algum destes pode até mesmo causar a morte. Uma alimentação adequada se mostra uma alternativa eficaz para a manutenção do equilíbrio e bom funcionamento do organismo humano sem escassez ou acúmulo de elementos essenciais.

Como alimentos que apresentam uma quantidade adequada de nutrientes, podem-se destacar os alimentos à base de soja. A soja é considerada por muitos

cientistas um alimento completo, que além de conter proteínas, vitaminas do complexo B, isoflavonas e vitamina E, ainda apresenta mineirais como cobre, ferro, fósforo, potássio, magnésio e manganês (MORAIS, 1996).

Tabela 6. Distribuição logarítmica da concentração de alguns metais na crosta terrestre e no homem, associada a algumas funções e deficiências.

Elemento	Crosta	Homem	Observações	Deficiência
Na	4,5	3,4	Principal cátion extracelular	Alterações na pressão arterial
K	4,4	2,6	Principal cátion intracelular	Alterações na pressão arterial
Mg	4,3	2,6	Funções enzimáticas e clorofila	Paralisia de determinados músculos
Ca	4,6	4,1	Constituinte dos ossos, importante em funções enzimáticas	Crescimento retardado do esqueleto
Al	4,9	-2,0	Não essencial	-
Pb	1,1	-4,5	Não essencial, tóxico	-
Fe	4,7	1,7	Transporte do oxigênio, hemoglobina	Anemia e desordem do sistema imunológico
Zn	1,8	1,4	Função estrutural e enzimática	Danos na pele, impede o crescimento e maturação sexual retardada.
Cu	1,7	0,6	Transporte do oxigênio e função enzimática	Enfraquecimento das artérias, desordem no fígado e anemia secundária
Mn	3,0	0,01	Função enzimática	Infertilidade e diminuição do esqueleto
Mo	0,2	-0,7	Função enzimática e fixação de nitrogênio	Retardamento de crescimento celular e propensão a cáries
Cd	-0,7	-4,0	Não essencial, tóxico	-
Co	1,4	-1,4	Vitamina B ₁₂	Anemia perniciosa
Ni	1,9	-1,4	Função ainda não estabelecida	Crescimento depressivo e dermatite
Cr	2,0	-1,5	Provavelmente envolvido no metabolismo da glucose	Sintomas de diabete
Hg	-1,1	-4,5	Não essencial, tóxico	-

Fonte: LIPPARD e BERG, 1994 e TOMA, 1984

1.6 OBJETIVOS

1.6.1 **Objetivo Geral**

Investigar a composição da soja em grãos e derivados em termos das concentrações de metais, metaloides, halogênios e isoflavonas.

1.6.2 **Objetivos Específicos**

- a) Desenvolver procedimento para a decomposição ácida assistida por radiação micro-ondas de amostras de soja e derivados empregando ácidos diluídos.
- b) Avaliar procedimento de combustão iniciada por micro-ondas para decomposição de amostras de soja e derivados.
- c) Desenvolver método para determinação de isoflavonas em amostras de soja e derivados.
- d) Contribuir de forma preliminar para a tabela de composição de alimentos no que se refere à concentração de metais, metaloides, halogênios e isoflavonas em soja e derivados.

Capítulo II

Revisão Bibliográfica

CAPÍTULO II

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Considerando o destaque das isoflavonas dentre os constituintes orgânicos existentes na soja, assim como a importância da determinação de minerais em soja e seus derivados, são apresentados a seguir alguns trabalhos que ilustram métodos para a determinação destes analitos em matrizes de soja.

2.1 MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE ISOFLAVONAS DE SOJA

Na literatura, muitos trabalhos são descritos sobre a determinação de isoflavonas em soja em grãos e derivados, considerando a relevância associada a estes constituintes orgânicos como nutrientes.

Atualmente, a concentração total e individual de isoflavonas em produtos comerciais à base de proteína de soja tem sido determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Farinha de soja desengordurada contém em média a seguinte concentração de algumas isoflavonas (mg/100g): daidzina, 61,7; gliciteína 7- β - glicosídeo, 12,9; genistina, 119,8; daidzeína, 32,8; genisteína, 26,7. Num determinado estudo (ELDRIDGE, 1982) foram investigadas as concentrações destas isoflavonas em amostras de farinha de soja, concentrados de proteína de soja (produtos que contém um teor mínimo de 70% em proteína) e isolados de proteína de soja (produtos que contém um teor mínimo em 90% de proteína). Para o procedimento de extração utilizado, foram testados diferentes solventes: etanol (50%, 80% e absoluto), metanol (50%, 80% e absoluto), acetato de etila e acetonitrila, considerando as amostras de farinha de soja desengordurada,. A

extração sob refluxo fazendo uso de etanol (80%) promoveu resultados mais reprodutivos e maior percentual de extração. Para a análise cromatográfica dos produtos à base de soja, utilizou-se n-butirolfenona como padrão interno. O procedimento cromatográfico consistiu na utilização de um gradiente de 25 a 50% de metanol durante 20 min., seguido por eluição isocrática durante 30 min. Os fatores de resposta para os glicosídeos individuais e agliconas foram determinados com base no padrão interno. Estes fatores de resposta foram utilizados para determinar a composição em isoflavonas e glicosídeos de isoflavonas em produtos derivados de soja. Os glicosídeos daidzina e genistina corresponderam a mais de 50% do total de isoflavonas encontrado nas amostras de farinha de soja. O teor de isoflavonas encontrado nas amostras de concentrados de proteína de soja foi muito similar ao encontrado para as amostras de farinha de soja. Para as amostras de isolados de proteína de soja, o processo de isolamento promove perdas em glicosídeos de isoflavonas, e somente a genistina foi mensurada para estas amostras.

Um método para determinação de daidzeína e genisteína em amostras de leite de soja, alimentos infantis à base de soja e suplementos nutricionais empregando HPLC com detecção coulométrica foi descrito (MULLNER et al., 2000). Foram adicionadas às amostras de alimentos (0,5 – 1g) e leite de soja (4 mL), alíquotas de 1 mL de bisphenol A (padrão interno) e 5 mL de HCl (10 mol L^{-1}), completando-se o volume com etanol para 50 mL. A mistura foi submetida à sonicação por 10 min e a refluxo por 2 h. Em seguida a mistura foi resfriada à temperatura ambiente e o ajuste para pH 3 com NaOH foi efetuado. Após a purificação do extrato num cartucho C18 os compostos foram separados em coluna de fase reversa de C18 (50mM de acetato de sódio em pH 4,8 com ácido acético glacial/metanol em 450/550, (v v⁻¹)). Para a quantificação de daidzeína e genisteína foi utilizado o método de adição de analito. Os limites de quantificação para daidzeína e genisteína corresponderam a $0,9 \text{ mg kg}^{-1}$ e $1,0 \text{ mg kg}^{-1}$, respectivamente. As concentrações de daidzeína e genisteína foram determinadas em diversas amostras de derivados de soja comercialmente disponíveis, variando entre $6,7$ e 212 mg kg^{-1} e $24,8$ e 371 mg kg^{-1} respectivamente.

Quatro diferentes fases estacionárias e uma variedade de solventes em proporções variáveis foram analisados (HUTABARAT et al., 2000) para a determinação de daidzeína, genisteína, formononetina, biochanina A e coumestrol¹ em grãos de soja e derivados. Para a determinação da eficiência de extração foram efetuados diversos experimentos. Aproximadamente 1,0 g de cada amostra foi submetido à extração com 10 mL de HCl (2,0 mol L⁻¹) e 40 mL de etanol (96%) sob refluxo, com aquecimento em banho maria à 100 °C em HCl (2,0 mol L⁻¹) por 1, 2, 4 ou 6 horas. O volume dos extratos foi completado para 50 mL com etanol (96%). Os outros experimentos foram conduzidos realizando a extração para 1,0 g de amostra em 10 mL de HCl (2 mol L⁻¹) e 40 mL de etanol (96%) sem refluxo, e extração para 1,0 g de amostra em somente 50 mL de etanol (96%), seguido de refluxo com aquecimento em banho maria à 100 °C por 1, 2, 4 e 6 h. Após a extração se ajustou o pH para 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 com NaOH. Quatro fases estacionárias (C8, C18, fenil e ciano) e sete solventes (acetonitrila, solução aquosa de ácido acético 1% ou 10%, isopropanol, metanol, etanol, tampão acetato a pH 2,6, e água) foram avaliadas. Utilizando uma coluna cromatográfica de fenil (Phenyl Nova-Pak (150 x 3.9 mm I.D., 4 µm) empregando a mistura acetonitrila-água (33:67, (v v⁻¹)) como eluente, foi possível a obtenção da separação desejada, num tempo de 24 min. O método proposto apresentou uma repetibilidade aceitável com um desvio padrão relativo (RSD) para a quantificação com valores inferiores a 6%. As recuperações médias de daidzeína, genisteína, formononetina, biochanina A e coumestrol em amostras de grãos de soja variaram entre 89 e 104%. A identificação dos analitos individualmente foi confirmada por cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massas (LC-MS), após a confirmação da identidade dos picos obtidos por cromatografia líquida com detecção por absorção no ultravioleta (LC-UV). Nas amostras investigadas foram encontrados teores de daidzeína e genisteína e o método proposto permite a determinação destes analitos em concentrações inferiores a 47 nmol L⁻¹.

¹ O coumestrol é um composto orgânico pertencente a uma das principais classes dos fitoestrogênios, os coumestanos.

Um trabalho cujo objetivo consistiu no desenvolvimento de metodologias adequadas de extração e análise de isoflavonas em derivados protéicos de soja e alimentos industrializados foi efetuado (GENOVESE, 2001). Compararam-se dois métodos de determinação de isoflavonas, um baseado na análise dos diversos derivados de glicosídeos, naturalmente presentes, e o outro, na análise de agliconas, após hidrólise ácida. Foram avaliadas também as condições ideais para extração em fase sólida. Os resultados mostraram que o melhor solvente para a eluição de isoflavonas e seus derivados de glicosídeos, após passagem da amostra por coluna de extração em fase sólida, é a mistura Metanol:NH₃ (99,5:0,5), e a temperatura de 40°C para eliminação do solvente em evaporador rotativo, condição adequada para a concentração dos extratos. Não foram constatadas diferenças significativas nos resultados obtidos utilizando-se filtros de 0,45 ou 0,22 mm. Os testes de recuperação definiram que a recuperação de daidzina variou entre 98,5 e 103,3% e a de genistina, entre 95,4 e 102,7%, demonstrando, portanto a adequabilidade do método. A hidrólise ácida para análise de agliconas mostrou-se inadequada por causar diminuição significativa dos teores de isoflavonas. A poliamida mostrou-se uma fase sólida eficiente para ligação de isoflavonas, sendo que para a eluição de malonilglicosídeos é necessário aumentar o pH da mistura que utiliza metanol como solvente.

A contribuição de alimentos à base de soja no que se refere à prevenção de câncer pode estar associada às isoflavonas genisteína e daidzeína. Em trabalho prévio (HUI et al., 2001) foi determinada a variação da concentração de isoflavonas em amostras de tofu disponíveis comercialmente, devidamente separadas por marcas e lotes. A concentração dos analitos foi determinada empregando cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por absorção no ultravioleta (HPLC-UV) após emprego de hidrólise ácida em 23 marcas diferentes e lotes diferentes de quatro destas marcas. Para a extração, cerca de 1-2 g das amostras foram pesados e então 40 mL de etanol a 96% e 10 mL de HCl foram adicionados e a mistura foi submetida à refluxo por 4 horas. Entre as amostras de diferentes marcas de tofu, as concentrações de genisteína e daidzeína/gliciteína variaram de 0,07 a 0,34 mg g⁻¹ e 0,10 a 0,24 mg g⁻¹ respectivamente para massa úmida. A concentração de isoflavonas entre lotes de uma mesma marca variou entre 7,0 e

28% considerando a massa seca. Considerando a ingestão diária de 30 g de produtos à base de soja, pode-se inferir que a quantidade ingerida de isoflavonas pode variar entre 5,4 e 17,1 mg por dia.

Um método automatizado em linha para a determinação das isoflavonas, daidzeína e genisteína, foi desenvolvido (MITANI et al., 2003) utilizando micro-extração em fase sólida "no-tubo" acoplada a cromatografia líquida de alta eficiência (SPME(*in tube*)-HPLC). As amostras foram pesadas (5 – 500 mg) para posterior adição de 1 mL da mistura HCl-Metanol (1:3) contendo BHT a 0,05% como antioxidante. A mistura então foi submetida à hidrólise por 2 horas à 100 °C e então foram adicionados β -naftol (padrão interno) e tampão acetato (pH = 4), completando-se o volume para 1 mL com água ultrapura. Daidzeína, genisteína e seus glicosídeos testados neste estudo foram devidamente separados no tempo de 8 min por HPLC usando uma coluna XDB-Cs utilizando-se detector por arranjo de diodos. Os glicosídeos daidzina e genistina foram analisados como agliconas, após hidrólise, porque os mesmos não foram concentrados por SPME "*in tube*". Os compostos extraídos foram facilmente desorvidos do capilar pelo fluxo da fase móvel, não sendo observado o entupimento do capilar. Utilizando a técnica SPME "*in tube*" acoplada a HPLC, foram obtidas curvas de calibração lineares para estes compostos dentro do intervalo de 5-200 ng mL⁻¹, com um coeficiente de correlação acima de 0,9999 (N=18), e os limites de detecção (S/N=3) variaram entre 0,4 - 0,5 ng mL⁻¹. Este método foi aplicado com sucesso na análise de alimentos de soja, sem a constatação de picos de interferência. As recuperações obtidas para agliconas e glicosídeos presentes em amostras de alimentos estiveram acima de 97%.

As concentrações das isoflavonas daidzeína, genisteína e gliciteína foram determinadas em uma variedade de produtos de soja comercialmente disponíveis empregando cromatografia líquida de alta eficiência com detecção coulométrica (PREINERSTORFER et al., 2004) utilizando estriol como padrão interno. O procedimento de extração consistiu na pesagem de 0,4 – 2,5 g de amostra sólida ou 2 mL das amostras líquidas, seguido da adição de 2 mL de HCl (10 mol L⁻¹) e 18 mL de etanol para sonicação durante 10 min. Após refluxo por 2 h (84°C) as amostras foram resfriadas à temperatura ambiente e foi ajustado o pH para 3,3 com NaOH,

para que o volume fosse completado para 25 mL com etanol. Durante a extração, os glicosídeos presentes naturalmente nas amostras foram convertidos as suas respectivas agliconas por hidrólise ácida. Os analitos foram separados em uma coluna C18 de fase reversa, mediante eluição com metanol / acetonitrila / acetato de sódio a 50 mM em pH 4,8 (40/5/55, v/v/v), e posterior detecção coulométrica. As isoflavonas foram determinadas numa vasta faixa de concentrações (0,8-1135 mg kg⁻¹ para daidzeína, 1,9-1442,5 mg kg⁻¹ de genisteína e 0,5-154,6 mg kg⁻¹ para gliciteína). A recuperação das isoflavonas nas diferentes matrizes foi determinada pelo método da adição de analito e variou entre 40,9 – 94,4%. Os limites de detecção (S/N = 3) dependem da matriz do produto de soja e foram encontrados para daidzeína entre 0,3-1,6 mg kg⁻¹, para genisteína entre 0,3-1,7 mg kg⁻¹ e para gliciteína entre 0,5-2,3 mg kg⁻¹.

Eletroforese capilar com detecção eletroquímica (CE-ED) é uma técnica que permite determinação simultânea de daidzeína e genisteína em produtos de soja (PENG et al., 2004). Num trabalho específico, amostras foram pesadas (2,0 g) e submetidas à extração com 10 mL de etanol a 50% por duas horas em banho ultrassônico. Os parâmetros: potencial do eletrodo de trabalho, pH do tampão, a voltagem de separação e tempo de injeção na CE-ED foram investigados e, sob condições ótimas, os analitos podem ser separados fazendo uso de um tampão borato (pH 11,0) na concentração de 100 mmol L⁻¹ no tempo de 20 min. A resposta foi linear ao longo de três ordens de grandeza para os analitos estudados. Este método foi utilizado de forma satisfatória para a determinação de daidzeína e genisteína em grãos de soja, leite de soja em pó e formulações à base de soja, de modo que a concentração de daidzeína e genisteína variou entre 5,0 – 24,6 (µg g⁻¹) e 28,8 – 507 (µg g⁻¹) respectivamente nas amostras.

Um novo procedimento de extração acelerada com solvente (EAS) permitiu a determinação mais exata (< 2%) e precisa (< 5-8% RSD) de isoflavonas em diferentes tipos de alimentos à base de soja, (farinha de soja, carne de soja granulada, carne de soja em lâminas, pedaços de carne de soja, e Protmix EKO-B1) por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por espectrometria de massa e por absorção no ultravioleta (HPLC-UV-EM) (KLEJDUS et al., 2004). O

procedimento de extração acelerada por solvente consistiu na pesagem de 0,2 g de amostra e posterior adição de flavona (padrão interno). A mistura foi transferida para uma cela de extração sob condições controladas. Os extratos foram submetidos à centrifugação e em seguida o sobrenadante foi evaporado até a secura. O resíduo foi então retomado em 1,0 mL de solução aquosa de metanol 50% (v v⁻¹). Os limites de detecção (LOD) para daidzina/genistina foram 1,2/1,6 fmol para a razão sinal-ruído S/N = 3 e 1 – 3 fmol para daidzeína, genisteína, formononetina, biochanina A e ononina, respectivamente. As concentrações finais de daidzina em alimentos de soja oscilaram entre 30 e 60 µg g⁻¹. Concentrações significativamente maiores de genistina (entre 60 e 130 µg g⁻¹) foram encontradas nos alimentos à base de soja.

Diversos métodos têm sido publicados para a quantificação de isoflavonas de soja em amostras de alimentos. Em trabalhos anteriores (PEÑALVO et al., 2004) foi empregada hidrólise enzimática seguida de hidrólise ácida para a determinação de isoflavonas como equivalentes de agliconas totais. Alternativamente, outros métodos já publicados têm sido geralmente desenvolvidos para a determinação de todas as 12 formas de isoflavonas. Com o objetivo de simplificação da análise, um novo método de extração para a determinação da quantidade total de isoflavonas foi então desenvolvido e validado em três amostras controle. Acetil e malonil glicosídeos foram hidrolisados a 7-O-glicosídeos com etanol a 80% contendo HCl a 1 mol L⁻¹ para a remoção dos grupos acetil e malonil. Agliconas e 7-O-glicosídeos foram separados por HPLC usando detecção coulométrica por arranjo de diodos. Os valores para recuperação variaram entre 75,5% e 119% dentre os analitos investigados.

Extratos de soja contêm misturas de isoflavonas. No controle de qualidade da soja, a quantidade de isoflavonas, em agliconas e glicosídeos, é usualmente determinada por HPLC-UV empregando coluna com fase reversa. Utilizando colunas de C18, longos tempos de análise são requeridos para a separação desta mistura complexa de isoflavonas. Objetivando aumentar a velocidade de análise, um método de separação foi otimizado (APERS et al., 2004) utilizando duas colunas monolíticas de C18 com fase reversa conjugadas. Para a determinação de agliconas pesou-se 200,0 mg de extrato de soja e adicionou-se 5 mL de dimetil sulfóxido e 20 mL de

metanol. Após sonicação por 30 min. completou-se o volume para 50 mL com metanol a 50% (v v⁻¹). Para a determinação de glicosídeos, cerca de 1,0 mL da solução teste obtida para a determinação de agliconas foi diluída para 10,0 mL com metanol 50% (v v⁻¹). Uma redução efetiva no tempo de análise foi obtida empregando uma vazão de 3-4 mL min⁻¹ sem perdas na eficiência de separação. Este método de análise para a determinação de isoflavonas em extratos de soja num tempo inferior a 25 minutos foi adequadamente validado de acordo com as diretrizes ICH (International Conference on Harmonization, Text on Validation of Analytical Procedures – Harmonised Tripartite Guideline) e mediante realização de testes de recuperação, sendo obtidos valores de 101% (RSD = 2,6%) para daidzina e 101% (RSD = 2,4%) para genistina.

Num trabalho previamente efetuado (CHEN et al., 2005), um método preciso foi desenvolvido para determinar a concentração de daidzeína, genisteína, gliciteína, daidzina, glicitina, 6"-O-acetildaidzina, 6"-O-acetilglicitina e 6"-O-acetilgenistina em suplementos nutricionais com elevado e baixo teor de isoflavonas por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas empregando-se ionização química à pressão atmosférica (LC-APCI-MS). Neste trabalho foram avaliados os solventes acetonitrila, etanol e metanol para verificação da eficiência de extração de isoflavonas nas amostras de alimentos de soja, considerando a possibilidade de adição de ácido clorídrico. A acetonitrila foi o solvente selecionado para o estudo. Três suplementos nutricionais à base de soja foram analisados, sendo constatado que acetil isoflavonas foram encontradas em quantidade razoável e malonil isoflavonas não foram detectadas, o que indica que o conteúdo e a forma na qual as isoflavonas se apresentam podem variar em decorrência de diferentes processos de fermentação.

A determinação de isoflavonas (genistina, genisteína, daidzeína, daidzina, glicitina, gliciteína, ononina, formononetina, sissotrina e biochanina A) por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por absorção no ultravioleta visível e por arranjo de diodos (HPLC-UV-DAD) foi descrita (KLEDJUS et al., 2005). Uma coluna cromatográfica de fase reversa *Atlantis - C18* foi utilizada, numa vazão de 0,35 ml min⁻¹ de fase móvel (0,1% (v v⁻¹)) de ácido acético a um pH de 3,75 e

metanol. Um perfil de gradiente linear foi usado para separação à temperatura de 36°C na coluna. Limites de detecção por amostra injetada (5µL) foram obtidos na faixa de 166,2 a 17,0 femtomol (9,4 – 1,1 ng mL⁻¹) para biochanina A e genistina, respectivamente. Valores de recuperação entre 96 e 106% foram obtidos para as diferentes concentrações de isoflavonas (RSDs 2 – 8%). O procedimento foi empregado para a determinação de isoflavonas em biscoitos de soja (28 – 962 µg g⁻¹ em peso seco), tendo se mostrado rápido e sem perda na eficiência de separação (acima de 10 isoflavonoides podem ser determinados) e na sensibilidade (de dezenas a centenas de fmol).

Alimentos preparados à base de soja contêm primariamente as isoflavonas genisteína, daidzeína, e gliciteína. Um método para determinação de isoflavonas em suplementos alimentares de soja foi proposto (DELMONTE et al., 2006), fazendo uso de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (HPLC-DAD) como técnica para separação e detecção. As amostras foram submetidas a dois diferentes procedimentos de extração. O primeiro foi efetuado de acordo com o método oficial da AOAC 2001.10 e o segundo procedimento consistiu na extração em temperatura ambiente com uma mistura de MeCN/água a 50:50 (v/v), para a análise das amostras, antes e após a hidrólise das isoflavonas por digestão ácida ou básica. Como padrões internos foram utilizados 2-Metóxi-flavona e 6-metóxi-flavona, sendo injetados em conjunto com todas as amostras. As isoflavonas determinadas foram daidzeína, gliciteína, genisteína, puerarina, calicosina, pratenseína, pseudobaptigenina, formononetina, biochanina A e prunetina.

Um método para a determinação de isoflavonas em sucos de fruta à base de soja foi desenvolvido (ROSTAGNO et al., 2007). Durante o desenvolvimento do método, o qual não se faz necessária a liofilização das amostras, vários parâmetros foram estudados: solvente adequado (metanol ou etanol), razão amostra/solvente (5:1 à 0,2:1), temperatura (10 – 60°C) e tempo de extração (5 – 30 min). O parâmetro mais importante objetivando a extração das isoflavonas das bebidas foi a razão amostra/solvente, e o método otimizado consiste na utilização de etanol como solvente extrator, emprego de uma razão amostra/solvente equivalente a 0,2:1 num

banho ultrasônico à 45°C durante 20 minutos. As amostras foram também liofilizadas e submetidas a um procedimento de extração por maceração (ROSTAGNO et al., 2003), comparando com os resultados obtidos para o método proposto, não sendo constatadas diferenças significativas para as concentrações individuais e totais de isoflavonas. A maioria das amostras representativas adquiridas em mercado espanhol, com grande variação na concentração de isoflavonas, foram analisadas utilizando o método proposto. As concentrações de isoflavonas, determinadas por HPLC com detecção por UV visível, variaram de 6,7 até 58,2 mg L⁻¹.

Onze suplementos à base de soja e/ou trevo vermelho foram analisados (SCHWARTZ et al., 2008) após a hidrólise ácida ou extração direta com 70% de etanol aquoso para determinação do teor total de isoflavonas como agliconas e agliconas livres mais glicosídeos empregando cromatografia líquida de alta eficiência no modo de eluição por gradiente acoplado à eletrodos para detecção coulométrica. A razão entre as isoflavonas individuais e conjugadas se mostrou bastante variável nos produtos investigados. Enquanto os suplementos à base de trevo vermelho apresentaram teores das isoflavonas (principalmente formononetina e biochanina A) exclusivamente na forma livre, as formulações à base de soja apresentaram proporções variáveis de isoflavonas conjugadas. O conteúdo de isoflavonas na forma de agliconas nos produtos destinados ao consumo direto variou de 12,0 a 45,6 mg por cápsula ou comprimido, enquanto que o teor de agliconas livres e glicosídeos encontrado esteve entre 12,2 e 51,6 mg por cápsula ou comprimido. O teor de isoflavonas como agliconas determinado experimentalmente está de acordo com ou superior àquele sugerido pelo fabricante em 6 dos 11 produtos investigados.

Um método de extração por dispersão de matriz em fase sólida (DMFS) com separação por HPLC foi utilizado para determinação do teor de daidzeína e genisteína em grãos de soja e seus resíduos, (BARFI et al., 2009). Para a extração destes compostos, o tipo de sorvente (óxido de alumínio e sílica gel), a proporção entre sorvente e amostra assim como o tipo (metanol, acetonitrila, éter dietílico, acetato de etila, diclorometano e n-hexano) e volume (8, 12, 16 e 20 mL) de solvente para eluição e seu pH (2,0 – 6,0) foram estudados. Os melhores valores para

recuperações foram obtidos com uma proporção de 2:1 entre sílica gel / amostra e 12 mL de metanol em pH 3. A composição da fase móvel otimizada para a análise destes compostos por HPLC foi $\varphi(\text{H}_2\text{O}) = 0,45$, $\varphi(\text{MeOH}) = 0,54$, $\varphi(\text{THF}) = 0,01$ ajustado para pH = 4 com o uso de tampão fosfato, onde φ corresponde à fração em volume. Os limites de detecção e faixa linear dinâmica para daidzeína e genisteína obtidos foram 0,016, 0,052, 0,016-132, e 0,052-146 $\mu\text{g g}^{-1}$ respectivamente. As recuperações para daidzeína e genisteína nas amostras de soja e resíduos variaram entre 84 – 95%. As concentrações de daidzeína em soja e seus resíduos foram de $39,1 \pm 7,4$ e $22,2 \pm 8,4 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente; e as respectivas concentrações de genisteína foram $103,3 \pm 6,5$ e $19,7 \pm 4,5 \mu\text{g g}^{-1}$.

As concentrações de daidzeína e genisteína foram determinadas nos cotilédones de amostras de soja em grãos cultivadas sob diferentes meios e em diferentes solos na Itália (BARION et al., 2010). Entre as variedades analisadas, foi constatado um coeficiente geral de variação para a concentração total de isoflavonas correspondeu a 22%. Foi realizada análise de agrupamento hierárquico, sendo revelados três grupos de variedades sendo observados elevados teores de genisteína nos cotilédones e também foi observada uma semelhança nos perfis de distribuição de daidzeína e genisteína nas amostras.

Um método para a determinação de isoflavonas em amostras de sementes de soja por HPLC-UV foi desenvolvido (SUN et al., 2011). Os valores de comprimentos de onda de máxima absorção encontrados para as isoflavonas daidzeína, gliciteína e genisteína corresponderam a 250, 257 e 260 nm, respectivamente. A fase móvel utilizada consistiu em acetonitrila (13 – 30%) contendo ácido acético a 0,1% em eluição por gradiente numa coluna YMC-Pack ® (250 x 4,6 mm²) a 35°C. As concentrações de daidzeína e genisteína variaram na faixa de 0,0 a 76,2 $\mu\text{g g}^{-1}$ e 4,3 a 265,4 $\mu\text{g g}^{-1}$ respectivamente.

Em trabalho previamente descrito (SHEN et al., 2012) foram determinadas as concentrações de 19 isoflavonas em amostras de soja em grãos cultivadas em diferentes locais sob diferentes ciclos de cultivo. Foi desenvolvido um método fazendo uso de extração empregando hidrólise ácida com HCl com posterior

separação e detecção dos analitos por HPLC-MS. As concentrações de daidzeína e genisteína variaram na faixa de 270,1 - 490,5 $\mu\text{g g}^{-1}$ e 392,5 - 537,8 $\mu\text{g g}^{-1}$ respectivamente.

Na Tabela 7 estão sumarizados os procedimentos acima descritos, contemplando as isoflavonas: Daidzina (Din), Genistina (Gin), Gliciteína (Gli), Daidzeína (Da), Genisteína (Ge), Acetildaidzina (ADin), Acetilgenistina (AGin), Acetilglicitina (AGlin), Glicitina (Glin), Malonildaidzina (MDin), Malonilgenistina (MGin), Malonilglicitina (MGLin), Biochanina A (BioA), Sissotrina (Sis), Formononetina (For), Ononina (Ono), Puerarina (Pue), Calicosina (Cal), Pratenseína (Pra), Pseudobaptigenina (PseuB) e Prunetina (Pru) relacionando as técnicas de separação e detecção empregadas, o tipo de amostra e as condições de trabalho.

Tabela 7. Procedimentos para determinação de isoflavonas em grãos de soja e derivados.*Continua.*

Matriz	Analito(s)	Técnica	Características Principais	Ref.
Farinha de soja desengordurada.	Glicosídeos de isoflavonas	GC	Extração utilizando éter e metanol em extrator Soxhlet.	NAIM et al., 1974
Produtos à base de proteína de soja.	Din, Gli, Gin, Da e Ge	HPLC	Extração sob refluxo fazendo uso de etanol (80%).	ELDRIDGE, 1982
Leite de soja, alimentos infantis à base de soja e suplementos nutricionais.	Da e Ge	HPLC	Extração ácida com etanol sob refluxo	MULLNER et al., 2000
Grãos de soja e derivados.	Da, Ge, For e BioA	LC-MS, LC-UV	Diferentes procedimentos de extração avaliando como solventes: acetonitrila, solução aquosa de ácido acético 1% ou 10%, isopropanol, metanol, etanol, tampão acetato a pH 2,6, e água	HUTABARATA et al., 2000
Derivados protéicos de soja.	Din, Gin e Malonilglicosídeos	HPLC-DAD	Extração em fase sólida utilizando metanol como solvente	GENOVESE et al., 2001
Tofu.	Ge, Da/Gli	HPLC	A concentração dos analitos foi determinada após hidrólise ácida em 23 diferentes marcas e lotes diferentes de quatro destas marcas	HUI et al., 2001
Alimentos de soja.	Da e Ge	HPLC-DAD	Emprego de microextração em fase sólida “no tubo”	MITANI et al., 2003
Produtos de soja.	Da, Ge e Gli	HPLC	Extração ácida com etanol sob refluxo	PREINERSTORFER et al., 2004

Continua.

Matriz	Analito(s)	Técnica	Características Principais	Ref.
Produtos derivados de soja	Da e Ge	CE-ED	Extração com etanol em banho ultrasônico	PENG, 2004
Farinha de soja, Carne de soja, e Protmix EKO-B1	Da, Ge, For, BioA e Ono	HPLC-UV-MS	Extração acelerada com solvente utilizando metanol	KLEJDUS et al., 2004
Alimentos de soja	Agliconas totais, Acetil e malonil glicosídeos	HPLC-DAD	Hidrólise enzimática seguida de hidrólise ácida	PENALVO et al., 2004
Extratos de Soja	Din e Gin	HPLC-DAD	Utilização de duas colunas monolíticas de C18 com fase reversa conjugadas, com efetiva redução no tempo de análise sem perdas na eficiência de separação	APERS et al., 2004
Suplementos nutricionais de soja	Acetil glicosídeos, Da, Ge, Din, Gli, Glin	LC-APCI-MS	Avaliação dos solventes acetonitrila, etanol e metanol para verificação da eficiência de extração de isoflavonas nas amostras de alimentos de soja, considerando a possibilidade de adição de ácido clorídrico	CHENA et al., 2005
Biscoitos de soja	Gin, Ge, Da, Din, Gli, Glin, Ono, For, Sis e BioA	HPLC-UV-DAD	Coluna cromatográfica de fase reversa Atlantis dC18 com fase móvel (0,1% (v/v)) de ácido acético a um pH de 3,75 e metanol	KLEJDUS et al., 2005

Conclusão.

Matriz	Analito(s)	Técnica	Características Principais	Ref.
Suplementos alimentares de soja	Da, Gli, Ge, Pue, Cal, Pra, PseuB, For, Bio A e Pru	HPLC-DAD	Extração em temperatura ambiente com uma mistura de MeCN/água a 50:50 (v/v)	DELMONTE et al., 2006
Bebidas à base de soja adicionadas de suco de frutas	MDin, MGlin, MGin, ADin, AGin, Din, Glin, Gin, Da, Gli e Ge.	HPLC-UV	Extração assistida por ultrassom, a liofilização das amostras não é necessária	ROSTAGNO et al., 2007
Suplementos à base de soja	Agliconas, agliconas livres e glicosídeos	HPLC	Hidrólise ácida ou extração direta com 70% de etanol aquoso	SCHWARTZ et al., 2008
Grãos de soja	Da e Ge	HPLC	Um método extração por dispersão de matriz em fase sólida	BARFI et al., 2009

2.2 MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO MULTIELEMENTAR EM AMOSTRAS DE ALIMENTOS

No campo da avaliação nutricional da soja e de seus subprodutos, deve-se ressaltar a relevância de investigações acerca da composição inorgânica, visto que a maior parte das informações já existentes refere-se ao conteúdo de constituintes orgânicos. Os elementos cálcio, cobalto, cobre, cromo, ferro, fósforo, magnésio, manganês, molibdênio, níquel e zinco estão incluídos no grupo dos nutrientes essenciais a diversos processos bioquímicos, sejam como constituintes estruturais de macromoléculas, como cofatores enzimáticos ou como participantes de complexos mecanismos de defesa imunológica (COZZOLINO, 2005). Portanto, a quantificação dos referidos elementos na constituição dos itens alimentares à base de soja, compreende uma importante fonte de informações para pesquisadores e órgãos de combate à fome e desnutrição. Por outro lado, o consumo de produtos contaminados com íons metálicos tóxicos constitui uma séria ameaça à saúde pública no tocante ao efeito de bioacumulação trófica e ao consequente aparecimento de enfermidades diversas incluindo perdas de fertilidade, falência múltipla dos órgãos, disfunções psíquicas e formação de tumores (STANLEY, 1994).

No que se refere à quantificação de nutrientes ou possíveis contaminantes inorgânicos em amostras de alimentos, as técnicas analíticas que relacionam espectroscopia atômica são sem dúvida as mais apropriadas (OKADA et al., 2007). E para a determinação das espécies químicas de interesse se faz necessária comumente a oxidação da matéria orgânica presente nas amostras, numa etapa de tratamento prévio da amostra, utilizando essencialmente procedimentos por via úmida, fazendo uso de blocos digestores e fornos de micro-ondas (SKOOG et al., 2006). Esta etapa é essencial para a aplicação das técnicas de espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS), espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS) e a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES), as quais são as mais empregadas na quantificação de macro e micro nutrientes em alimentos (COELHO, 2001).

Um método para a determinação de Al em alimentos comercializados na China, dentre estes grãos de soja e molho de soja, por GF AAS foi desenvolvido (WANG et al., 1991). As amostras foram digeridas mediante utilização de 10 – 15 mL de uma mistura de HNO₃ e HClO₄ (5:1) com aquecimento em placa aquecedora, considerando 0,5 g de amostras de grãos e molho de soja. A faixa linear de calibração foi definida entre 0,24 e 250 ng de Al. O limite de detecção encontrado para o Al correspondeu, portanto, a 0,24 ng o que define boa sensibilidade ao método. A exatidão do método foi avaliada pela utilização de material de referência certificado NBS SRM 1575 *pine needles* e NBS SRM 1570 *spinach*, e testes de recuperação foram efetuados, de modo que a recuperação média obtida assumiu valores entre 86 e 111%, para 16 diferentes amostras de alimentos, sendo 95% o valor médio para grão de soja e 97% para o molho de soja. A concentração de Al encontrada em grãos e molho de soja correspondeu a 24,1 µg g⁻¹ e 2,17 µg mL⁻¹ respectivamente, de modo que o consumo diário de 500g de grãos por parte de um indivíduo na China, por exemplo, corresponde à ingestão diária de cerca de 10 µg de alumínio.

O conteúdo de selênio disponível em 162 amostras, considerando nove marcas diferentes, de alimentos à base de soja (leite de soja e formulações infantis à base de soja), no Reino Unido, por espectrometria de absorção atômica com geração de hidreto (HG AAS) foi determinado (FOSTER et al., 1996). Massas de amostra de 0,25 g e volumes de 1,0 mL foram adicionados a tubos de decomposição de vidro com posterior acréscimo de 10 mL de ácido nítrico em temperatura ambiente para decomposição *overnight*, e em seguida foi realizada a lavagem com água deionizada e acetona e então submetida a aquecimento brando para redução do teor de água nas amostras líquidas. A exatidão do método foi avaliada utilizando material de referência certificado NIST SRM 1549, existindo concordância entre o valor obtido quando comparado ao valor certificado, e através de realização de testes de recuperação, sendo constatada uma média de recuperação correspondente a 100,1% para 12 determinações o que sugere a inexistência de perdas em Se durante a etapa de decomposição. O limite de detecção da técnica (HG AAS) correspondeu a 0,37 ng mL⁻¹ (Coeficiente de Variação de 5,22%, n=7). Para o leite de soja, foram encontradas concentrações de Se entre 0,0045 e 0,044 µg g⁻¹ (Média

de 0,024 $\mu\text{g g}^{-1}$) e, entre 0,014 e 0,098 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Média de 0,048 $\mu\text{g g}^{-1}$), para fórmulas infantis à base de soja.

Sete diferentes formulações infantis e dezoito diferentes tipos de alimentos infantis representativos no que se refere à dieta de crianças na Itália foram analisadas (PLESSI et al., 1997) para adquirir informações sobre a composição destes alimentos com referência particular para Al e Zn. A mineralização das amostras foi efetuada em forno de microondas com cavidade, utilizando uma massa de 0,3 g de amostra e digestão com 3,0 mL de HNO_3 a 65%. O volume foi completado para 25 mL com água ultrapura. A concentração de Al foi determinada por GF AAS enquanto que a concentração de Zn foi determinada por FAAS. A exatidão do método foi estimada através da análise de material certificado de referência NIST SRM 1549 *nonfat milk powder* e NIST SEM 1548 *total diet*, havendo concordância entre os valores encontrados e valores certificados. As formulações infantis à base de soja apresentaram maiores valores de concentração para Al (7,0 a 7,8 $\mu\text{g g}^{-1}$) em comparação às formulações à base de leite (3,0 – 3,5 $\mu\text{g g}^{-1}$), provavelmente em decorrência do teor de alumínio naturalmente presente em grãos de soja. Os valores encontrados para zinco sofreram maior variação para as amostras à base de soja (13 – 73 $\mu\text{g g}^{-1}$), sendo que na amostra de formulação infantil à base de soja, a concentração de Zn (13 $\mu\text{g g}^{-1}$) esteve abaixo da recomendada pelas normas da resolução ECC (European Economic Community) 91/321. A maior concentração de Al foi encontrada na amostra de farinha de soja (26 $\mu\text{g/g}$), enquanto que a maior concentração de Zn foi encontrada na amostra de carne congelada (180 $\mu\text{g g}^{-1}$). Nos alimentos infantis as concentrações de Al e Zn variaram bastante de uma amostra para outra, dependendo obviamente de cada composição.

Produtos de soja comercialmente disponíveis como leite de soja, farinha de soja, proteína texturizada, grãos de soja inteiros e produtos à base de soja (fórmulas infantis e iogurtes) foram avaliados (GARCIA et al., 1998) e o conteúdo proteico, assim como a quantidade de alguns íons metálicos a exemplo de cálcio, cobre, ferro e zinco, foram determinados. Para os procedimentos de decomposição, somente as amostras de grãos de soja e proteína texturizada foram submetidas à moagem prévia. Para a determinação de fósforo foi utilizada a Espectrometria de Absorção

Molecular em 430 nm de acordo com a norma UNE 64.017 (*Métodos Oficiales de Análisis, 1993, Tomo I*). Para a determinação dos íons metálicos uma massa de aproximadamente 1,0 g de amostra foi submetida à decomposição utilizando ácido nítrico e peróxido de hidrogênio 30% (v v⁻¹), para posterior determinação dos analitos por FAAS e espectrometria de emissão atômica com chama (FAES). Com relação à determinação de fósforo, a maior concentração deste elemento foi encontrada na amostra de leite de soja em pó, provavelmente em decorrência da adição de fosfato de cálcio na formulação do produto. Para os íons metálicos, a concentração de cobre encontrada foi mínima para todas as amostras ($\leq 2,00$ mg/100 g), ao passo que a concentração de potássio constatada foi a maior dentre os íons metálicos avaliados (≥ 234 mg/100 g). A concentração de cálcio na amostra de leite em pó, se apresentou muito maior em comparação aos valores encontrados para as outras amostras, também em consequência da adição de fosfato de cálcio ao produto. Os teores de fósforo, cobre, ferro e zinco estão relacionados com a quantidade de proteína de soja nos produtos, conforme constatado por análise de regressão linear para estes parâmetros. Os valores encontrados para os íons metálicos sugerem que a ingestão dos subprodutos de soja avaliados satisfaz as necessidades diárias para os elementos: Ca, Cu, Fe, K e Zn, com destaque para as concentrações de cálcio nas amostras, o que define uma possível alternativa ao leite de vaca, com a vantagem de um baixo teor de gordura e ainda possuírem maiores concentrações de fósforo, potássio, cobre e ferro em comparação ao leite de vaca.

O conteúdo de Se em amostras de leite materno e formulações infantis à base de soja foi avaliado em trabalho prévio (TORRES et al., 1999). As amostras foram digeridas em forno de micro-ondas com cavidade utilizando 2 mL ou 0,3 g de amostra, utilizando 1,5 mL de HNO₃ e 0,25 mL de H₂O₂. Os digeridos foram transferidos para tubos de decomposição e submetidos ao aquecimento até a temperatura de 140°C, em bloco digestor por três horas até a redução de volume para 1 mL. Após resfriamento, e objetivando a redução de Se (VI) a Se (IV), 2 mL de ácido clorídrico foram adicionados para que, então, o volume fosse ajustado para 10 mL com água deionizada. A concentração de Se foi determinada por HG AAS. A concentração encontrada para Se, em formulações infantis à base de soja, correspondeu a um valor médio de $4,5 \pm 2,3$ ng mL⁻¹ em contraste com a

concentração encontrada em amostras de leite materno que de acordo com o período da coleta, variou entre 5,2 e 11,1 ng mL⁻¹. A quantidade de selênio permitida na dieta de crianças até 6 meses de idade corresponde a 10 µg/dia (*National Research Council, 1989*). Considerando o primeiro mês de lactação, a quantidade de selênio ingerida estimada, foi ligeiramente superior apenas à quantidade considerada para formulações à base de leite, de modo que estes valores para os consumos ainda são inferiores aos fornecidos através da dieta baseada exclusivamente no leite materno.

A análise de cinco amostras de alimentos para bebês em fase de lactação, dentre estes, alimentos à base soja, para a determinação de ácidos graxos, aminoácidos e os elementos Ca, Cu, Fe, K, Mg, P e Zn foi realizada (FERNANDEZ et al., 2002). O procedimento de decomposição das amostras para a determinação dos referidos elementos envolveu inicialmente o aquecimento prévio a 110°C *overnight* para a remoção da umidade, em seguida foi efetuada a pesagem de aproximadamente 0,1 g das amostras em béqueres e posterior adição de 20 mL de ácido nítrico concentrado e 1 mL de ácido perclórico concentrado. Em seguida as amostras foram submetidas a aquecimento em placa, até a temperatura de 120°C, durante uma hora. Na sequência a temperatura foi aumentada para 150°C, e as amostras foram submetidas a refluxo *overnight*. As amostras foram então aquecidas até próxima à *secura* (aproximadamente 1 mL) sob a mesma temperatura. Em seguida, foram retiradas da placa aquecedora e tratadas com 2,5 mL de uma mistura HNO₃/HClO₄ (4:1). Após o resfriamento as soluções foram transferidas para frascos de polipropileno, completando o volume para 50 mL com água deionizada. Para a determinação das concentrações dos elementos foi utilizada a técnica de ICP OES. Os resultados para as concentrações dos elementos foram estabelecidos com destaque para os valores obtidos para Ca, K, Mg e P, que se mostraram muito acima das concentrações dos outros analitos. No entanto, todas as amostras analisadas contêm concentrações inadequadas de cálcio e zinco de acordo com as quantidades diárias recomendadas. Somente a amostra de alimento à base de soja contém concentração suficiente de fósforo dentre as consideradas.

Um estudo sobre a avaliação de 26 elementos em amostras de formulações infantis à base de leite e de soja, nos Estados Unidos, Reino Unido e Nigéria, foi efetuado (IKEMA et al., 2002). Elementos essenciais como Ca, Co, Cu, Cr, Fe, Mg, Mn, Na e Zn e não essenciais como Ag, Al, As, Ba, Be, Cd, Hg, Ni, Pb, Sb, Sn, Sr, Ti, Tl, U e V foram determinados por ICP OES após decomposição das amostras em forno de micro-ondas com cavidade fazendo uso de aproximadamente 0,5 a 1,0 g das amostras de formulações infantis em pó, e 5 mL das amostras líquidas. Para tanto, foram utilizados 7,0 mL de ácido nítrico e 3 mL de água deionizada, utilizando temperatura máxima de 170°C. A exatidão do método foi avaliada através da análise de material certificado de referência NIST SRM 8435, havendo concordância entre os valores encontrados e valores certificados. Empregando o teste ANOVA se constatou que existe diferença significativa entre os resultados encontrados para as diferentes marcas analisadas, o que se deve provavelmente aos diferentes processamentos empregados. A concentração média da maioria dos elementos determinada nas formulações infantis à base de soja nos Estados Unidos se mostrou geralmente superior em relação às concentrações obtidas para as formulações infantis a base de leite dos Estados Unidos, Reino Unido e Nigéria. Especificamente para o alumínio, sua concentração nas formulações à base de soja se apresentou maior em comparação às encontradas nas formulações à base de leite do Reino Unido, Nigéria e EUA.

A composição química e a qualidade de proteínas em grãos de soja e subprodutos comercializados em cinco países produtores (Argentina, Brasil, China, Índia e Estados Unidos) foram devidamente avaliadas (KARR-LILIENTHAL et al., 2004). O conteúdo mineral foi avaliado de acordo com o método recomendado pela AOAC, com detecção por ICP OES. Os elementos cálcio, fósforo, magnésio e sódio apresentaram valores de concentração similares dentre os países para as amostras avaliadas, demonstrando concordância também com valores recomendados. Entretanto, para alumínio, cobre, ferro e zinco os valores obtidos não apresentaram uniformidade. Provavelmente, o motivo de tal discrepância está relacionado ao conteúdo mineral presente no solo ou a questões de biodisponibilidade dos analitos.

Em estudo previamente efetuado (HSEU, 2004), foram avaliados quatro procedimentos de decomposição para quantificação de Cd, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb e Zn em diversos tipos de amostra com destaque para grãos de soja com posterior determinação por espectrometria de absorção atômica (GF AAS ou FAAS). Cada amostra foi submetida à secagem a 65°C por 48 horas. Dentre os quatro procedimentos avaliados, três deles foram executados em bloco digestor utilizando HNO₃; HNO₃/HClO₄ e H₂SO₄/H₂O₂ como estratégia para cada um, respectivamente. O volume de HNO₃ utilizado nos procedimentos correspondeu a 10 mL, enquanto que os volumes empregados de HClO₄ e H₂SO₄ corresponderam a 5,0 e 3,5 mL, respectivamente. O ácido sulfúrico foi empregado em mistura com peróxido de hidrogênio, utilizando um volume de 4,5 mL para este último. As temperaturas atingidas no bloco digestor variaram entre 150 e 250°C. O procedimento que emprega somente o ácido nítrico para a decomposição das amostras foi o recomendado em termos da recuperação obtida, essencialmente para Cd, Mn e Ni, custo e tempo de execução. O procedimento que emprega a mistura HNO₃/HClO₄ não é recomendado por ser potencialmente perigoso e não apresentar bons valores de recuperação para os metais avaliados.

O conteúdo de Mn em bebidas à base de soja, para posterior comparação com o teor deste elemento encontrado em formulações infantis à base de soja foi determinado (COCKELL et al., 2004). As amostras foram pesadas (10 mL para amostras líquidas e 1,0 g para amostras em pó) e então submetidas à incineração à 450°C utilizando HNO₃ como agente oxidante. A concentração de Mn foi determinada por espectrometria de absorção atômica com chama. Materiais certificados da NIST foram utilizados para avaliar a exatidão do método, havendo concordância entre os resultados certificados e aqueles obtidos. A concentração de Mn em bebidas à base de soja encontrada correspondeu a 16,5 ± 8,6 µg g⁻¹ para 36 amostras, valor este muito superior ao valor encontrado para a concentração de Mn em formulações infantis à base de arroz que correspondeu a 9,9 ± 1,7 µg g⁻¹. As bebidas à base de soja investigadas não devem ser administradas para crianças, uma vez que são nutricionalmente inadequadas apresentando teores de Mn em um nível que pode proporcionar efeitos neurológicos adversos se utilizadas como única fonte nutricional.

A concentração de Cd(II), Pb(II), Cu(II), e Zn(II) em amostras de óleo vegetal de girassol, arroz, soja dentre outras, foi determinada utilizando Análise de Redissolução Potenciométrica Derivativa (dPSA, Derivative Potentiometric Stripping Analysis) (DUGO et al., 2004). Em trabalhos prévios ficou estabelecido que a extração com HCl seguido pela análise dPSA é eficiente para a determinação de metais traço em óleos: os valores para precisão foram inferiores a 2,1% (expressos como RSD) e limites de detecção na faixa de 0,4 à 0,9 $\mu\text{g kg}^{-1}$ foram obtidos para Cd(II), Cu(II), Pb(II), e Zn(II) nos óleos vegetais estudados. O método consiste na pesagem de 3,0 g de óleo num béquer e adição de 2,0 mL de H_2O_2 e 10 mL de HCl, seguido de agitação durante 30 minutos sob a temperatura de 90°C para a extração. A mistura foi resfriada e então submetida à centrifugação a 4800 rpm durante 5 minutos para a separação das fases. Este método foi validado empregando material de referência certificado com valores para a exatidão na faixa de 93,5% a 97,0%. Os resultados obtidos para a análise das amostras de óleos vegetais evidenciaram que a concentração média de cádmio foi inferior a 4,90 $\mu\text{g kg}^{-1}$, concentração média de chumbo foi encontrada na faixa de 8,60 a 55,61 $\mu\text{g kg}^{-1}$, a concentração média de cobre na faixa de 53,80 a 674,45 $\mu\text{g kg}^{-1}$, e zinco entre 51,45 e 555,61 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Para o óleo de soja as concentrações dos elementos variaram entre: Cu ($440,1 \pm 3,9$ e $854,0 \pm 8,1 \mu\text{g kg}^{-1}$), Pb ($10,7 \pm 0,2$ e $43,3 \pm 0,9 \mu\text{g kg}^{-1}$), Cd ($2,53 \pm 0,04$ e $5,03 \pm 0,07 \mu\text{g kg}^{-1}$) e Zn ($29,7 \pm 0,3$ e $41,5 \pm 0,4 \mu\text{g kg}^{-1}$). O método proposto se mostrou rápido, sensível e adequado para a determinação de níveis traço de Cd, Pb, Cu e Zn em óleos vegetais, não requerendo etapa de pré-concentração ou destruição completa da matéria orgânica.

A quantificação de elementos traço em produtos alimentícios é de extremo interesse devido a potencial toxicidade associada a diversos elementos, e também por causa da presença de algumas espécies metálicas que podem afetar a qualidade (sabor e estabilidade) destes produtos. Um método foi desenvolvido para a determinação de Cd, Co, Cr, Cu, Ni e Mn por ICP OES em amostras de azeite de oliva, óleo de soja, margarina e manteiga (SOUZA et al., 2005). As amostras foram pesadas (0,1 – 1,0 g) em frascos de capacidade de 10 mL onde foram adicionados em seguida 7,0 mL de 1-propanol. Em seguida foi adicionada quantidade de água

necessária, sob agitação contínua, até a massa final de 10 g. Este procedimento de preparo da amostra é considerado simples, e quando combinado com uma eficiente estratégia de introdução da amostra, facilitou o procedimento analítico, permitindo o uso de curvas de calibração preparadas com padrões inorgânicos. Para correção de efeito de matriz e flutuação de sinal foi utilizada padronização interna. Uma boa sensibilidade com valores de limites de detecção na faixa de ng g^{-1} foram obtidos para os seis elementos, o que é adequado para a aplicação pretendida. O método foi validado mediante realização de testes de recuperação com bons valores obtidos (91,3% à 105,5%).

Num estudo prévio (SILVA et al., 2007) foi avaliada a absorção e a capacidade de translocação de metais pesados do solo para grãos de soja e arroz. O experimento foi realizado em estufa de plantas, em Latossolo Vermelho distroférico, proveniente de Município de Paulínia, SP. As amostras de solo foram coletadas em sete pontos e organizadas em função da distância de uma fábrica emissora de poluente. O delineamento utilizado foi aleatório, com quatro repetições. As amostras de solo foram secas ao ar e passadas por peneira com malha de 2,0 mm e submetidas à decomposição em forno de micro-ondas, com uso de água régia, de modo que o teor disponível foi determinado com o extrator DTPA (ácido dietilenotriamino pentacético) em pH 7,3. Raízes, parte aérea e grãos foram submetidos à digestão por via úmida, em sistema aberto. As concentrações dos metais pesados nos extratos de solo e material vegetal foram determinadas por ICP OES. Os teores de Cd e Cu no grão estiveram em níveis adequados para ambas as culturas, enquanto os teores de Mn e Zn apresentaram-se em excesso, tendo acompanhado os níveis de contaminação do solo, com possibilidade de atingir níveis mais altos da cadeia trófica. As raízes limitaram a translocação de cádmio, cobre, ferro e chumbo para a parte aérea de ambas as culturas. Mesmo com a translocação limitada pelas raízes, o chumbo apresentou-se em altos teores nos grãos de soja, acima do limite máximo permitido ($0,5 \text{ mg kg}^{-1}$) da norma da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), e pode, também, como o manganês e o zinco, atingir a cadeia alimentar.

A fabricação de formulações infantis requer rigoroso controle de sua composição, particularmente no que se refere aos elementos que são adicionados rotineiramente na tentativa de simular a composição mineral do leite humano. Um total de 97 diferentes formulações infantis incluindo aquelas à base de soja, as quais disponíveis comercialmente na Espanha foram estudadas (SOLA-LARRAÑAGA et al., 2009). Foram determinadas as concentrações de minerais (Ca, P, Mg) e elementos traço (Zn, Fe, Cu, Mn) para comparação com aquelas listadas nos rótulos das embalagens. Um método simples, rápido, de suspensão direta para a determinação destes micronutrientes essenciais em formulações infantis por ICP OES e FAAS foi desenvolvido objetivando auxiliar em aspectos de controle de qualidade. As amostras foram pesadas (0,4 g para as formulações infantis, e entre 0,2 e 0,3 para o material de referência) e então transferidas para frascos de polietileno onde foram dissolvidas utilizando os solventes: água ultrapura, Triton X-100, TMAH ou NH_4OH adicionados em quantidades diferentes de acordo com o experimento, em alíquotas de 25 a 500 μL . As suspensões foram sonicadas durante 2 – 5 min e cada amostra foi preparada em triplicata. No intuito de se comparar os resultados obtidos e avaliar a exatidão do método de suspensão direta, as amostras foram submetidas à decomposição em forno de micro-ondas utilizando uma massa de 0,4 g e 7,0 mL ácido nítrico, atingindo a temperatura de 170°C. O material de referência NIST 1549 de leite em pó desnatado foi também analisado para a validação dos métodos. Os resultados obtidos mostraram concordância com aqueles obtidos para os valores certificados. O procedimento analítico foi aplicado adequadamente para análise de um grupo representativo de amostras de formulações infantis. As concentrações obtidas para os elementos estudados considerando os dois métodos empregados foram comparáveis, de modo que ambos os métodos se constituem uma alternativa viável para análises de rotina de fórmulas infantis para a determinação dos elementos essenciais adicionados a estas.

A concentração de elementos potencialmente tóxicos (Al, Cd e Pb) foi determinada em formulações infantis à base de leite e à base de soja no intuito de avaliar a quantidade ingerida de acordo com os limites máximos permitidos (KAZI et al., 2009). Os analitos foram determinados por GF AAS após digestão ácida

empregando forno de micro-ondas e aquecimento condutivo em placa aquecedora. Para o procedimento em forno de micro-ondas, foram pesados 0,2 g de cada amostra em frascos de politetrafluoretileno (PTFE) seguida da adição de uma mistura $\text{HNO}_3 - \text{H}_2\text{O}_2$ (2:1, (v v⁻¹)), mantendo em repouso por 10 min à temperatura ambiente para o posterior aquecimento por radiação micro-ondas em apenas um estágio atingindo a potência de 900W por 3 – 5 minutos, e o volume final foi completado até 10 mL com ácido nítrico na concentração de 0,1 mol L⁻¹. No procedimento em placa aquecedora foram pesados 0,2 g de cada amostra em tubos de pyrex seguido da adição de uma mistura $\text{HNO}_3 - \text{H}_2\text{O}_2$ (2:1, (v v⁻¹)) e posterior aquecimento até 60 – 70 °C. O conteúdo dos frascos foi então evaporado e os resíduos dissolvidos em 5,0 mL de HNO_3 a 0,2 mol L⁻¹, seguido da filtração utilizando papel de filtro e o volume completado para 10 mL. A validação do método foi efetuada pela análise de material de referência certificado BCR 189 e pela realização de testes de recuperação. Os limites de detecção obtidos para Al, Cd e Pb corresponderam a 1,2; 0,05 e 0,55 g L⁻¹. Foi possível constatar que as formulações infantis à base de soja apresentam níveis mais elevados dos analitos em comparação às formulações convencionais (à base de leite). As concentrações dos três elementos, Al, Cd e Pb determinadas, estiveram na faixa de (1740 – 2720), (8,3 – 14,5), e (98,6 – 119) µg kg⁻¹, respectivamente para as amostras de formulações infantis à base de soja. A estimativa de ingestão semanal destes elementos potencialmente tóxicos por crianças maiores de 1 ano nas formulações infantis avaliadas estiveram abaixo dos níveis toleráveis.

Em trabalho previamente realizado (NAOZUKA, 2003) foram comparados dois procedimentos de digestão ácida empregando radiação micro-ondas (sistemas aberto e fechado) acoplados à precipitação para a posterior determinação de Cl, Br e I em amostras de leite em pó por ICP OES. A exatidão do método foi avaliada empregando materiais certificados, de modo que a concordância entre os resultados obtidos e esperados foi superior a 95%. Os valores de limite de detecção para Cl, Br e I foram 30, 40 e 280 µg g⁻¹ para o sistema aberto, e 15, 20 e 40 µg g⁻¹ para sistema fechado, respectivamente. As concentrações de Br e I estiveram abaixo do limite de detecção para o método proposto, enquanto que a concentração de Cl variou entre 7,9 – 11,1 mg g⁻¹ para as amostras de leite avaliadas.

A concentração de flúor foi determinada em dez amostras de chá por HR-CS-F AAS empregando procedimentos envolvendo digestão ácida, solubilização alcalina e extração aquosa (MORÉS et al., 2011). O LOD encontrado foi de $0,16 \text{ mg L}^{-1}$ e a faixa linear de trabalho encontrada esteve na faixa de $0,5$ a 25 mg L^{-1} . Comparando os resultados de concentração obtidos para os diferentes procedimentos foi possível constatar que não houve diferença significativa para 95% de confiabilidade (teste t). Os resultados obtidos para flúor empregando extração aquosa estiveram na faixa de 21 a $56 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$.

Em um estudo previamente efetuado (HARTWIG et al., 2011) foram avaliados diferentes procedimentos de preparo de amostras de camarão, para a posterior determinação de bromo e iodo por ICP-MS. Os procedimentos avaliados foram: decomposição de cerca de 300 mg de amostra por MIC utilizando NH_4OH como solução absorvedora; e dissolução com $0,5$ ou $1,0 \text{ mL}$ de hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) com aquecimento em banho-maria para aproximadamente $1,0 \text{ g}$ de amostra. Para a avaliação da exatidão do método de decomposição por MIC foi empregado MRC sendo constatada concordância superior a 95% entre os valores obtidos e esperados para Br e I. A extração com TMAH foi satisfatória apenas para a posterior determinação de iodo. As concentrações de Br e Iodo obtidas por MIC corresponderam a 154 ± 13 e $9,3 \pm 0,8 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente.

Na Tabela 8 estão sumarizados os procedimentos acima descritos, contemplando os analitos estudados, relacionando as técnicas empregadas para a detecção, o tipo de amostra e as condições de trabalho.

Tabela 8. Procedimentos para determinação de minerais em soja em grãos e derivados.

Continua.

Matriz	Analito(s)	Técnica	Características Principais	Ref.
Grãos e molho de soja comercializados na China	Al	GF AAS	Digestão em placa aquecedora empregando HNO ₃ e HClO ₄ (5:1) para 0,5 g de amostra	WANG et al., 1991
162 amostras de formulações infantis à base de soja no Reino Unido	Se	HG AAS	Digestão empregando HNO ₃ à temperatura ambiente em <i>overnight</i>	FOSTER et al., 1996
Sete formulações e dezoito alimentos infantis	Al e Zn	GF AAS, FAAS	Digestão em MO c/ HNO ₃ (70%) de 0,3 g de amostra	PLESSI et al., 1997
Leite de soja, farinha de soja, proteína texturizada e fórmulas infantis à base de soja	Ca, Cu, Fe, P e Zn	FAAS, FAES e Espectrometria de absorção molecular	Digestão em MO c/ HNO ₃ e H ₂ O ₂ de 1 g de amostra	GARCIA et al., 1998
Leite materno e formulações infantis à base de soja	Se	HG AAS	Digestão em MO empregando HNO ₃ e H ₂ O ₂ e bloco digestor à 140 °C por 3 horas	TORRES et al., 1999
Formulações infantis à base de soja	Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, P e Zn	ICP OES	Decomposição em placa aquecedora empregando HNO ₃ e HClO ₄ concentrados de 0,1 g de amostra à 150 °C	FERNANDEZ et al., 2002
Formulações infantis à base de leite e de soja nos E.U.A, Reino Unido e Nigéria	26 elementos	ICP OES	Digestão em MO empregando HNO ₃ e H ₂ O de 0,5 a 1g ou 5 mL de amostra, a 170 °C	IKEMA et al., 2002
Grãos de soja e subprodutos em cinco países produtores	Al, Ca, Cu, Fe, Mg, Na, P e Zn	ICP OES	Método para decomposição recomendado pela AOAC	KARR-LILIENTHAL et al., 2004

Matriz	Analito(s)	Técnica	Características Principais	Ref.
Grãos de soja	Cd, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb e Zn	AAS	Avaliação de 4 procedimentos de decomposição empregando HNO ₃ , HClO ₄ , H ₂ SO ₄ e H ₂ O ₂	HSEU, 2004
Bebidas e formulações infantis à base de soja	Mn	FAAS	Incineração à 450°C utilizando HNO ₃ como oxidante de 10 mL ou 1 g de amostra	COCKELL et al., 2004
Óleos vegetais de arroz, girassol e soja	Cd, Cu, Pb e Zn	dPSA	Extração com HCl e H ₂ O ₂ a 90 °C de 3,0 g de óleo	DUGO et al., 2004
Óleos de soja, azeite de oliva, manteiga e margarina	Cd, Co, Cr, Cu, Ni e Mn	ICP OES	Amostras estabilizadas utilizando 1-propanol e água, uso de nebulizador Meinhard K3 e câmara ciclônica	SOUZA et al., 2005
Raízes, parte aérea e grãos de soja	Cd, Cu, Mn e Zn	ICP OES	Digestão em MO com o uso de água régia e digestão por via úmida em sistema aberto	SILVA et al., 2007
Formulações infantis à base de soja	Ca, Cu, Fe, K, Mg, P e Zn	ICP OES e FAAS	Suspensões avaliando os solventes: água ultrapura, Triton X-100, TMAH ou NH ₄ OH e digestão em placa empregando HNO ₃ e HClO ₄ ; com posterior sonicação por 2 – 5 min	SOLA-LARRAÑAGA et al., 2009
Formulações infantis à base de leite e de soja	Al, Cd e Pb	GF AAS	Digestão em MO e placa aquecedora empregando HNO ₃ e H ₂ O	KAZI et al., 2009

Capítulo III

*Avaliação de procedimentos de
digestão assistida por radiação
micro-ondas usando ácido
nítrico diluído para a
determinação multielementar
por ICP OES e ICP-MS*

CAPÍTULO III

3 AVALIAÇÃO DE PROCEDIMENTOS DE DIGESTÃO ASSISTIDA POR RADIAÇÃO MICRO-ONDAS USANDO ÁCIDO NÍTRICO DILUÍDO PARA A DETERMINAÇÃO MULTIELEMENTAR POR ICP OES E ICP-MS

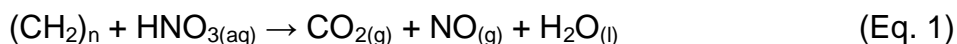
Para a determinação da composição multielementar em amostras de soja em grãos e seus derivados, são utilizados convencionalmente métodos envolvendo decomposição da matéria orgânica por via úmida. Ácidos inorgânicos fortes como o HCl, HNO₃, H₂SO₄, HClO₄ concentrados, misturados entre si, ou combinados com um oxidante auxiliar como o H₂O₂ são comumente utilizados nos procedimentos de decomposição por via úmida em frascos abertos (SILVA et al., 2007; WANG et al., 1991; KAZI et al., 2009). Nesta condição, a temperatura de decomposição está limitada à temperatura de ebulição do ácido utilizado.

O emprego de ácidos concentrados na decomposição de amostras de material biológico tem sido utilizado há séculos no que se refere à análise química. Atualmente a digestão assistida por radiação micro-ondas tem sido uma alternativa promissora considerando procedimentos baseados no uso de frascos fechados em sistemas de fornos micro-ondas com cavidade, que trabalham sob elevada pressão (KNAPP et al., 1988; FLORES et al., 2010).

A utilização de ácidos concentrados é conveniente na decomposição de matrizes orgânicas complexas, entretanto, seu uso é perigoso, requer diluição prévia dos digeridos para análise e gera grandes quantidades destes ácidos como resíduos. A execução de procedimentos de digestão sob pressão e temperaturas elevadas permite a utilização de ácidos diluídos sem perda na eficiência de digestão (BIZZI et al., 2010). Nos últimos anos a utilização de ácidos diluídos em procedimentos de decomposição por via úmida em sistemas fechados tem despertado o interesse da comunidade científica (BIZZI et al., 2010; CASTRO et al., 2009; BERMEJO-

BARRERA et al. 2000; WIETESKA et al., 1996). Como vantagens associadas ao uso de ácidos diluídos podem ser destacadas: maior segurança operacional, redução dos valores dos brancos analíticos, diminuição na geração de resíduos e custos e facilidade de manipulação das soluções ácidas diluídas.

O produto principal de reação, quando empregado ácido nítrico concentrado é o NO₂ (ARRUDA, 2006). Por outro lado, em soluções de ácido nítrico diluído há uma produção preferencial de NO. Neste caso, durante a oxidação da matéria orgânica pelo ácido nítrico, NO é produzido e reage com O₂ na fase gasosa gerando NO₂. Depois, o NO₂ formado pode ser reabsorvido na fase líquida levando à formação de NO₃⁻ e HNO₂. Este ciclo de reação prossegue até o completo consumo do O₂ na fase gasosa (KRUG, 2008). Esses processos químicos são representados pelas seguintes equações:



A ocorrência dos processos descritos nas equações 1-4 permite a regeneração do ácido nítrico e a manutenção do ciclo de reação, enquanto existir O₂ na fase gasosa que promove o aumento da regeneração de NO₂ que subsequentemente reagirá com água para a regeneração deste ácido e geração de HNO₂ (BIZZI et al., 2010).

Deste modo o emprego de procedimentos de preparo de amostra utilizando ácidos diluídos é uma alternativa viável em detrimento do uso de ácidos concentrados que podem causar interferências de matriz em determinações por

espectrometria atômica e produção de grandes quantidades de vapores nitrosos, altamente carcinogênicos (BERMEJO-BARRERA et al., 2000).

O objetivo deste estudo consiste em avaliar a viabilidade da aplicação de metodologias de digestão eficientes para amostras de grãos de soja e derivados utilizando sistemas de preparo de amostras que têm a radiação micro-ondas como fonte de energia. Do mesmo modo, obter após a decomposição das amostras uma solução aquosa com a menor concentração ácida possível para a posterior determinação multielementar por espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) e espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS).

3.1. PARTE EXPERIMENTAL

3.1.1. Reagentes e Soluções

Todas as soluções foram preparadas com reagentes de grau analítico e água ultrapura, com resistividade específica de $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$, de um sistema de purificação Millipore (Milli-Q®, Millipore, Bedford, MA, EUA). Todas as vidrarias e frascos foram previamente descontaminados em banho ácido contendo HNO_3 10% (v v^{-1}), por no mínimo 24 h e lavadas com água desionizada antes do uso.

Soluções de referência foram preparadas a partir de soluções estoque contendo 1000 mg L^{-1} de As, Ba, Cd, Cu, Co, Cr, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb, Se, Sr, V, e Zn (Merck, Alemanha), no mesmo meio dos digeridos ácidos obtidos. Para a determinação dos teores de carbono residual após os procedimentos de decomposição, foram preparadas soluções de referência de ácido cítrico (Merck, Alemanha) utilizando solução estoque 5,0% (m v^{-1}) em carbono.

Na execução dos experimentos, os seguintes reagentes foram utilizados: ácido nítrico 65% (m/m) (Merck, Alemanha), peróxido de hidrogênio 30% (v v⁻¹) (Merck, Alemanha).

3.1.2. Amostras

Os experimentos foram executados utilizando amostras de Extrato de soja, Farinha de Soja, Proteína texturizada de soja e Soja em grãos disponíveis em estabelecimentos comerciais nas cidades de Salvador e Barreiras na Bahia e Uberlândia em Minas Gerais.

O material de referência certificado utilizados nos estudos de validação foi o NIST 1568a (*Rice Flour*).

3.1.3. Instrumentação

3.1.3.1. *Procedimentos de decomposição das amostras empregando sistema pressurizado e radiação micro-ondas*

Os procedimentos de digestão em sistemas pressurizados foram conduzidos em forno de micro-ondas com cavidade, modelo Ethos EZ (Milestone, Sorisole, 67 Itália). Esse sistema possui um rotor com capacidade para 10 frascos de 100 mL confeccionados em TFM (Teflon quimicamente modificado) e opera sob altas temperaturas e pressões. Esse sistema permite o acoplamento de sensores de temperatura e pressão que possibilitam o acompanhamento do processo de digestão e promovem uma maior segurança operacional. O programa de

aquecimento (CASTRO, 2009) utilizado nos experimentos com ácido concentrado e diluído é mostrado na Tabela 9.

Tabela 9. Programa de aquecimento para o procedimento de digestão em forno de micro-ondas com cavidade.

Etapa	Tempo (min.)	T (°C)	Potência (W)
1	5	120	1000
2	2	120	1000
3	10	210	750
4	15	210	750
Arrefecimento	10	-	-

Fonte: CASTRO, 2009

3.1.3.2. Equipamentos empregados para a determinação multielementar

1) Espectrômetro de emissão ótica com plasma de argônio indutivamente acoplado (ICP OES) simultâneo com visão axial e detector de estado sólido VISTA PRO (Varian, Mulgrave, Austrália). O sistema óptico do ICP OES foi calibrado com solução de referência multielementar e alinhamento da tocha foi realizado com uma solução de Mn 5,0 mg L⁻¹. As linhas espectrais foram selecionadas considerando-se as intensidades dos sinais de emissão dos analitos e do sinal de fundo, o desvio padrão das medidas e a sensibilidade adequada para a determinação de elementos presentes em altas e baixas concentrações nas amostras. A Tabela 10 ilustra as condições experimentais utilizadas para as determinações dos analitos. As linhas de emissão selecionadas para cada elemento foram em nm: Ba 455,396 (II), C 193,027 (I), Cu 324, 754 (I), Fe

238,204 (II), Mn 257,611 (II), Ni 231,602 (II), Se 196,026 (I), Sn 189,927 (II), Sr 407,771 (II) e Zn 202,548 (II). Sendo (I) linha atômica e (II) linha iônica.

Tabela 10. Parâmetros instrumentais para as medidas por ICP OES axial, Varian.

Potência RF (kW)	1,2
Vazão do gás de nebulização (L min⁻¹)	0,70
Vazão do gás auxiliar (L min⁻¹)	1,5
Vazão do gás do plasma (L min⁻¹)	15
Tempo de integração (s)	2,0
Tempo de estabilização (min)	15
Tempo de leitura (min)	1
Replicatas	3
Nebulizador	V-Groove
Câmara de Nebulização	Sturman-Master

2) Espectrômetro de massas com plasma de argônio indutivamente acoplado (ICP-MS) de baixa resolução (quadrupolo), modelo XSeriesII (Thermo Electron Corporation). A configuração do instrumento utilizou uma câmara de nebulização Peltier com pérola de impacto, tocha de quartzo de parte única com injetor de 1,5 mm e nebulizador concêntrico. O instrumento foi operado nos modos padrão usando Argônio com pureza de 99,98% e modo CCT (*Collision Cell Technology*, célula de colisão que utiliza 8,0% (v v⁻¹) de H₂ em He como gás da colisão), para separação dos íons dos interferentes utilizando Discriminação por Energia Cinética - KED, com comutação automática. O instrumento foi ajustado a cada dia de trabalho (*daily performance*) para máxima sensibilidade para íons M⁺, e mínimos sinais para M²⁺, MO⁺. As condições operacionais do instrumento são mostradas na Tabela 11.

Tabela 11. Parâmetros operacionais do ICP-MS.

Potência Incidente (W)	1350
Fluxo argônio nebulizador (L min⁻¹)	0,87
Fluxo argônio plasma (L min⁻¹)	13,0
Fluxo argônio auxiliar (L min⁻¹)	0,7
Modo de análise	<i>Peak Jump</i>
Sweeps	100
Dwell Time (ms)	10
Fluxo de gás CCT (L min⁻¹)	6,5

3.2. ESTRATÉGIAS DE PREPARO DE AMOSTRA UTILIZANDO ÁCIDO DILUÍDO

Os experimentos foram inicialmente realizados utilizando uma amostra de soja em grãos adquirida em supermercado da cidade de Salvador, Bahia, visando à otimização das condições experimentais.

Os procedimentos de pré-tratamento da amostra com soluções de ácido nítrico diluído foram efetuados em forno de micro-ondas com cavidade para a posterior determinação de microelementos em amostras de produtos derivados de soja. Para todos os procedimentos, foram efetuados três ensaios em branco juntamente com cada rodada. A exatidão do procedimento foi avaliada empregando material de referência certificado NIST 1568a (*Rice Flour*).

A digestão assistida por micro-ondas com cavidade foi empregada utilizando-se uma massa de 250 mg da amostra de grão de soja previamente moída em moinho de bolas (modelo 8000 M, *Spex Sample Prep*, USA), homogeneizadas em malhas de 500 µm e pesadas diretamente em frascos de polifluoro-alcoxi (PFA) com capacidade de 100 mL. Foram avaliadas quatro diferentes concentrações de HNO₃,

considerando um volume de solução de 7,0 mL. As concentrações ácidas utilizadas corresponderam à: 14,5; 7,3; 4,2 e 2,1 mol L⁻¹, sendo considerada a diluição com H₂O₂ e H₂O. Em todos os frascos foi adicionado 1,0 mL de H₂O₂ 30% (v v⁻¹) de modo que volume total de reagentes foi fixado em 8,0 mL para todos os experimentos no forno de micro-ondas com cavidade. O número de frascos foi mantido constante, sendo realizados experimentos independentes para cada proporção ácida. No preparo das soluções do branco analítico foram adicionados 7,0 mL de HNO₃ nas diferentes concentrações estudadas, juntamente com 1,0 mL de H₂O₂ 30% (v v⁻¹) com posterior aquecimento por radiação micro-ondas. O programa de aquecimento descrito na Tabela 9 foi aplicado a seis frascos reacionais. A potência e pressão máximas foram fixadas em 1000 W e 35 bar, respectivamente. Após o final do programa de aquecimento, os frascos foram resfriados até temperatura ambiente e cuidadosamente abertos uma vez que ainda poderiam estar sob pressão. As soluções foram transferidas para frascos volumétricos e o volume ajustado para 20,0 mL com água ultrapura de um sistema de purificação Milli-Q®.

3.3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Os procedimentos de digestão de amostras de grãos de soja e seus derivados em forno de micro-ondas com cavidade propostos neste trabalho utilizando soluções diluídas de HNO₃ e H₂O₂ como reagente auxiliar, tem a finalidade de aumentar a absorção de energia de micro-ondas pela água (KINGSTON e HASWELL, 1997). Conseqüentemente, a capacidade para converter a energia de micro-ondas em calor é mais pronunciada em soluções ácidas diluídas.

A Tabela 12 mostra os valores obtidos na análise do material de referência certificado NIST 1568a (*Rice Flour*) após decomposição em forno de micro-ondas com cavidade para a concentração ácida de 14,5 mol L⁻¹ em HNO₃.

Tabela 12. Concentrações (mg Kg^{-1}) dos analitos no material de referência certificado NIST 1568a após decomposição em forno de micro-ondas com cavidade empregando ácido nítrico $14,5 \text{ mol L}^{-1}$. Valores médios ($n=3$) e desvio padrão (s).

Elementos	Valor Encontrado (mg Kg^{-1})	Valor Certificado (mg Kg^{-1})
Cu	$2,26 \pm 0,05$	$2,4 \pm 0,3$
Fe	$8,1 \pm 0,3$	$7,4 \pm 0,9$
Mg	469 ± 13	560 ± 20
Mn	$20,1 \pm 0,2$	$20,0 \pm 1,6$
P	1588 ± 11	1530 ± 80
Zn	19 ± 1	$19,4 \pm 0,5$

A comparação entre os resultados obtidos e os valores certificados foi efetuada, não sendo constatadas diferenças significativas empregando teste t para a comparação das médias ao nível de 95% de confiança.

Numa segunda etapa a amostra de soja em grãos moída e homogeneizada foi utilizada para avaliar a eficiência da extração multielementar empregando diferentes concentrações ácidas ($14,5$; $7,3$; $4,2$; $2,1 \text{ mol L}^{-1}$) considerando como referência o procedimento descrito acima empregado para o material de referência certificado NIST 1568a. Os resultados encontrados são mostrados na Tabela 13.

Tabela 13. Concentrações ($\mu\text{g g}^{-1}$) dos analitos na amostra de soja em grãos, após decomposição em forno de micro-ondas com cavidade em diferentes concentrações de HNO_3 . Valores médios ($n=3$) e desvio padrão (s).

Elementos	14,5 mol L ⁻¹	7,3 mol L ⁻¹	4,2 mol L ⁻¹	2,1 mol L ⁻¹
Ba	11,3 ± 0,8	9,6 ± 0,1	9,5 ± 0,6	10,6 ± 0,4
Co	126 ± 12	105 ± 6	114 ± 12	116 ± 15
Cr	1,12 ± 0,03	0,8 ± 0,1	0,7 ± 0,1	1,0 ± 0,1
Cu	13,3 ± 0,9	11,5 ± 0,1	11,0 ± 1,4	11,0 ± 0,2
Fe	81 ± 4	77 ± 2	76 ± 4	84 ± 4
Mn	33,3 ± 0,8	31,5 ± 0,3	33 ± 1	35,2 ± 0,4
Ni	4,3 ± 0,5	4,9 ± 0,3	4,7 ± 0,8	4,1 ± 0,5
Sr	5,8 ± 0,7	6,4 ± 0,1	5,0 ± 0,4	5,1 ± 0,1
Zn	38 ± 2	37,3 ± 0,6	40 ± 2	42,6 ± 0,9

Os teores de Ba, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Sr, V e Zn para a amostra de soja em grãos obtidos após decomposição empregando ácido nítrico nas concentrações avaliadas, não diferiram significativamente (ANOVA) quando comparados aos obtidos na digestão com HNO_3 14,5 mol L⁻¹, situação de maior concentração ácida.

A Tabela 14 mostra os percentuais de extração obtidos para as diferentes concentrações ácidas investigadas considerando o procedimento utilizando ácido nítrico concentrado como referência.

Tabela 14. Eficiência da extração (%) de micro elementos em amostras de soja em grãos, nas diferentes proporções ácidas avaliadas em comparação com o procedimento de referência (HNO₃ 14,5 mol L⁻¹).

Elementos	7,3 mol L⁻¹	4,2 mol L⁻¹	2,1 mol L⁻¹
Ba	85 ± 5	84 ± 10	94 ± 10
Co	83 ± 7	90 ± 1	92 ± 3
Cr	71 ± 8	62 ± 8	89 ± 8
Cu	86 ± 6	83 ± 6	83 ± 6
Fe	95 ± 4	94 ± 5	104 ± 5
Mn	95 ± 3	98 ± 5	106 ± 3
Ni	114 ± 19	109 ± 29	95 ± 21
Sr	110 ± 11	86 ± 3	88 ± 8
Zn	97 ± 5	104 ± 6	111 ± 5

É possível constatar que para a maioria dos elementos, os maiores valores para eficiência de extração (%) foram obtidos para a decomposição utilizando ácido nítrico a 2,1 mol L⁻¹ (83 – 111%).

3.3.1 Acidez Residual e Teor de Carbono Residual

Com o objetivo de avaliar a eficiência da digestão nas diferentes concentrações ácidas foram determinados a acidez residual titulável do digerido e os teores médios de carbono residual. A acidez residual foi determinada através de titulação ácido-base, utilizando uma solução de NaOH previamente padronizada com hidrogenoftalato de potássio. Os resultados estão ilustrados nas Tabelas 15 e 16.

Tabela 15. Valores de acidez residual (mol L^{-1}) para os digeridos obtidos a partir da digestão de amostra de soja em grãos em forno de micro-ondas com cavidade, nas diferentes concentrações ácidas.

Acidez Inicial	Acidez Residual
14,5	$14,08 \pm 0,01$
7,3	$7,38 \pm 0,02$
4,2	$4,08 \pm 0,07$
2,1	$2,38 \pm 0,02$

Tabela 16. Teores de carbono residual (RCC % m v^{-1}) para amostra de soja em grãos, após a aplicação do procedimento de digestão em forno de micro-ondas com cavidade nas diferentes concentrações ácidas.

Concentração Ácida (mol L^{-1})	RCC % (m v^{-1})
14,5	$0,13 \pm 0,02$
7,3	$0,19 \pm 0,02$
4,2	$0,20 \pm 0,01$
2,1	$0,23 \pm 0,05$

O teor de carbono residual (RCC) é considerado um importante parâmetro para a avaliação da eficiência de um procedimento de decomposição (GOUVEIA et al., 2001; NÓBREGA et al., 2001; KRUSHEVSKA et al., 1992). A determinação do RCC foi efetuada por ICP OES após sonicação das soluções dos digeridos em banho ultrassônico por 3 min. para evitar a presença de compostos voláteis de carbono nestas soluções. As soluções padrão de calibração para carbono foram preparadas na faixa de 25 a 500 mg L^{-1} através da diluição da solução estoque de

referência de carbono (ácido cítrico (Merck) em água, 10000 mg L⁻¹) (FLORES et al., 2008).

Os valores obtidos para RCC nos procedimentos de decomposição para as diferentes concentrações ácidas utilizadas, mostrados na Tabela 16, foram comparados estatisticamente, não sendo constatada diferença significativa (teste t ao nível de 95% de confiança). Deste modo, os procedimentos investigados se mostraram eficientes para a decomposição da amostra avaliada, considerando os baixos valores obtidos para o teor de carbono residual (0,13 – 0,23%).

Considerando os parâmetros investigados acima, o procedimento proposto para a determinação multielementar de amostras de soja em grãos e derivados pode ser descrito como segue: para uma massa de cerca de 250 mg de amostra, adiciona-se 7,0 mL de HNO₃ a 2,1 mol L⁻¹ e 1,0 mL de H₂O₂ 30% (v v⁻¹) seguindo o programa de aquecimento em forno de micro-ondas com cavidade descrito na Tabela 9, com temperatura máxima de 210 °C e tempo total de decomposição de 42 min.

3.3.2 Validação do procedimento proposto

A validação de um método analítico é de fundamental importância para a confiabilidade dos resultados obtidos em laboratório. De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), validação consiste em se confirmar por exame e fornecimento de evidência objetiva que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos (ABNT NBR ISO, 2005). O processo de validação de um método deve considerar no mínimo seis parâmetros além da precisão e exatidão: faixa linear, limite de detecção, sensibilidade, especificidade, interferências e faixa de aplicação (WALTON, 2001).

Para a validação do procedimento proposto foram determinados os seguintes parâmetros de desempenho: efeito de matriz, limites de detecção e de quantificação, faixa linear de trabalho, precisão e exatidão.

3.3.2.1 *Faixa linear de trabalho*

A faixa linear de trabalho para os elementos Ba, Cu, Fe, Mn, Ni, Se, Sr e Zn considerando detecção por ICP OES correspondeu a 0,1 a 5,0 mg L⁻¹. Para os elementos As, Cd, Co, Cr, Hg, Pb, Sb e V considerando a detecção por ICP-MS a faixa linear correspondeu a 0,2 a 2,0 µg L⁻¹ para Pb; 2,0 a 20 µg L⁻¹ para Cd; 1,0 a 10,0 µg L⁻¹ para Cr; 0,1 a 1,0 µg L⁻¹ para As e Hg, e 0,5 a 5,0 µg L⁻¹ para Co, Sb e V.

3.3.2.2 *Efeito de matriz*

O efeito de matriz, conhecido também como efeito interelementos, é um tipo de interferência causada basicamente por fenômenos de absorção ou intensificação do sinal de emissão, por parte dos outros elementos constituintes da matriz analisada (NAGATA et al., 2001).

Foram preparadas curvas analíticas em HNO₃ 2,1 mol L⁻¹ com concentrações na faixa de 0,1 a 2,0 mg L⁻¹ para os elementos Cd, Cu, Fe, Mn, Ni e Zn, assim como foram preparadas curvas de adição de analito no digerido com ácido nítrico a 2,1 mol L⁻¹ com padrões na mesma faixa de concentração anterior. Foi efetuada análise de regressão para as curvas analíticas com calibração externa e as curvas de adição de analito. Os coeficientes angulares (*a*), que são uma estimativa da sensibilidade e os coeficientes de correlação (*r*) estão mostrados na Tabela 17.

Comparando os coeficientes angulares (inclinação) das duas curvas, constata-se que para Fe e Mn a sensibilidade da curva em meio ácido é maior (1,6 e 6,6%) que a sensibilidade da curva em meio da matriz, diferentemente para os elementos Cd, Cu, Ni e Zn onde a sensibilidade da curva preparada em meio ácido foi menor (-3,6 a -9,8%) que aquela obtida para a curva em meio da matriz. Os coeficientes angulares para as curvas analíticas em meio HNO₃ 2,1 mol L⁻¹ e em meio da matriz foram comparados ao nível de 95% de confiança, não sendo constatada diferença significativa para os elementos avaliados.

Tabela 17. Dados de regressão para as curvas analíticas, usando soluções padrão em HNO₃ 2,1 mol L⁻¹ e com adição de analito no digerido com HNO₃ 2,1 mol L⁻¹ (n=6).

Elemento	Soluções estoque em			Soluções estoque com			Razão a (%)*
	HNO ₃ 2,1 mol L ⁻¹			adição de analito			
	<i>a</i> (mg L ⁻¹)	<i>r</i>	<i>b</i>	<i>a</i> (mg L ⁻¹)	<i>r</i>	<i>b</i>	
Cd	11845	0,9999	54,7	13000	0,9999	109,21	- 9,8
Cu	8277,5	0,9997	81,3	8576,8	0,9999	1100,1	- 3,6
Fe	7974,1	0,9996	315,0	7845,2	0,9991	842,1	1,6
Mn	27607	0,9992	590,0	25782	0,9989	1544,7	6,6
Ni	995,64	0,9999	42,9	1036,2	0,9999	135,8	- 4,1
Zn	10460	0,9999	85,6	11402	0,9993	2031,4	- 9,0

* Razão positiva (+) indica que “a” da solução aquosa > que “a” da técnica de adição de analito e vice-versa.

3.3.2.3 Precisão

A precisão é convencionalmente avaliada para cada procedimento analítico considerando as duas formas mais comuns de expressá-las: repetitividade e a reprodutibilidade (INMETRO, 2003 e BRASIL, 2003).

Para a avaliação da precisão do procedimento de decomposição de amostras de soja em grãos e derivados com ácido diluído ($2,1 \text{ mol L}^{-1}$ em HNO_3) em forno de micro-ondas com cavidade, foi estimada a repetitividade obtida, usando para tanto os coeficientes de variação em percentual (CV%) obtidos para amostras de soja em grãos, proteína texturizada de soja e extrato de soja. Foram obtidos valores de CV menores que 5,5% para todos os analitos nas amostras analisadas, com exceção do Co (12%) e Cr (20%) para a amostra de proteína texturizada de soja, que apresentou baixa concentração destes analitos (Tabela 18).

Tabela 18. Valores de CV% para amostras de proteína texturizada de soja, soja em grãos e extrato de soja com detecção por ICP OES e ICP-MS.

Elementos	CV%		
	Amostras		
	Soja em Grãos	Proteína Texturizada de Soja	Extrato de Soja
Ba	4,2	4,8	5,5
Co	5,1	20	4,7
Cr	5,3	12	4,6
Cu	1,4	2,5	3,2
Fe	2,8	1,7	3,5
Mn	4,5	1,8	3,5
Ni	1,1	3,4	2,1
Sr	2,1	2,7	1,9
Zn	1,4	2,1	3,2

3.3.2.4 Exatidão

Define-se exatidão do método como sendo o grau de concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como convencionalmente verdadeiro (INMETRO, 2003). Os materiais de referência certificados (MRC) devem, sempre que possível, ser utilizados para validar um método analítico.

Para a validação do método foi empregado material de referência certificado NIST 1568a (*Rice Flour*). Após decomposição deste material em forno de micro-ondas com cavidade para a concentração ácida de 2,1 mol L⁻¹ em HNO₃, foi aplicado teste t pareado ao nível de 95% de confiança para comparação entre os resultados obtidos e certificados e não foram encontradas diferenças significativas entre as médias comparadas (Tabela 19).

Tabela 19. Concentrações (mg Kg⁻¹) dos analitos no material de referência certificado NIST 1568a após decomposição em forno de micro-ondas com cavidade empregando ácido nítrico 2,1 mol L⁻¹. Valores médios (n=3) e desvio padrão (s).

Elementos	Valor Encontrado (mg kg ⁻¹)	Valor Certificado (mg kg ⁻¹)
Cu	1,98 ± 0,09	2,4 ± 0,3
Fe	6,7 ± 0,3	7,4 ± 0,9
Mg	495 ± 28	560 ± 20
Mn	22,1 ± 0,7	20,0 ± 1,6
P	1388 ± 11	1530 ± 80
Zn	21,2 ± 0,9	19,4 ± 0,5

Foram efetuados testes de adição e recuperação dos analitos para a estimativa de recuperação, através da adição de quantidades conhecidas dos

mesmos (*spike*), em quatro níveis de concentração: 0,1; 0,5; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹ para determinação por ICP OES e ICP-MS de forma a abranger a faixa de concentração dos analitos na matriz. A amostra selecionada para este estudo correspondeu à soja em grãos (SG1). As alíquotas das soluções estoque dos analitos foram adicionadas ao meio reacional antes da execução do procedimento de decomposição, de forma a fazer um acompanhamento de todas as etapas do processo analítico.

Os valores obtidos para o percentual de recuperação nos quatro níveis de concentração para as determinações por ICP OES estão mostrados na Tabela 20. Pode-se constatar a alta eficiência do procedimento, considerando que foram obtidos percentuais de recuperação na faixa de 86 a 116%.

Tabela 20. Teste de adição e recuperação em quatro níveis de concentração para microelementos com detecção por ICP OES.

Elemento	Recuperação %			
	Níveis de concentração mg L ⁻¹			
	0,1	0,5	1,0	2,0
Cd	108 ± 9	104 ± 8	108 ± 7	100 ± 8
Cr	103 ± 8	111 ± 8	103 ± 7	100 ± 6
Cu	86 ± 5	99 ± 4	101 ± 9	101 ± 3
Fe	99 ± 4	89 ± 6	108 ± 11	97 ± 5
Mn	96 ± 4	99 ± 3	109 ± 6	107 ± 5
Ni	91 ± 11	101 ± 8	116 ± 7	100 ± 13
Se	115 ± 12	104 ± 9	103 ± 7	94 ± 5
V	100 ± 12	109 ± 15	115 ± 17	101 ± 11
Zn	99 ± 5	96 ± 7	89 ± 3	101 ± 6

Para as determinações empregando ICP-MS foi estudada a recuperação considerando a diluição das soluções dos digeridos com adição da alíquota da solução multielementar que corresponde à concentração final de 0,1 mg L⁻¹. Os resultados obtidos para a concentração final de 30,0 µg L⁻¹ estão mostrados na Tabela 21. Os percentuais de recuperação obtidos para a maioria dos elementos, que variaram de 85 a 105% com exceção do vanádio (62%), indicaram que o procedimento proposto é adequado para a determinação destes analitos por ICP-MS.

Tabela 21. Teste de adição e recuperação na concentração de 30,0 µg L⁻¹ para microelementos com detecção por ICP-MS.

Elementos	Recuperação %
As	105 ± 9
Cd	93 ± 6
Cr	85 ± 4
Hg	87 ± 7
Ni	91 ± 5
Pb	97 ± 4
V	62 ± 11

3.3.2.5 Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção corresponde a menor quantidade do analito presente numa amostra passível de ser detectado embora não necessariamente quantificado nas condições de trabalho estabelecidas, enquanto que o limite de quantificação corresponde a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas.

Os cálculos do limite de detecção e limite de quantificação podem ser efetuados como descrito nas equações 1 e 2 (MONTASER e GOLIGHTLY, 1996):

$$LOD = 3.RSD_{bco}.BEC / 100 \quad (Eq. 1)$$

$$LOQ = 3.LOD \quad (Eq. 2)$$

Onde:

BEC = concentração equivalente de background, calculada pela razão entre a média das intensidades do branco e o coeficiente angular da curva.

RSD_{bco} = coeficiente angular da curva analítica de calibração.

Os valores para LOD e LOQ, expressos em termos de $m v^{-1}$ e $m m^{-1}$ para os analitos, considerando o procedimento empregando ácido nítrico diluído ($2,1 mol L^{-1}$) são mostrados nas Tabelas 22 e 23. Para o cálculo de LOD e LOQ foram considerados os valores das intensidades obtidas para dez soluções do branco no cálculo do BEC.

Tabela 22. Estimativa dos limites de detecção e quantificação para ICP OES.

Analitos	LOD ($\mu g L^{-1}$)	LOQ ($\mu g L^{-1}$)	LOD ($\mu g g^{-1}$)	LOQ ($\mu g g^{-1}$)
Ba	1,7	5,7	0,14	0,46
Cu	3,4	11	0,27	0,90
Fe	17	55	0,59	1,95
Mn	2,9	10	0,23	0,76
Ni	3,8	13	0,12	0,41
Se	24	80	0,87	2,90
Sr	3,3	11	0,27	0,89
Zn	16	53	0,50	1,66

Tabela 23. Estimativa dos limites e detecção e quantificação para ICP-MS.

Analitos	LOD (ng L⁻¹)	LOQ (ng L⁻¹)	LOD (µg kg⁻¹)	LOQ (µg kg⁻¹)
As	7,7	26	2,1	6,9
Cd	6,7	22	1,8	5,9
Co	7,4	25	2,0	6,5
Cr	160	520	11	35
Hg	22	74	5,9	20
Pb	100	340	9,0	29
Sb	18	60	4,8	16
V	0,93	3,1	8,1	27

Na Tabela 24 estão mostrados os valores de LOQ para os procedimentos empregando ácido nítrico diluído (2,1 mol L⁻¹) e ácido nítrico concentrado (14,5 mol L⁻¹) para determinações por ICP OES. Verificam-se menores valores de LOQ para a determinação de Cu, Fe, Ni e Zn pelo procedimento proposto.

Tabela 24. Comparativo entre os valores de LOQ obtidos para os procedimentos de decomposição utilizando HNO₃ a 14,5 e 2,1 mol L⁻¹.

Analitos	LOQ (µg g⁻¹)	
	14,5 mol L⁻¹	2,1 mol L⁻¹
Ba	0,27	0,46
Cu	1,80	0,90
Fe	2,41	1,95
Mn	0,51	0,76
Ni	0,68	0,41
Se	1,44	2,90
Sr	0,13	0,89
Zn	1,94	1,66

3.4. APLICAÇÃO DO PROCEDIMENTO PROPOSTO NA DETERMINAÇÃO MULTIELEMENTAR EM AMOSTRA DE GRÃOS DE SOJA E DERIVADOS

O procedimento para decomposição de amostras de grãos de soja e derivados em forno de micro-ondas com cavidade utilizando ácido nítrico diluído ($2,1 \text{ mol L}^{-1}$) foi empregado para avaliar a composição multielementar de 22 amostras de soja em grãos e derivados comercializadas/cultivadas nas cidades de Salvador e Barreiras (BA) e Uberlândia (MG).

As informações relacionadas à descrição das amostras, local de cultivo/comercialização e origem, utilizadas neste trabalho estão mostradas na Tabela 25.

Os resultados para as concentrações dos analitos, expressos como média e desvio padrão de três replicatas, considerando detecção por ICP OES e ICP-MS, estão mostrados nas Tabelas 26 e 27, respectivamente.

Tabela 25. Relação de amostras utilizadas na avaliação da composição multielementar.

Amostras	Descrição	Local de Cultivo/Comercialização
ES1	Extrato de Soja	Salvador-BA
ES2	Extrato de Soja	Uberlândia-MG
ES3	Extrato de Soja	Salvador-BA
FS1	Farinha de Soja	Salvador-BA
FS2	Farinha de Soja	Uberlândia-MG
PTS1	Proteína Texturizada de Soja	Salvador-BA
PTS2	Proteína Texturizada de Soja	Salvador-BA
PTS3	Proteína Texturizada de Soja	Salvador-BA
PTS4	Proteína Texturizada de Soja	Salvador-BA
PTS5	Proteína Texturizada de Soja	Salvador-BA
PTS6	Proteína Texturizada de Soja	Salvador-BA
PTS7	Proteína Texturizada de Soja	Salvador-BA
PTS8	Proteína Texturizada de Soja	Salvador-BA
PTS9	Proteína Texturizada de Soja	Uberlândia-MG
PTS10	Proteína Texturizada de Soja	Salvador-BA
PTS11	Proteína Texturizada de Soja	Salvador-BA
SG1	Soja em Grãos	Salvador-BA
SG2	Soja em Grãos Orgânica	Uberlândia-MG
SG3	Soja em Grãos Escura	Uberlândia-MG
SG4	Soja em Grãos	Barreiras-BA
SGT1	Soja em Grãos Transgênica	Barreiras-BA
SGT2	Soja em Grãos Transgênica	Uberlândia-MG

Tabela 26. Concentrações ($\mu\text{g g}^{-1}$) de micro-elementos presentes em 22 amostras de soja em grãos e derivados com detecção por ICP OES.

Amostras		Elementos ($\mu\text{g g}^{-1}$)							
		Ba	Cu	Fe	Mn	Ni	Se	Sr	Zn
Extrato de Soja	ES1	2,90 ± 0,06	11,5 ± 0,3	56 ± 2	21,9 ± 0,4	2,3 ± 0,2	< 2,90	2,48 ± 0,04	40,0 ± 0,5
	ES2	1,46 ± 0,03	9,6 ± 0,1	47,8 ± 0,9	19,0 ± 0,1	1,87 ± 0,09	< 2,90	3,47 ± 0,03	29,3 ± 0,2
	ES3	2,75 ± 0,07	8,6 ± 0,1	24,9 ± 0,7	17,8 ± 0,5	2,55 ± 0,07	< 2,90	5,34 ± 0,09	39,3 ± 0,8
Farinha de Soja	FS1	8,85 ± 0,03	11,1 ± 0,2	72,4 ± 0,9	23,5 ± 0,4	2,07 ± 0,04	< 2,90	20,1 ± 0,5	33,9 ± 0,7
	FS2	3,38 ± 0,05	10,6 ± 0,1	46 ± 1	24,8 ± 0,3	2,34 ± 0,05	< 2,90	4,17 ± 0,03	35,5 ± 0,4
Proteína Texturizada de Soja	PTS1	2,66 ± 0,04	11,5 ± 0,3	77 ± 1	26,4 ± 0,3	1,0 ± 0,2	< 2,90	5,29 ± 0,05	45,2 ± 0,6
	PTS2	1,71 ± 0,01	7,6 ± 0,1	85 ± 5	25,4 ± 0,1	0,68 ± 0,03	< 2,90	5,78 ± 0,01	46,7 ± 0,2
	PTS3	6,95 ± 0,09	12,0 ± 0,4	130 ± 4	29,3 ± 0,6	1,8 ± 0,1	< 2,90	9,5 ± 0,2	45,1 ± 0,6
	PTS4	1,70 ± 0,05	7,6 ± 0,2	86 ± 3	24,0 ± 0,6	0,91 ± 0,09	< 2,90	5,7 ± 0,1	46 ± 1
	PTS5	5,0 ± 0,2	11,7 ± 0,5	72 ± 3	23,5 ± 0,8	1,54 ± 0,04	< 2,90	9,2 ± 0,3	44 ± 2
	PTS6	1,57 ± 0,03	7,34 ± 0,08	88 ± 2	23,4 ± 0,3	0,81 ± 0,02	< 2,90	5,8 ± 0,1	45,5 ± 0,5
	PTS7	1,567 ± 0,005	6,53 ± 0,05	78 ± 2	26,07 ± 0,05	0,81 ± 0,08	< 2,90	5,52 ± 0,02	46,4 ± 0,7
	PTS8	6,0 ± 0,2	12,2 ± 0,4	116 ± 10	27,3 ± 0,8	0,74 ± 0,03	< 2,90	9,2 ± 0,2	46 ± 1
	PTS9	3,05 ± 0,01	9,4 ± 0,3	101,9 ± 0,3	28,1 ± 0,2	1,03 ± 0,08	< 2,90	8,53 ± 0,02	45,9 ± 0,2
	PTS10	7,8 ± 0,2	10,74 ± 0,08	126 ± 3	30,6 ± 0,4	0,87 ± 0,04	< 2,90	9,5 ± 0,2	43,7 ± 0,7
	PTS11	6,27 ± 0,05	13,2 ± 0,1	112 ± 6	33,6 ± 0,2	1,21 ± 0,02	< 2,90	10,23 ± 0,03	47,3 ± 0,6
Soja em Grãos	SG1	10,6 ± 0,4	11,0 ± 0,2	84 ± 4	35,2 ± 0,4	4,1 ± 0,5	21 ± 3	5,1 ± 0,1	42,6 ± 0,9
	SG2	3,5 ± 0,2	10,6 ± 0,4	124 ± 3	25 ± 1	3,4 ± 0,2	25 ± 2	7,5 ± 0,3	35 ± 2
	SG3	5,5 ± 0,2	7,0 ± 0,1	46 ± 2	19,3 ± 0,3	2,5 ± 0,2	14 ± 2	6,22 ± 0,07	30,8 ± 0,3
	SG4	0,31 ± 0,09	7,4 ± 0,2	58 ± 5	17,2 ± 0,4	2,84 ± 0,03	18 ± 1	4,1 ± 0,2	41 ± 2
Soja em Grãos Transgênica	SGT1	0,064 ± 0,001	6,9 ± 0,02	72,83 ± 0,05	16,424 ± 0,001	1,33 ± 0,02	4,39 ± 0,03	2,69 ± 0,01	31,4 ± 0,2
	SGT2	2,91 ± 0,05	13,9 ± 0,6	94 ± 4	24,7 ± 0,3	4,78 ± 0,05	15,5 ± 0,3	5,8 ± 0,1	42 ± 1

Tabela 27. Concentrações ($\mu\text{g g}^{-1}$) de micro-elementos presentes em 22 amostras de soja em grãos e derivados com detecção por ICP-MS.

Amostras		Elementos $\mu\text{g g}^{-1}$					
		As	Cd	Co	Cr	Pb	V
Extrato de Soja	ES1	< 0,0069	< 0,0059	0,0229 \pm 0,0005	0,69 \pm 0,03	0,038 \pm 0,007	< 0,027
	ES2	< 0,0069	0,0176 \pm 0,0001	0,093 \pm 0,005	3,0 \pm 0,1	0,013 \pm 0,002	< 0,027
	ES3	< 0,0069	0,028 \pm 0,002	0,14 \pm 0,02	3,4 \pm 0,3	< 0,029	< 0,027
Farinha de Soja	FS1	< 0,0069	< 0,0059	0,012 \pm 0,008	0,73 \pm 0,04	0,062 \pm 0,004	< 0,027
	FS2	< 0,0069	0,022 \pm 0,005	0,29 \pm 0,07	3,00 \pm 0,03	0,015 \pm 0,001	< 0,027
Proteína Texturizada de Soja	PTS1	< 0,0069	< 0,0059	3,3 \pm 0,1	0,71 \pm 0,02	< 0,029	0,47 \pm 0,04
	PTS2	< 0,0069	< 0,0059	9,8 \pm 0,9	0,663 \pm 0,006	< 0,029	0,45 \pm 0,02
	PTS3	0,0076 \pm 0,0003	< 0,0059	6,4 \pm 0,2	0,669 \pm 0,02	0,036 \pm 0,008	0,47 \pm 0,01
	PTS4	< 0,0069	< 0,0059	8,7 \pm 0,8	0,70 \pm 0,05	< 0,029	0,44 \pm 0,03
	PTS5	< 0,0069	< 0,0059	3,0 \pm 0,2	0,56 \pm 0,03	0,05 \pm 0,01	0,09 \pm 0,01
	PTS6	< 0,0069	< 0,0059	7,9 \pm 0,8	0,691 \pm 0,006	0,11 \pm 0,02	<
	PTS7	< 0,0069	< 0,0059	6,95 \pm 0,07	0,6 \pm 0,1	< 0,029	0,54 \pm 0,01
	PTS8	0,013 \pm 0,002	0,017 \pm 0,003	18 \pm 2	0,56 \pm 0,01	< 0,029	< 0,027
	PTS9	< 0,0069	0,023 \pm 0,003	18,1 \pm 0,3	3,0 \pm 0,3	< 0,029	< 0,027
	PTS10	0,011 \pm 0,003	< 0,0059	8 \pm 1	2,4 \pm 0,4	< 0,029	< 0,027
	PTS11	0,0148 \pm 0,0004	0,033 \pm 0,005	29 \pm 4	4,2 \pm 0,2	0,039 \pm 0,007	< 0,027
Soja em Grãos	SG1	0,0178 \pm 0,0008	0,0185 \pm 0,0002	46 \pm 1	5,88 \pm 0,03	< 0,029	9,8 \pm 0,5
	SG2	0,040 \pm 0,007	0,019 \pm 0,004	102 \pm 14	10 \pm 1	0,035 \pm 0,001	20 \pm 3
	SG3	0,011 \pm 0,001	< 0,0059	21,0 \pm 0,2	8 \pm 1	< 0,029	4,3 \pm 0,3
	SG4	0,017 \pm 0,001	0,016 \pm 0,001	44 \pm 2	5,5 \pm 0,5	< 0,029	9,4 \pm 0,5
Soja em Grãos Transgênica	SGT1	0,011 \pm 0,002	0,014 \pm 0,001	12 \pm 2	4,7 \pm 0,2	< 0,029	< 0,027
	SGT2	0,019 \pm 0,005	0,018 \pm 0,004	32 \pm 9	5,00 \pm 0,06	0,056 \pm 0,009	6,3 \pm 0,9

As concentrações médias obtidas para os analitos estudados considerando as 22 amostras analisadas estiveram nas faixas ($\mu\text{g g}^{-1}$): As (0,0076 – 0,040), Ba (0,064 – 8,85), Cd (0,014 – 0,033), Co (0,012 – 102), Cr (0,56 – 5,88), Cu (6,53 – 13,9), Fe (24,9 – 130), Mn (16,424 – 35,2), Ni (0,68 – 4,78), Pb (0,013 – 0,062), Se (4,3861 – 25), Sr (2,48 – 20,1), V (0,09 - 20) e Zn (29,3 – 47,3). As concentrações para o elemento Hg estiveram abaixo do LOQ obtido para este analito ($0,020 \mu\text{g g}^{-1}$).

A Legislação Brasileira estabelece valores máximos para a presença de potenciais contaminantes inorgânicos em alimentos (BRASIL, 1965 e BRASIL, 1998). Para as amostras avaliadas, os valores de concentração obtidos estiveram abaixo dos valores máximos (VM) estabelecidos para os elementos: As (VM = $1,0 \mu\text{g g}^{-1}$), Cd (VM = $1,0 \mu\text{g g}^{-1}$), Cu (VM = $30 \mu\text{g g}^{-1}$), Ni (VM = $5,0 \mu\text{g g}^{-1}$), Pb (VM = $1,0 \mu\text{g g}^{-1}$) e Zn (VM = $50 \mu\text{g g}^{-1}$), com exceção dos elementos Cr e Se para os quais as concentrações obtidas estiveram acima dos valores máximos estabelecidos para estes elementos: Cr (VM = $0,1 \mu\text{g g}^{-1}$) e Se (VM = $0,05 \mu\text{g g}^{-1}$).

A presença de contaminantes inorgânicos no produto final, considerando as amostras de soja em grãos e seus derivados, pode ser explicada por uma potencial contaminação durante o cultivo, transporte, condições de armazenamento e/ou durante o processamento industrial.

Os teores médios de alguns elementos foram determinados para quatro cultivares de soja por YAMADA e colaboradores (2004). Estas amostras foram oriundas do Instituto Agronômico de Campinas (IAC), na cidade de São Paulo. Os valores de concentração em $\mu\text{g g}^{-1}$, para os elementos Cu, Fe, Mn e Zn estiveram na faixa de 6,97 – 10,50; 84,50 – 110,27; 18,43 – 24,83 e 37,80 – 42,33, respectivamente. Estes valores de concentração foram similares aos obtidos para as quatro amostras de soja em grãos avaliadas neste estudo (SG1, SG2, SG3 e SG4), que corresponderam em $\mu\text{g g}^{-1}$ a 7,0 – 11,0; 46 – 124; 17,2 – 35,2 e 30,8 – 42,6 para Cu, Fe, Mn e Zn, respectivamente.

As concentrações de Cu, Fe e Zn em amostras de extrato, farinha e proteína texturizada de soja, adquiridas em Madrid, Espanha, foram determinadas por Garcia

e colaboradores (1998). Para a amostra de extrato de soja, os teores de Cu, Fe e Zn obtidos em $\mu\text{g g}^{-1}$ corresponderam a 6,6; 17,4 e 51,1. Estes valores se apresentaram comparáveis para Cu e Zn considerando a faixa de valores de concentração obtida para as três amostras de extrato de soja avaliadas neste estudo (ES1, ES2 e ES3), que corresponderam em $\mu\text{g g}^{-1}$ a 8,6 – 11,5; 24,9 – 56 e 29,3 – 40 para Cu, Fe e Zn respectivamente. Para a amostra de farinha de soja, os teores de Cu, Fe e Zn obtidos em $\mu\text{g g}^{-1}$ corresponderam a 17,6; 42,6 e 50,3. Estes valores foram similares essencialmente para Fe considerando as faixas de concentração obtidas para duas amostras de farinha de soja avaliadas neste estudo (FS1 e FS2) que corresponderam em $\mu\text{g g}^{-1}$ a 10,6 a 11,1; 46 – 72,4 e 33,5 – 33,9. Para a amostra de proteína texturizada de soja, os teores de Cu, Fe e Zn obtidos em $\mu\text{g g}^{-1}$ corresponderam a 13,2; 69,8 e 43,9. Estes valores foram similares considerando as faixas de concentração obtidas para onze amostras de proteína texturizada de soja avaliadas neste estudo (PTS1 a PTS11) que corresponderam em $\mu\text{g g}^{-1}$ a 6,53 – 13,2; 72 – 116 e 43,7 – 47,3 para Cu, Fe e Zn respectivamente.

Amostras de soja em grãos e farinha de soja, adquiridas em cinco países (Argentina, Brasil, China, Estados Unidos e Índia), foram avaliadas (KAAR-LILIENTHAL et al., 2004) para a determinação de Cr, Cu, Fe, Mn, Ni e Zn dentre outros elementos. Para as amostras de soja em grãos e farinha de soja os resultados obtidos para as concentrações dos elementos citados estão mostradas nas Tabelas 28 e 29 considerando os cinco países onde foram adquiridas as amostras.

As faixas de concentração encontradas para as quatro amostras de soja em grãos avaliadas no presente estudo corresponderam em $\mu\text{g g}^{-1}$ a 5,5 – 10; 7,0 – 11,0; 46 – 124; 17,2 – 35,2; 2,5 – 4,1 e 30,8 – 42,6 para Cr, Cu, Fe, Mn, Ni e Zn respectivamente. Estes valores são comparáveis aos valores obtidos para as amostras de soja em grãos estudadas por Kaar-Lilienthal e colaboradores considerando os cinco países avaliados essencialmente para os elementos Cu, Fe, Mn e Zn (Tabela 28).

Tabela 28. Teores em $\mu\text{g g}^{-1}$ de Cr, Cu, Fe, Mn, Ni e Zn para amostras de **soja em grãos** adquiridas em cinco países.

Países	Elementos					
	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Zn
Argentina	0,3	29,4	148,8	39,8	6,3	61,8
Brasil	0,6	14,6	90,8	31,3	1,7	53,2
*Brasil	7,3	9,0	78,0	24,2	3,2	37,4
China	1,2	18,7	213,3	44,7	11,9	58,3
Estados Unidos	0,7	16,6	125,9	51	5,9	53,1
Índia	0,7	20,8	199,4	39,9	4,0	59,2

*Concentração média obtida para os elementos considerando o procedimento proposto no presente trabalho

Fonte: KAAR-LILIENTHAL et al., 2004, adaptada

Tabela 29. Teores em $\mu\text{g g}^{-1}$ de Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Se e Zn em para amostras de **farinha de soja** adquiridas em cinco países.

Países	Elementos					
	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Zn
Argentina	0,4	19,3	152,1	39,7	3,4	36,3
Brasil	0,4	16,7	183,8	33,4	2,2	56,8
*Brasil	1,9	10,9	59,2	24,2	2,2	34,7
China	0,5	14,7	161,6	33,9	11,3	46,3
Estados Unidos	0,4	20,2	108,7	40,3	5,6	58,3
Índia	0,5	22,2	118,5	44,3	4,4	58,7

*Concentração média obtida para os elementos considerando o procedimento proposto no presente trabalho

Fonte: KAAR-LILIENTHAL et al., 2004, adaptada

As faixas de concentração encontradas para as amostras de farinha de soja avaliadas no presente estudo corresponderam em $\mu\text{g g}^{-1}$ a 0,73 – 3,0; 10,6 – 11,1; 46 – 72,4; 23,5 – 24,8; 2,07 – 2,34 e 33,9 – 35,5 para Cr, Cu, Fe, Mn, Ni e Zn respectivamente. Estes valores são comparáveis aos valores obtidos para as amostras de farinha de soja estudadas por Kaar-Lilienthal e colaboradores (2004) considerando os cinco países avaliados essencialmente para os elementos Cr, Ni e Zn (Tabela 29).

No presente estudo foi efetuada uma avaliação comparativa entre a composição multielementar de duas amostras de soja em grãos cultivadas na cidade de Barreiras na Bahia, sendo uma destas geneticamente modificada (SGT1) e a outra convencional (SG4). O termo soja transgênica se refere à soja que contém um ou mais genes transferidos mediante processo de transformação genética. As características impressas a essa soja variam de acordo com o gene introduzido, que podem representar, por exemplo, a resistência a herbicidas e a insetos (EMBRAPA, 2009). É possível se constatar que houve diferença significativa (teste t, 95% de confiança) entre as concentrações dos analitos estudados quando comparadas as amostras SG4 e SGT1, exceto para os elementos As, Cd, Cr, Cu e Mn, o que sugere que a modificação na estrutura genética da planta pode promover alterações nos mecanismos de absorção e translocação de alguns elementos (DANIEL e CORREIA, 2010). A soja resistente ao herbicida conhecido como glifosato corresponde a aproximadamente 76 % da área cultivada com transgênicos no Brasil (ISAAA, 2009). O glifosato é um eficiente inibidor da enzima EPSPS (5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase), uma das enzimas associadas à rota biossintética dos aminoácidos aromáticos. A soja geneticamente modificada codifica uma variante da EPSPS, que possui baixa afinidade ao herbicida, conferindo a esta, tolerância ao mesmo (HARRISON et al., 1995). Este herbicida é absorvido e translocado nas plantas, promovendo eficiente controle das plantas daninhas, no entanto, existem informações sobre diferentes efeitos fisiológicos induzidos por esse herbicida, como por exemplo, a formação de um complexo pouco solúvel e móvel entre o glifosato e íons catiônicos (EKER et al., 2006), porém a natureza desse antagonismo não é bem conhecida. Além disso, o acúmulo deste herbicida nas raízes pode resultar na formação de um complexo imóvel entre alguns elementos a

exemplo do Fe e o glifosato, limitando dessa maneira o transporte desse nutriente (ANDRADE e ROSOLEM, 2011).

Convém ressaltar que foi feita a análise de uma amostra de soja em grãos transgênica (SGT2) cultivada na cidade de Uberlândia em Minas Gerais, e os resultados para as concentrações dos analitos nesta amostra foram comparados aos obtidos para a amostra de soja em grãos transgênica (SGT1) cultivadas na cidade de Barreiras na Bahia, sendo possível constatar que houve diferença significativa (teste t, 95% de confiança) quando comparadas as concentrações obtidas para SG4 e SGT1, exceto para os elementos As, Cd, Cr, Cu e Mn, sugerindo que as diferentes condições de cultivo podem influenciar nos processos de absorção e translocação de alguns nutrientes pela planta.

Com o objetivo de avaliar uma possível correlação entre a composição mineral e os tipos de amostras analisadas, foi efetuada uma investigação quimiométrica através da análise de variância (ANOVA fator único) e análise exploratória de dados PCA. As análises para PCA e ANOVA foram efetuadas utilizando o software STATística 6.0 (Statsoft, Inc., USA).

As amostras de soja em grãos e derivados, consideradas nas análises ANOVA e PCA, são identificadas pelos códigos ES1, ES2, ES3, FS1, FS2, PTS1, PTS2, PTS3, PTS4, PTS5, PTS6, PTS7, PTS8, PTS9, PTS10, PTS 11, SG1, SG2, SG3, SG4, SGT1 e SGT2 (Tabela 25).

Inicialmente, foi aplicada a análise de variância ANOVA fator único com um nível de 5%, para avaliar uma possível diferença significativa das concentrações dos analitos nas diferentes amostras de soja em grão e derivados. Os resultados obtidos empregando ANOVA fator único que considera a análise de variâncias das variáveis (Ba, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Sr e Zn) estão mostrados na Tabela 30.

Através da decomposição das variâncias, foi possível se constatar que o valor de $F_{\text{calculado}}$ para todos os elementos com exceção do Cu, é maior que o valor de $F_{\text{crítico}}$, e o p-valor para todos os elementos com exceção do Cu foi inferior a 0,05,

indicando que existe diferença significativa para a concentração destes elementos para as diferentes amostras analisadas.

Tabela 30. Resultados da ANOVA fator único.

Variável	F	Probabilidade (p-valor)	F _{crítico}
Ba	3,74	0,0088	2,52
Co	24,45	$4,21 \cdot 10^{-12}$	2,52
Cr	45,29	$1,3 \cdot 10^{-17}$	2,52
Cu	0,84	0,50	2,52
Fe	13,92	$3,97 \cdot 10^{-8}$	2,52
Mn	9,10	$7,82 \cdot 10^{-6}$	2,52
Sr	9,17	$7,23 \cdot 10^{-6}$	2,52
Zn	32,23	$1,97 \cdot 10^{-14}$	2,52

Foi também aplicada a análise de componentes principais (PCA) no intuito de classificar as amostras de acordo com as variáveis (Ba, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Sr e Zn) determinadas em três sub-amostras de cada amostra estudada e foi gerada uma matriz de dados 66x8 para a aplicação da análise de componentes principais.

Na Tabela 31 estão apresentados o percentual da explicação da variância de cada componente principal e o total de componentes principais geradas a partir da matriz de dados 66x8. A PCA mostrou que com as duas primeiras componentes principais foi possível descrever 65,4% dos dados, sendo 40,5% da variância total descrita pela primeira componente principal (CP1), e 24,9% pela CP2.

Tabela 31. Relação entre as componentes principais e a variância da análise.

CP	%Total	Acúmulo das CPs (%)
1	40,5	40,5
2	24,9	65,4
3	15,8	81,2
4	8,1	89,3
5	5,4	94,7
6	3,1	97,8
7	1,2	99,0
8	1,0	100,0

De acordo com a Tabela 32, a primeira componente principal (CP1) está relacionada principalmente com as concentrações de Ba, Cu, Fe, Mn, Sr e Zn, como também pode ser observado pelo gráfico de pesos na Figura 5.

Tabela 32. Pesos das variáveis em relação às duas primeiras componentes principais.

Variáveis	CP1	CP2
Ba	-0,75	0,19
Co	-0,12	0,89
Cr	0,22	0,95
Cu	-0,70	0,12
Fe	-0,77	0,17
Mn	-0,89	0,02
Sr	-0,64	-0,02
Zn	-0,56	-0,46

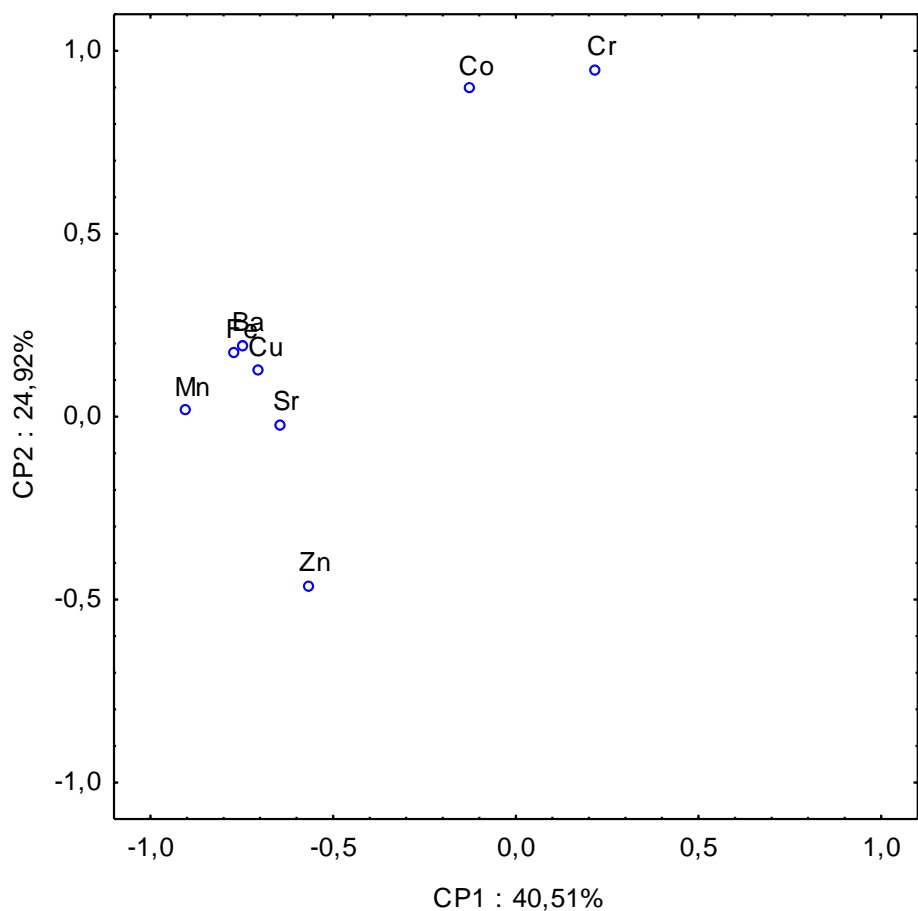


Figura 5. Gráfico de pesos.

Como as componentes principais são ortogonais, é possível avaliar as relações entre os objetos (amostras) através do gráfico dos escores projetados nas primeiras componentes principais (CP1 e CP2) (SENA e POPPI, 1999). Este gráfico de escores para as amostras avaliadas é mostrado na Figura 6.

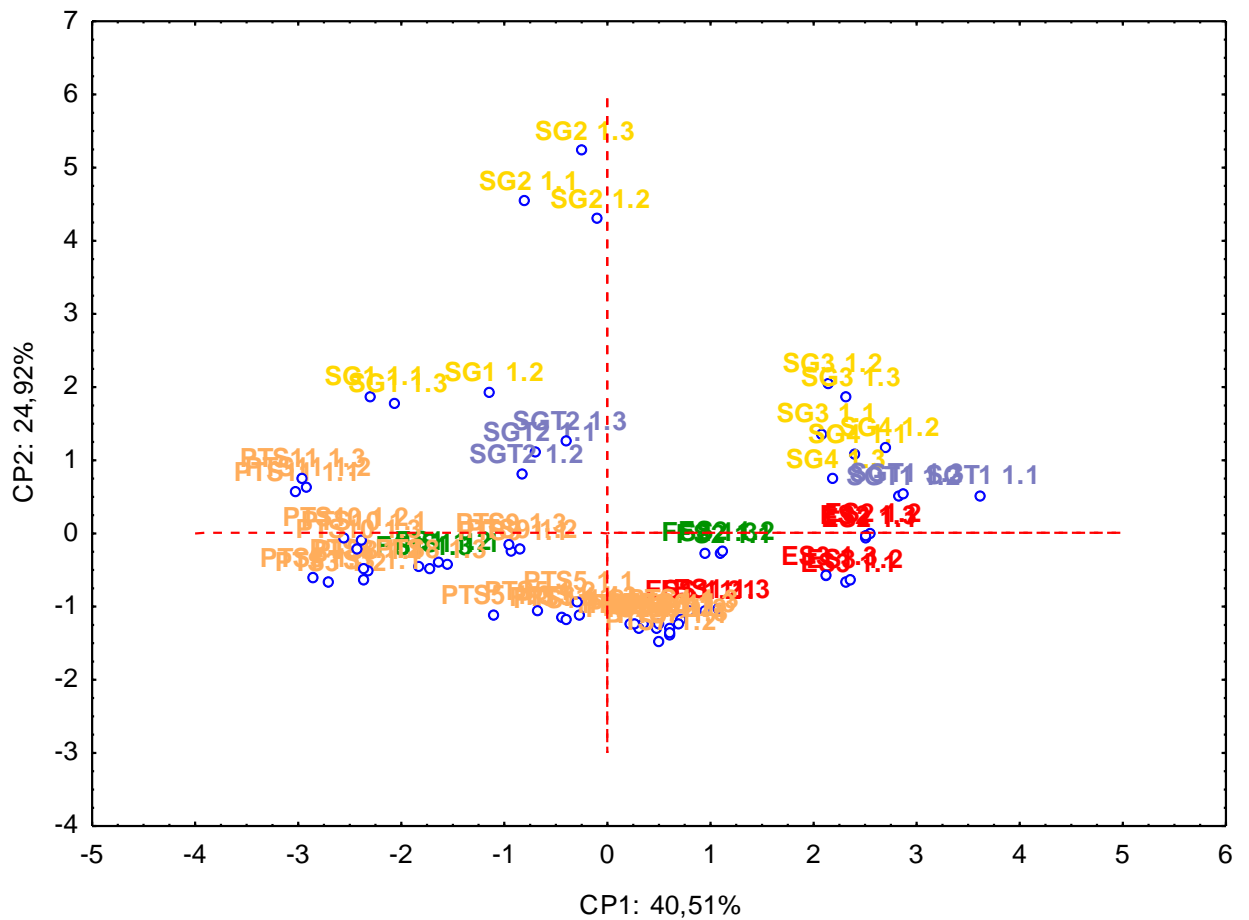


Figura 6. Gráfico de escores.

Ao analisar o gráfico da Figura 6, é possível constatar que as amostras nas suas diferentes formas não foram discriminadas em relação às variáveis escolhidas, mesmo com a análise de variância mostrando que existiu diferença significativa entre os teores do analito.

3.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de ácidos diluídos na digestão de amostras de soja em grãos e derivados em forno de micro-ondas com cavidade apresenta-se como uma alternativa promissora ao preparo de amostras para a determinação multielementar nestas amostras, visto que promove um menor consumo de reagentes, uma maior segurança operacional e minimiza a geração de resíduos.

Um procedimento de decomposição empregando ácido nítrico na concentração de $2,1 \text{ mol L}^{-1}$ foi empregado para 22 amostras de soja em grãos e derivados incluindo farinha, extrato e proteína texturizada de soja para a posterior determinação de As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Se, Sr, V e Zn. Os resultados obtidos empregando decomposição com ácido diluído estão de acordo com dados da literatura para as amostras avaliadas.

A análise de variância ANOVA evidencia que existe diferença significativa entre as concentrações dos analitos para as amostras avaliadas, no entanto não foi possível categorizá-las através da Análise de componentes principais (PCA), devido à grande amplitude em torno da média dos valores numéricos das concentrações para os analitos nas amostras, visto que estas foram procedentes de diferentes localidades, submetidas a diferentes tipos de processamento e cultivo.

Capítulo IV

*Combustão iniciada por
micro-ondas para posterior
determinação de elementos
traço e halogênios em
produtos de soja por ICP
OES e ICP-MS*

CAPÍTULO IV

4 COMBUSTÃO INICIADA POR MICRO-ONDAS PARA POSTERIOR DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS TRAÇO E HALOGÊNIO EM PRODUTOS DE SOJA POR ICP OES E ICP-MS

A combustão iniciada por micro-ondas (MIC) é um método de decomposição de amostras proposto recentemente que combina vantagens da digestão assistida por micro-ondas e da combustão. Adicionalmente, este método é convenientemente empregado para posterior determinação de metais e metalóides em matrizes orgânicas (FLORES et al., 2007).

Nas decomposições por MIC é utilizado um novo meio de ignição da amostra onde a radiação de micro-ondas é aplicada como uma fonte de aquecimento para a reação entre a amostra, disposta em um papel de filtro posicionado num suporte de quartzo localizado dentro do frasco reacional, e uma solução de nitrato de amônio. Inicialmente, uma massa específica de amostra é prensada numa prensa hidráulica até que esta assuma a forma de uma pequena pastilha (*pellets*). Cada pastilha é pesada e colocada em um pequeno pedaço de papel de filtro, previamente embebido em solução de nitrato de amônio $6,0 \text{ mol L}^{-1}$, disposto num suporte de quartzo com capacidade máxima para 50 mL contendo uma solução absorvedora que consiste em HNO_3 ou NH_4OH , convencionalmente. O sistema é então fechado e pressurizado com oxigênio (15 a 25 bar). Um rotor com capacidade de até oito frascos pressurizados é colocado dentro da cavidade de um forno de micro-ondas que opera à potência máxima de 1400 W para o início da combustão. Em geral, a ignição ocorre num tempo de 3 a 10 s e, frequentemente temperaturas acima de $1300 \text{ }^\circ\text{C}$ são atingidas (semelhante às bombas de combustão). A esta temperatura diversas matrizes orgânicas são completamente destruídas e convertidas em seus correspondentes produtos de oxidação. No interior deste frasco reacional, uma atmosfera rica em oxigênio pressurizado favorece um aquecimento localizado,

promovendo a ignição da amostra. Como neste método, a radiação micro-ondas é utilizada para tal ignição, não existe contato direto da amostra com outros materiais, minimizando uma possível contaminação da amostra e perdas do analito no momento da combustão. De uma maneira geral, o procedimento de decomposição por MIC envolve a combustão de amostras orgânicas em recipientes de quartzo pressurizados com oxigênio antes da etapa de ignição que é promovida pelo uso da radiação micro-ondas. Após a combustão, os vapores gerados são absorvidos em uma solução absorvedora adequada e, se necessário, uma etapa de refluxo pode ser aplicada a fim de assegurar a fixação do analito na solução. (ARRUDA et al., 2006). Para este procedimento, a quantidade de amostra que pode ser incinerada é limitada a 500 mg devido à alta pressão gerada dentro do frasco de combustão. Deste modo, se um sistema de preparo de amostras permite a combinação das vantagens associadas ao método MIC e a digestão assistida por micro-ondas, este pode ser vantajoso devido à possibilidade de decompor maior quantidade de amostra em adição a um baixo consumo ácido e melhor eficiência de digestão (MESKO et al., 2010).

Um estudo da decomposição de frações de petróleo utilizando o procedimento de combustão iniciada por radiação de micro-ondas (MIC) foi realizado (PEREIRA et al., 2009) para a determinação de cloro e enxofre por ICP OES. As amostras foram envolvidas com filme de polietileno e posicionadas no interior dos vasos de quartzo. Foram avaliadas a solução absorvente (H_2O_2 a 0,02 – 0,90 mmol L^{-1} ; $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ a 10 – 100 mmol L^{-1} e HNO_3 a 1 – 14 mol L^{-1}) e a massa de amostra. Para a determinação de Cl e S foram obtidas recuperações entre 92 e 102% utilizando 25 mmol L^{-1} de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ como solução absorvedora. A validação do procedimento proposto foi realizada por cromatografia iônica. Os limites de detecção obtidos por ICP OES corresponderam a 12 e 5 mg g^{-1} para Cl e S, respectivamente, e os valores correspondentes para determinação por cromatografia iônica foram 1,2 e 8 mg g^{-1} .

Em outro trabalho Pereira e colaboradores (PEREIRA et al., 2010), desenvolveram um procedimento para decomposição de óleo automotivo utilizando procedimento por MIC e consequente determinação de Ag, As, Ba, Bi, Ca, Cd, Cr,

Fe, K, Mg, Li, Mn, Mo, Ni, Pb, Rb, Se, Sr, Tl, V e Zn por ICP-MS. Para fins de comparação dos resultados, um procedimento de decomposição ácida utilizando forno de micro-ondas com aquecimento convencional foi utilizado para decomposição das amostras e a determinação dos analitos foi feita ICP OES. A concentração de ácido nítrico utilizada como solução absorvente foi avaliada nas concentrações 1, 2, 4, 7, 10 e 14 mol L⁻¹ utilizando uma etapa adicional de refluxo após a combustão. A exatidão do procedimento por MIC foi avaliada para As, Ba, Ni, Se V e Zn utilizando material de referência certificado com matriz de composição semelhante. Os valores obtidos para a recuperação dos analitos foram superiores a 97% utilizando HNO₃ a 2,0 mol L⁻¹ como solução absorvedora. Desta forma, menores valores para limites de detecção por ICP-MS e ICP OES foram obtidos quando comparados aos obtidos pelo método de decomposição ácida assistida por micro-ondas. O procedimento empregando MIC torna-se preferível tendo em vista a possibilidade de usar ácido nítrico diluído como solução absorvente o que é um aspecto importante a ser considerado com o objetivo de minimizar interferências nas técnicas ICP-MS e ICP OES.

Um procedimento de decomposição por MIC proposto por Antes e colaboradores (ANTES et al., 2010) foi empregado para a decomposição de carvão para posterior determinação de As, Cd e Pb por ICP-MS e Hg por geração de vapor frio acoplado a ICP-MS. Pastilhas de carvão (500 mg) foram preparadas e submetidas ao procedimento de decomposição por MIC. O uso de ácido nítrico como solução absorvedora foi testado nas concentrações 1,7; 3,5; 5,0; 7,0 e 14,0 mol L⁻¹. A avaliação do teor de carbono residual mostrou que os melhores resultados foram obtidos usando HNO₃ a 7,0 mol L⁻¹. A precisão do método foi avaliada utilizando material de referência certificado (MRC) de carvão e os resultados evidenciaram valores de recuperação compreendidos entre 95 e 97% para todos os analitos. Para comparação dos resultados, foi empregado um procedimento de digestão ácida assistida por micro-ondas. Os teores de carbono residual obtidos na decomposição por digestão ácida por micro-ondas e MIC corresponderam a 15% e <1%, respectivamente, mostrando a melhor eficiência do procedimento de decomposição por MIC.

O uso de cromatografia iônica acoplada a espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (IC-ICP-MS) foi proposto (PEREIRA et al., 2011), para a determinação da concentração de Cl orgânico total, Br e I em ácidos húmicos extraídos de solos florestais em vários níveis de profundidade após decomposição por (MIC). Os analitos foram absorvidos em solução alcalina diluída (50 mmol L⁻¹ de (NH₄)₂CO₃). A exatidão foi avaliada utilizando materiais de referência certificados (MRC) e amostras enriquecidas com os analitos tendo sido obtidos valores de recuperação superiores a 97%. Como uma vantagem sobre os procedimentos convencionais, utilizando o procedimento de decomposição por MIC foi possível digerir até oito amostras em apenas 25 minutos, sendo obtida uma única solução utilizada para a determinação dos halogênios avaliados.

Um procedimento de decomposição por MIC foi proposto por Duarte e colaboradores (DUARTE et al., 2009) para a posterior determinação de arsênio total em amostras de frutos do mar. Foi possível a decomposição de cerca de 500 mg de amostras de tecidos de peixe e mexilhões e camarão inteiro. A determinação de arsênio foi realizada empregando as técnicas ICP-MS, FI-HG AAS e FI-HG-ICP-MS. A exatidão foi avaliada empregando material de referência certificado, tendo sido encontrados valores de concordância entre 96 – 103% fazendo uso de solução de HNO₃ a 0,1 mol L⁻¹ como solução absorvedora. Os resultados obtidos para as diferentes técnicas de detecção foram concordantes (teste t, 95% confiança). As concentrações de arsênio (µg g⁻¹) obtidas para as amostras de camarão, mexilhão e peixe corresponderam a 1,45 ± 0,09; 6,31 ± 0,41 e 9,9 ± 0,5, respectivamente.

Barin e outros pesquisadores (BARIN et al, 2008) utilizaram um procedimento de decomposição por MIC para a determinação de Cd e Pb em amostras botânicas por GF AAS. O volume da solução de nitrato de amônio foi avaliado sendo o valor de 20 µL selecionado. Uma massa de aproximadamente 60 mg foi pesada para as amostras, o que definiu baixos valores de LOD para Cd (0,003 µg g⁻¹) e Pb (0,24 µg g⁻¹). A precisão obtida para o método variou entre 94 – 105%, e a exatidão foi avaliada empregando materiais de referência certificados.

Neste capítulo será discutida a utilização do método de combustão iniciada por micro-ondas para digestão de amostras de soja em grãos e derivados para posterior determinação multielementar por ICP OES e ICP-MS. Os halogênios Br, Cl e I foram também determinados por ICP-MS e Hg por FI-HG-ICP-MS.

Para fins de comparação de resultados, as amostras foram também analisadas após digestão em forno de micro-ondas com cavidade para posterior determinação dos analitos por ICP OES e ICP-MS.

4.1 PARTE EXPERIMENTAL

4.1.1 Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas com reagentes de grau analítico e água ultrapura, com resistividade específica de $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$, de um sistema de purificação Millipore (Milli-Q®, Millipore, Bedford, MA, EUA). Todas as vidrarias e frascos foram previamente descontaminados em banho ácido contendo HNO_3 10% (v v⁻¹), por no mínimo 24 h e lavadas com água desionizada antes do uso.

Soluções de referência foram preparadas a partir de soluções estoque contendo 10 mg L^{-1} de As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb, Sb, Se, Sn, Sr e Zn (SCP33MS, SCP Science, Quebec, Canadá), no mesmo meio dos digeridos obtidos. Para a determinação dos teores de carbono residual após os procedimentos de decomposição, foram preparadas soluções de referência de ácido cítrico (Merck, Alemanha) utilizando solução estoque 5,0% (m v⁻¹) em C.

Na execução dos trabalhos experimentais, os seguintes reagentes foram utilizados: ácido nítrico (65% m m⁻¹, Merck, Alemanha), hidróxido de amônio (25% m m⁻¹, Merck, Alemanha), nitrato de amônio (Merck, Alemanha), álcool etílico (Merck, Alemanha).

Pequenos discos de papel de filtro (15 mm de diâmetro e aproximadamente 12 mg), (Black Ribbon Ashless, Schleicher and Schuell, Dassel, Alemanha) foram também utilizados para auxiliar no processo de combustão.

4.1.2 Amostras

Os experimentos foram executados utilizando dez amostras de soja em grãos e derivados (ES1, FS1, PTS1, PTS2, PTS3, PTS4, PTS5, PTS6, PTS7 e SG1) vide Tabela 25 disponíveis em estabelecimentos comerciais na cidade de Salvador na Bahia.

O material de referência certificado utilizado nos estudos de validação foi o MRC NIST 8433 (*Corn bran*, Gaithersburg, Maryland, USA).

4.1.3 Instrumentação

4.1.3.1 *Procedimento de decomposição de amostras por combustão iniciada por micro-ondas*

Os estudos envolvendo combustão iniciada por micro-ondas foram realizados em forno de micro-ondas *multiwave* 300 (Anton Paar, Graz, Áustria). Esse sistema estava equipado com um rotor com capacidade para 8 frascos de quartzo de 80 mL e opera à temperatura e pressão máximas de 280°C e 80 bar, respectivamente. O programa de aquecimento utilizado para a combustão iniciada por micro-ondas foi: i) 1400 W por 5 min e ii) 0W por 20 min (arrefecimento). Este equipamento foi também utilizado para a digestão ácida das amostras de acordo com o programa de aquecimento a seguir: 1400 W por 15 min (rampa de 10 min), e 0 W por 20 min (arrefecimento).

4.1.3.2 Equipamentos empregados para a determinação multielementar

- 1) Espectrômetro de massas com plasma de argônio indutivamente acoplado (ICP-MS) (PerkinElmer- SCIEX, Model Elan DRC II, Thornhill, Canada) equipado com um nebulizador concêntrico (Meinhard Associates, Golden, USA), uma câmara de nebulização ciclônica (Glass Expansion, Inc., West Melbourne, Australia) e uma tocha de quartzo com um tubo injetor de quartzo (2,0 mm d.i.). Este equipamento foi acoplado a um sistema de geração de hidretos por injeção em fluxo (FI-HG-ICP-MS) para a determinação de Hg. As condições operacionais do instrumento são evidenciadas na Tabela 33.

- 2) Espectrômetro de emissão ótica com plasma de argônio indutivamente acoplado (ICP OES) simultâneo com visão axial (Modelo Spectro Ciros CCD, Spectro Analytical Instruments, Kleve, Germany), equipado com um nebulizador de fluxo cruzado e uma câmara de nebulização *Double pass-Scott*. As condições operacionais do instrumento são descritas na Tabela 33.

Tabela 33. Parâmetros instrumentais para as medidas por ICP OES, ICP-MS e FI-HG-ICP-MS.

Parâmetros	ICP-MS	ICP OES	FI-HG-ICP-MS
Potência RF (W)	1300	1500	1300
Vazão do gás do plasma (L min ⁻¹)	15,0	14,0	15,0
Vazão do gás auxiliar (L min ⁻¹)	1,2	1,0	1,2
Vazão do gás de nebulização (L min ⁻¹)	1,1	0,70	1,2
Câmara de nebulização	Ciclônica	<i>Double pass, Scott</i>	
Nebulizador	Concêntrico	Fluxo cruzado	
<i>Dwell time</i> (ms)	3		10
Varreduras/Leitura	3		1
Leituras/Replicata	3		500
Replicatas	3		1

4.2 ESTRATÉGIAS DE PREPARO DAS AMOSTRAS POR MIC

As amostras foram moídas em moinho de bolas modelo 8000 M (Spex Sample Prep, USA) com frasco e esferas de carbeto de tungstênio. O peneiramento das amostras foi realizado em malhas de nylon TENYL (Guarulhos, Brasil) de 500 μm .

Para o procedimento utilizando MIC, foram confeccionadas pastilhas de 400 mg utilizando uma prensa hidráulica (1 ton por min) e cada pastilha foi disposta sobre um disco de papel de filtro, previamente descontaminado com álcool etílico por 20 min. em banho ultrassônico, posicionado na base de um suporte de quartzo. Após a adição de 50 μL de uma solução de NH_4NO_3 $6,0 \text{ mol L}^{-1}$, o suporte com a amostra foi posicionado no interior de um frasco de quartzo contendo 6,0 mL de solução absorvente ($4,0 \text{ mol L}^{-1}$, HNO_3) para determinação de metais, e contendo 6,0 mL de solução absorvente (100 mmol^{-1} NH_4OH) para determinação de halogênios (Figura 7). Os frascos foram fechados e pressurizados com 20 bar de oxigênio por 1 minuto. Para a decomposição das amostras por combustão iniciada por micro-ondas foi empregado o forno de microondas Multiwave 3000 (Microwave Sample Preparation System, Anton Paar GmbH, Graz, Áustria) equipado com 8 frascos de quartzo com volume interno de 80 mL (mod. XQ-80). O sistema possui sensores que permitem medir a temperatura e a pressão em tempo real em todos os frascos com temperatura e pressão máxima de trabalho de 280 $^\circ\text{C}$ e 80 bar respectivamente. A combustão foi efetuada com 5 min de irradiação em potência de 1400 W. Após a decomposição as soluções dos digeridos foram transferidas para frascos de polipropileno e diluídas com água ultrapura até 30 mL para posterior análise.

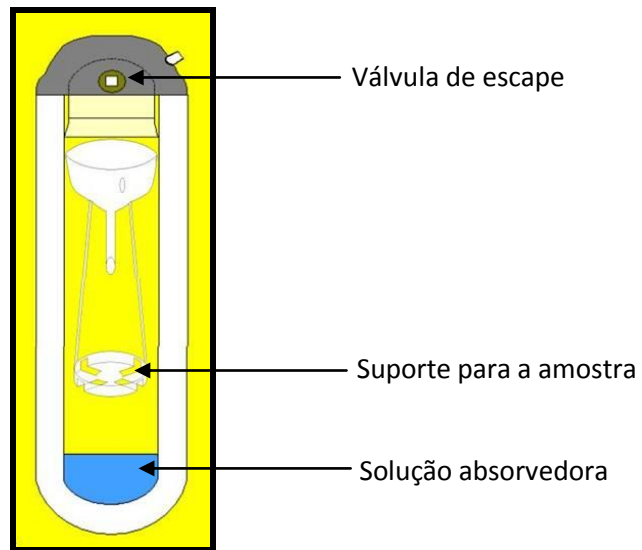


Figura 7. Esquema do frasco de quartzo utilizado para decomposição por MIC.

Todas as amostras foram também submetidas a um procedimento de digestão ácida assistida por micro-ondas para fins comparativos. Deste modo, foram pesados em frascos de quartzo cerca de 400 mg de amostra e foram então adicionados 6,0 mL de HNO_3 65% (m m^{-1}). O programa de aquecimento utilizado foi: 1400 W por 15 min (rampa de 10 min), e 0 W por 20 min (arrefecimento). As soluções dos digeridos foram transferidas para frascos de polipropileno e diluídas com água ultrapura até 30 mL para posterior análise por ICP OES e ICP-MS.

Os estudos envolvendo decomposição por MIC foram realizados no Grupo de Análise Industrial, Toxicológica e Ambiental localizado na cidade de Santa Maria, Rio Grande do Sul.

4.3 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

4.3.1 Validação do procedimento empregando MIC

Na etapa de validação foram determinados alguns parâmetros de desempenho do procedimento de decomposição por MIC. A seguir estão descritos os procedimentos empregados para a avaliação dos parâmetros: faixa linear de trabalho, teor de carbono residual, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão.

4.3.1.1 *Faixa linear de trabalho*

A faixa linear de trabalho para os analitos considerando detecção por ICP OES correspondeu a 5 a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$. Para a detecção por ICP-MS a faixa linear correspondeu a 0,025 a 10 $\mu\text{g L}^{-1}$.

4.3.1.2 *Teor de Carbono Residual*

O teor de carbono residual (RCC) tem sido constantemente considerado para avaliar a eficiência de digestão de procedimentos de preparo de amostra (GOUVEIA et al. 2001, COSTA et al. 2001). A determinação do RCC foi efetuada por ICP OES após sonicação das soluções dos digeridos em banho ultrassônico por 3 min. para evitar a presença de compostos voláteis de carbono nestas soluções. As soluções padrão de calibração para carbono foram preparadas na faixa de 25 a 500 mg L^{-1} através da diluição da solução estoque de referência de carbono (ácido cítrico (Merck) em água, 10000 mg L^{-1}) (FLORES et al., 2008). Neste trabalho o RCC foi

determinado nas soluções dos digeridos obtidos por MIC e por digestão ácida assistida por micro-ondas (DA-MO).

Utilizando a decomposição por DA-MO o RCC obtido correspondeu a 13% enquanto que para a digestão por MIC o RCC obtido foi inferior a 0,2% para os digeridos das amostras. O baixo valor obtido para o RCC após digestão por MIC pode ser explicado pela elevada temperatura (aproximadamente 1400 °C) alcançada durante a combustão. Sob estas condições praticamente toda matéria orgânica presente é oxidada, o que previne possíveis interferências em determinações por ICP OES.

4.3.1.3 *Precisão*

Para a avaliação da precisão do procedimento de decomposição de amostras de soja em grãos e derivados por MIC, foi estimada a repetitividade obtida, usando para tanto os coeficientes de variação em percentual (CV%) obtidos para amostras de soja em grãos (SG1), proteína texturizada de soja (PTS1) e extrato de soja (ES1). Os resultados obtidos estão mostrados na Tabela 34, e para fins comparativos são mostrados também os valores para CV obtidos para o procedimento de decomposição por DA-MO.

Tabela 34. Valores de CV% para a decomposição por MIC e DA-MO (n=8).

Elementos	Procedimento	Amostras		
		PTS1	ES1	SG1
Ba	MIC	5	1	4
	DA-MO	12	1	8
Co	MIC	8	14	3
	DA-MO	1	12	6
Cr	MIC	1	17	2
	DA-MO	8	11	22
Cu	MIC	14	6	11
	DA-MO	8	8	11
Mn	MIC	11	2	11
	DA-MO	15	4	8
Ni	MIC	2	6	4
	DA-MO	1	7	2
Sr	MIC	7	3	1
	DA-MO	9	3	2
Zn	MIC	2	2	8
	DA-MO	5	3	7

De um modo geral foram obtidos valores de CV menores para o procedimento de decomposição por MIC em comparação aos valores obtidos para DA-MO.

4.3.1.4 Exatidão

Para a avaliação da exatidão do procedimento de decomposição por MIC foi empregado material de referência certificado e foi efetuada uma avaliação comparativa entre resultados obtidos por MIC e por digestão ácida assistida por micro-ondas (DA-MO).

4.3.1.4.1 Avaliação da exatidão com MRC

O material certificado de referência NIST 8433 (*Corn Bran*) foi submetido à digestão pelos procedimentos MIC e digestão ácida assistida por micro-ondas (DA-MO) e as soluções dos digeridos foram analisadas por ICP OES e ICP-MS. Os resultados são mostrados na Tabela 35. A concordância entre os resultados obtidos e valores certificados foi superior a 95% para todos os analitos.

Tabela 35. Resultados para as concentrações de microelementos e halogênios em material de referência certificado por ICP OES e ICP-MS e após digestão por MIC e DA-MO. Resultados em $\mu\text{g g}^{-1}$ (média e desvio padrão para n=3).

Analitos	ICP OES		ICP-MS		Valor certificado, $\mu\text{g g}^{-1}$
	MIC	DA-MO	MIC	DA-MO	
As	ND	ND	< 0,002	< 0,004	0,002 \pm 0,002
Ba	2,3 \pm 0,3	2,5 \pm 0,3	2,35 \pm 0,04	2,6 \pm 0,3	2,40 \pm 0,52
Br	ND	ND	2,25 \pm 0,08	ND	2,3 \pm 0,5
Cd	< 0,150	< 0,150	0,012 \pm 0,001	0,016 \pm 0,001	0,012 \pm 0,005
Cl	ND	ND	25,8 \pm 0,5	ND	31 \pm 21
Co	< 0,130	< 0,130	< 0,003	< 0,010	0,006 \pm 0,006
Cr	< LOD	< LOD	0,108 \pm 0,03	0,11 \pm 0,02	0,101 \pm 0,087
Cu	2,3 \pm 0,3	2,5 \pm 0,3	2,4 \pm 0,02	2,6 \pm 0,1	2,470 \pm 0,400
I	ND	ND	< 0,002	ND	0,026 \pm 0,006
Mn	2,53 \pm 0,07	2,6 \pm 0,1	2,47 \pm 0,09	2,4 \pm 0,5	2,550 \pm 0,290
Ni	< 0,200	< 0,200	0,134 \pm 0,034	0,13 \pm 0,03	0,158 \pm 0,054
Sb	ND	ND	< 0,002	< 0,003	*0,004
Se	ND	ND	0,043 \pm 0,03	0,048 \pm 0,004	0,045 \pm 0,008
Sn	ND	ND	< 0,002	< 0,003	ND
Sr	4,5 \pm 0,5	4,6 \pm 0,2	4,6 \pm 0,02	4,4 \pm 0,9	4,62 \pm 0,06
Pb	ND	ND	0,16 \pm 0,02	0,15 \pm 0,02	0,140 \pm 0,034
Zn	17 \pm 3	18 \pm 2	18,9 \pm 0,9	18 \pm 2	18,6 \pm 2,2

*Valor Estimado

ND = Não determinado

4.3.1.4.2 Comparação com procedimento de digestão ácida assistida por micro-ondas

Para fins comparativos as amostras de soja em grãos e derivados foram submetidas à decomposição por DA-MO para a posterior determinação dos analitos por ICP OES e ICP-MS.

Os resultados obtidos para as concentrações dos analitos após digestão por MIC não apresentaram diferença significativa quando comparados aos obtidos após digestão ácida assistida por micro-ondas (DA-MO) (teste t, $p < 0,05$), após determinação por ICP OES e ICP-MS. Para todos os analitos não foram encontradas diferenças significativas (teste t, $p < 0,05$) entre os resultados obtidos para ambas as técnicas de detecção.

4.3.1.5 *Limites de Detecção e Quantificação*

Os cálculos do limite de detecção e limite de quantificação foram efetuados conforme descrito por MONTASER e GOLIGHTLY, 1996.

Os valores para LOD e LOQ, expressos em termos de mg m^{-1} para os analitos considerando os procedimentos de decomposição por MIC e DA-MO e detecção por ICP OES e ICP-MS são mostrados na Tabela 36.

Tabela 36. Resultados obtidos para LOD e LOQ do método por ICP OES e ICP-MS.

Elementos	$\mu\text{g g}^{-1}$							
	ICP-MS				ICP OES			
	MIC		DA-MO		MIC		DA-MO	
	LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ
As	0,002	0,006	0,004	0,013	ND	ND	ND	ND
Ba	0,362	0,963	0,436	1,10	0,250	0,830	0,500	1,66
Cd	0,001	0,003	0,030	0,100	0,150	0,500	0,150	0,500
Co	0,003	0,010	0,010	0,033	0,100	0,330	0,130	0,430
Cr	0,022	0,855	0,032	0,106	0,110	0,366	0,150	0,500
Cu	0,040	0,133	0,080	0,266	0,020	0,060	0,082	0,273
Mn	0,014	0,046	0,022	0,073	0,010	0,030	0,020	0,060
Ni	0,050	0,166	0,241	0,803	0,200	0,660	0,200	0,660
Pb	0,005	0,016	0,010	0,033	ND	ND	ND	ND
Sb	0,002	0,006	0,003	0,010	ND	ND	ND	ND
Se	0,002	0,006	0,020	0,060	ND	ND	ND	ND
Sn	0,002	0,006	0,003	0,010	ND	ND	ND	ND
Sr	0,004	0,013	0,075	0,250	0,021	0,07	0,015	0,150
Zn	0,051	0,170	1,125	3,75	0,200	0,660	0,400	1,33

*ND = não determinado

Os valores de LOD e LOQ obtidos para o procedimento de decomposição por MIC foram inferiores aos obtidos por DA-MO considerando ambas as técnicas de decomposição, definindo uma vantagem associada ao procedimento de decomposição por combustão iniciada por micro-ondas.

4.3.2 Aplicação do Procedimento MIC para Decomposição das Amostras

4.3.2.1 Determinação multielementar por ICP OES e ICP-MS após decomposição por MIC

O procedimento de decomposição por MIC foi empregado para as amostras estudadas, e posteriormente os analitos foram determinados por ICP OES e ICP-MS. Os resultados obtidos estão mostrados na Tabela 37, considerando decomposição por MIC e DA-MO e determinação por ICP OES. Para todos os analitos não foram encontradas diferenças significativas (teste t, $p < 0,05$) entre os resultados obtidos para ambas as técnicas de detecção e para os diferentes procedimentos de decomposição.

As concentrações de Ba, Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Sr e Zn nas amostras de produtos derivados de soja foram encontradas nas faixas entre 1,7–11,1, 10,2–110,1, 0,25–1,72, 7,8–14,0, 23,3–31,7, 1,2–3,4, 2,4–10,6 e 41,4–57,8 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente para a determinação por ICP OES, e nas faixas entre 1,8–9,4, 18,6–108,2, 0,45–1,65, 7,8–13,6, 23,3–31,8, 1,2–3,4, 2,4–10,6 e 40,0–58,5 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente para a determinação por ICP-MS.

Para as amostras ES1 e FS1, as concentrações de Co estiveram abaixo dos valores de limite de quantificação (LOQs) obtidos por ICP-MS e ICP OES. Para todas as amostras, as concentrações de As, Cd, Sb, Se, Sn e Pb estiveram abaixo dos LOQs obtidos para ICP-MS e ICP OES.

Tabela 37. Resultados ($\mu\text{g g}^{-1}$) para determinação multielementar em derivados de soja por ICP OES após decomposição por MIC e DA-MO (n=3).

Amostra	Ba		Co		Cr		Cu		Mn		Ni		Sr		Zn	
	MIC	DA-MO	MIC	DA-MO	MIC	DA-MO	MIC	DA-MO	MIC	DA-MO	MIC	DA-MO	MIC	DA-MO	MIC	DA-MO
ES1	3,7 ±	3,4 ±	< 0,100	< 0,130	0,42 ±	0,47 ±	14 ± 1	13 ± 1	23 ± 1	24 ± 2	3,3 ±	3,2 ±	6,4 ±	6,3 ±	52 ± 5	53 ± 5
	0,2	0,3			0,02	0,06					0,2	0,3				
FS1	11 ± 1	9,9 ±	< 0,100	< 0,130	0,25 ±	0,21 ±	13,5 ±	12,9 ±	25 ± 4	23 ± 2	2,3 ±	2,14 ±	2,3 ±	2,5 ±	43 ± 5	44 ± 4
		0,4			0,03	0,02					0,5	0,1				
PTS1	3,0 ±	3,4 ±	18 ± 3	20 ± 3	0,8 ±	0,81 ±	11,5 ±	11 ± 2	26 ± 3	25 ± 1	1,5 ±	1,4 ±	4,6 ±	5,3 ±	54 ± 1	54 ± 1
	0,5	0,5			0,1	0,09					0,6					
PTS2	2,32 ±	2,26 ±	22 ± 5	23 ± 1	0,61 ±	0,60 ±	8 ± 1	10 ± 1	29 ± 1	29 ± 2	1,4 ±	1,4 ±	6,6 ±	5,9 ±	58 ± 1	59 ± 1
	0,02	0,06			0,01	0,07										
PTS3	7,9 ±	7,9 ±	22 ± 2	22 ± 4	0,50 ±	0,51 ±	14 ± 2	13 ± 1	28 ± 3	27 ± 3	3,1 ±	2,94 ±	6,4 ±	6,60 ±	50 ± 5	55 ± 2
	0,8	0,2			0,02	0,01										
PTS4	2,18 ±	2,25 ±	39 ± 4	39 ± 8	0,91 ±	0,81 ±	9 ± 1	10 ± 1	27 ± 2	27 ± 3	1,4 ±	1,42 ±	10 ± 2	10,5 ±	56 ± 1	56 ± 7
	0,07	0,08			0,08	0,06										
PTS5	5,60 ±	5,7 ±	10 ± 0,3	11 ± 3	0,45 ±	0,42 ±	12 ± 1	14 ± 0,7	26 ± 2	27 ± 3	2,1 ±	2,1 ±	2,9 ±	2,59 ±	48 ± 2	51 ± 3
	0,03	0,5			0,01	0,03										
PTS6	1,7 ±	1,54 ±	28 ± 4	28 ± 3	0,83 ±	0,84 ±	8,6 ±	8,91 ±	26 ± 3	26,7 ±	1,22 ±	1,22 ±	10,5 ±	10,2 ±	54 ± 4	54 ± 1
	0,2	0,06			0,02	0,06					0,4	0,01				
PTS7	1,9 ±	1,8 ±	110 ± 22	104 ± 17	1,7 ±	1,8 ±	7,8 ±	8,01 ±	25 ± 1	27 ± 2	2,7 ±	3,2 ±	5,8 ±	6,0 ±	51 ± 3	53 ± 3
	0,05	0,3			0,3	0,3					0,8	0,09				
SG1	9,8 ±	10 ± 2	63 ± 11	59 ± 9	1,0 ±	1,12 ±	11 ± 3	12 ± 2	31 ± 2	33 ± 6	3,0 ±	3,1 ±	6,2 ±	7,3 ±	41 ± 4	40 ± 1
	0,8				0,2	0,03										

4.3.2.2 Determinação de halogênios por ICP-MS após decomposição por MIC

O procedimento de decomposição por MIC foi também empregado para posterior determinação de halogênios por ICP-MS. Para esta aplicação, a solução absorvedora utilizada foi NH_4OH a 100 mmol L^{-1} , e os resultados estão mostrados na Tabela 38.

As concentrações de Br e Cl nas amostras estiveram na faixa de 3,0–9,7 e 21,8–55,7 $\mu\text{g g}^{-1}$. As concentrações de Iodo estiveram abaixo do LOQ obtido para a determinação por ICP-MS ($0,006 \mu\text{g g}^{-1}$) exceto para a amostra PTS5, na qual o resultado obtido para a concentração deste elemento correspondeu a $1,23 \pm 0,02 \mu\text{g g}^{-1}$.

Tabela 38. Concentrações de halogênios em amostras de produtos derivados de soja por ICP-MS após digestão por MIC. Resultados em $\mu\text{g g}^{-1}$ (média e desvio padrão para $n=3$).

Amostras	Br	Cl	I
FS1	$3,2 \pm 0,1$	33 ± 2	$< 0,002$
PTS1	$3,0 \pm 0,4$	47 ± 3	$< 0,002$
PTS5	$3,9 \pm 0,4$	45 ± 2	$1,23 \pm 0,02$
PTS7	$5,04 \pm 0,03$	56 ± 7	$< 0,002$
SG1	$9,7 \pm 0,3$	$22 \pm 0,4$	$< 0,002$

A importância da determinação de alguns halogênios em alimentos está associada a aspectos relacionados ao controle de qualidade e à saúde. Na literatura não foram encontradas referências sobre a determinação de halogênios em amostras de soja em grãos e derivados, deste modo o presente trabalho contribui para uma avaliação preliminar, sendo necessária a determinação destes analitos em

uma quantidade maior de amostras, de forma a traçar o perfil, contribuindo assim para a tabela de composição de alimentos.

Nos últimos anos tem sido crescente a pesquisa sobre compostos de bromo em decorrência do aumento da incorporação deste elemento no meio ambiente. Atualmente resíduos de bromo provenientes de fumigação (controle de pragas) de alimentos estão inseridos na cadeia alimentar, essencialmente no que se refere ao cultivo de grãos, frutas e tabaco (NARDA et al., 2001). Este elemento não é considerado essencial, no entanto, pesquisas reportam a utilização de bromo como agente antiepiléptico em alguns tratamentos pediátricos (LYON et al., 2005).

Vobeck e colaboradores (1996) descreveram que este elemento pode interferir no transporte de iodo para a glândula tireoide, o que poderia inibir a função da mesma. De acordo com VAN DOKUM e outros pesquisadores (1989) acredita-se que doses diárias de 8 mg dia^{-1} de bromo sejam adequadas a jovens adultos. Essa dose pode ser alcançada pela ingestão de grãos, nozes, sal do mar, mariscos e pães, sendo estes alimentos conhecidamente fontes importantes de bromo (KOHLMEIER, 2003). As consequências da deficiência de bromo no organismo humano são ainda incertas, no entanto, problemas relacionados à insônia e retardo de crescimento tem sido relatados. Além disso, a ingestão excessiva de bromo pode provocar dores de cabeça, broncoespasmos, distúrbios gastrointestinais, fadiga, dentre outros (KOHLMEIER et al., 2003).

De acordo com os resultados obtidos para as concentrações de bromo no presente trabalho, é possível sugerir que para o atendimento da quantidade diária a ser ingerida para este elemento, faz necessária a ingestão de aproximadamente 2500 g; 2000 g e 800 g das amostras de farinha de soja, proteína texturizada de soja e soja em grãos, respectivamente.

O iodo é um elemento essencial para o crescimento, de modo que este elemento possui bioatividade reconhecida na síntese de hormônios da tireoide (tiroxina, T₄; e triiodotironina) (ROMARÍS-HORTAS et al., 2009). A concentração de iodo nas plantas depende propriamente das espécies, tipos de solos, aplicação de

fertilizantes no solo, e por fim das condições climáticas. Solos que apresentam alto teor de iodo, tendo como exemplo os solos aluviais e argilosos, geralmente produzem plantas ricas em iodo, sendo dependente da forma química da ocorrência de iodo no solo e sua disponibilidade para a planta. Solos derivados de granito apresentam baixos teores de iodo. O estágio de amadurecimento das plantas afeta os níveis de iodo. Estágios avançados promovem a diminuição do conteúdo. Comparando gramíneas e leguminosas no mesmo estágio de amadurecimento, as leguminosas teriam maior conteúdo do que as gramíneas. As plantas oleaginosas e seus subprodutos (óleos e farelos) são fontes pobres em iodo. Tomando como exemplo, podem ser citados os subprodutos da soja, semente de algodão, linhaça e amendoim que contém entre 0,11 e 0,20 ppm de iodo, enquanto que grãos (não-oleaginosas) apresentam uma variação de 0,04 até 0,10 ppm de iodo (BERNADÁ, 2004). A ingestão em excesso deste elemento pode ocasionar sérios problemas patológicos (tireotoxicose). Em adultos, a ingestão diária recomendada para iodo corresponde a 150 – 300 $\mu\text{g dia}^{-1}$ (NAOZUKA et al., 2003). Para as amostras estudadas no presente trabalho, somente foi possível determinar a concentração de iodo ($1,23 \pm 0,02 \mu\text{g g}^{-1}$) na amostra PTS5. Assim, será necessário determinar mais amostras de soja e derivados de forma a traçar um perfil referente a este elemento.

O elemento cloro é um micronutriente não metálico que pode ser encontrado em sua forma livre (Cl_2 , HOCl , OCl^-) ou combinada (NH_2Cl , NHCl_2 , RNHCl). Estudos relatam que o Cl é um micronutriente aniônico essencial na vida vegetal, (BROYER et al., 1954), sendo absorvido por algumas espécies de plantas em quantidades elevadas. A toxicidade de cloro é mais comum do que a deficiência. Soja cultivada em solos que recebem frequentemente altas doses de adubo pode apresentar acúmulo de sais de cloreto e sintomas de toxicidade de cloro: queima das pontas dos folíolos ou da margem, conferindo-lhes cor de bronze, e amarelecimento e queda prematura das folhas. Quando esses sintomas ocorrem, a alta concentração de cloro nos tecidos das folhas é associada com altos teores de manganês, especialmente quando ocorre uma seca antes da floração (ALMEIDA et al., 1994). Nos seres humanos é um dos minerais mais importantes na regulação da pressão osmótica juntamente com o sódio. A deficiência deste elemento causa alcalose metabólica e o excesso do mesmo pode provocar acidose metabólica e cefaleia. O

índice de ingestão diária para este elemento em adultos corresponde a $1,5 \mu\text{g dia}^{-1}$. De acordo com os resultados obtidos para as concentrações de cloro no presente trabalho, é possível sugerir que para o atendimento da quantidade diária a ser ingerida para este elemento, faz necessária a ingestão de aproximadamente 45 mg; 30 mg e 70 mg das amostras de farinha de soja, proteína texturizada de soja e soja em grãos, respectivamente.

4.3.2.3 *Determinação de Hg por FI-HG-ICP-MS após decomposição por MIC*

O mercúrio e seus compostos são considerados poluentes ambientais que podem ser originados de várias fontes. A preocupação maior a respeito da poluição mercurial é decorrente dos efeitos à saúde relacionados à exposição ao mercúrio metilado (metilmercúrio) encontrado na água e alimentos aquáticos. O principal alvo do metilmercúrio é o sistema nervoso central. Este metal é também reconhecidamente um agente teratogênico. No entanto, seus efeitos genotóxicos (ação no DNA) são de difícil interpretação e contraditórios (MICARONI et al., 2000 e CANELA, 1995).

O mercúrio em sua forma natural é originado a partir da degradação da crosta terrestre a partir de vulcões e, provavelmente, pela evaporação dos oceanos. No entanto, as fontes artificiais de mercúrio são mais diversificadas do que as naturais. Alguns compostos de mercúrio têm sido utilizados na agricultura, principalmente como fungicidas (CARDOSO et al., 2000), o que justificaria a presença deste elemento nas amostras avaliadas neste estudo.

As concentrações de Hg nas amostras analisadas foram determinadas por FI-HG-ICP-MS após digestão por MIC e os resultados estiveram abaixo do LOQ do método ($0,003 \mu\text{g g}^{-1}$).

4.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O método de digestão por MIC apresentou resultados adequados para a decomposição das amostras de produtos derivados de soja e boa concordância para o material de referência certificado empregado e com o procedimento convencional empregando digestão ácida assistida por micro-ondas. Além disso, foi possível decompor até oito amostras, simultaneamente, em apenas 25 minutos, utilizando HNO_3 $4,0 \text{ mol L}^{-1}$ e NH_4OH 100 mmol L^{-1} como solução absorvedora, o que é importante para minimização do consumo de reagentes, geração de efluentes e de acordo com os princípios da química verde.

Este método de decomposição foi utilizado para a determinação de Ba, Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Sr e Zn em amostras de produtos de soja incluindo extrato e farinha de soja, proteína texturizada de soja e soja em grãos por ICP OES e ICP-MS. As concentrações dos elementos As, Cd, Sb, Se, Sn e Pb estiveram abaixo dos limites de quantificação do método.

A concentração de Hg foi também avaliada após decomposição das amostras por MIC empregando a técnica FI-HG-ICP-MS, e os resultados estiveram abaixo do LOQ do método.

A possibilidade da determinação de halogênios quando se emprega o procedimento de decomposição por MIC se apresenta como uma alternativa interessante para o monitoramento destes elementos, uma vez que não existem informações na literatura acerca da concentração dos mesmos em amostras de soja em grãos e derivados. No presente trabalho foi possível a determinação de Br, Cl e I em amostras de farinha e proteína texturizada de soja e soja em grãos.

Capítulo V

Determinação de daidzeína e genisteína em amostras de soja em grãos e derivados por HPLC-DAD

CAPÍTULO V

5 DETERMINAÇÃO DE DAIDZEÍNA E GENISTEÍNA EM AMOSTRAS DE SOJA EM GRÃOS E DERIVADOS POR HPLC-DAD

Devido ao seu elevado teor protéico, a soja vem sendo utilizada há muito tempo como alimento, embora também possua em sua composição química alguns compostos polifenólicos como, por exemplo, os isoflavonoides que tem sido relacionados a importantes propriedades biológicas, tais como: atividade antioxidante (ESAKI et al., 1999; NAIM et al., 1974), antiaterogênica (HUI et al., 2001), hipocolesterolêmica (LUI et al., 2003), propriedades estrogênicas, além do potencial anticarcinogênico e inibição da atividade enzimática (ESTEVES; MONTEIRO, 2001). Alguns estudos mais recentes relacionam a soja e as isoflavonas com um efeito favorável na massa óssea de mulheres pós-menopausa.

As isoflavonas, pertencentes à classe dos fitoestrógenos, correspondem ao principal tipo de polifenol presente na soja (ESAKI et al., 1999; ROSTAGNO et al., 2005) e em outras leguminosas (ESTEVES et al., 2001). Existem 12 tipos de isoflavonas, divididas em agliconas, gliconas e seus conjugados glicosídeos malonil e acetil. As isoflavonas livres sem a molécula de açúcar, denominadas agliconas, são consideradas as mais importantes presentes na soja. Entre elas, a daidzeína e a genisteína têm se destacado em virtude do seu maior potencial protetor à saúde humana. Além disso, estes dois flavonoides apresentam-se com teores mais elevados na soja do que as outras isoflavonas de ocorrência conjunta (ESTEVES et al., 2001).

Várias técnicas têm sido utilizadas para a determinação de isoflavonas em amostras de soja e derivados, tais como: cromatografia gás-líquido, cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas e detecção UV (AQUINO NETO; NUNES, 2003).

O grande avanço na eficiência de separação por cromatografia líquida em coluna foi o desenvolvimento e a utilização de suportes com partículas menores e homogêneas que são as responsáveis pela alta eficiência. Deste modo há a necessidade do uso de bombas propulsoras para a eluição da fase móvel, devido a sua baixa permeabilidade, sendo assim, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é uma técnica de separação que, em menos de trinta anos, passou a ser um dos métodos analíticos mais utilizados para fins qualitativos e quantitativos (TONHI et al, 2002). O dispositivo para a HPLC consiste em um sistema de distribuição de solvente, uma válvula de injeção de amostra, uma coluna de alta pressão, um detector e um computador para controlar o sistema e apresentar os resultados. Muitos dispositivos, ainda, incluem um forno para o controle de temperatura da coluna (HARRIS, 2005).

O detector mais utilizado para separações por HPLC é o detector de ultravioleta (atualmente na forma de arranjo de diodos), sendo também empregados detectores de fluorescência, de índice de refração, e eletroquímicos, entre outros (DEGANI et al., 1998).

Em trabalho recente, JUN-MING e colaboradores (2011) utilizaram cromatografia líquida de alta eficiência com detecção UV para identificar a presença de 12 isoflavonas diferentes em amostras de soja. Como fase móvel foi utilizado acetonitrila (13-30%) contendo 0,1% de ácido acético, sendo a coluna utilizada de fase reversa C-18 (YMC-C18) operando a 35°C. A média total do teor de isoflavonas contido nas amostras de soja foi de 2521,56 $\mu\text{g g}^{-1}$ (micrograma de isoflavona por grama de material vegetal seco), sendo o maior valor encontrado igual a 4207,57 $\mu\text{g g}^{-1}$ e o menor valor 945,01 $\mu\text{g g}^{-1}$. O coeficiente de variação foi 18,6%. Sendo que seis isoflavonas foram as principais formas encontradas: daidzeína, genisteína, gliciteína, manolildaidzeína, manoilgliciteína, manoilgenisteína.

Alezandro e colaboradores (2008) determinaram macronutrientes e as isoflavonas daidzeína e genisteína em soja transgênica BRS 243 RR. O preparo da amostra para cromatografia envolveu a remoção da gordura com hexano. Os analitos foram extraídos com etanol 70% acrescido de 0,1% de ácido acético. As

condições cromatográficas otimizadas foram: coluna C18, fase móvel metanol: ácido acético 5% (1:1 (v v⁻¹)), vazão 0,5 mL min⁻¹, temperatura da coluna 30°C, volume de injeção 40 µL e medida em 254 nm. O limite de quantificação encontrado correspondeu a 10 µg g⁻¹ e o limite de detecção a 5 µg g⁻¹ com recuperação de 95,7%. Os níveis de carboidratos (31,4%), proteínas (35,9%), lipídios (20,9%), umidade (6,9%), cinzas (4,9%), daidzeína (44,1 µg g⁻¹) e genisteína (37,4 µg g⁻¹) determinados na soja transgênica foram similares aos de outros estudos com soja convencional.

No presente trabalho foi desenvolvido um método para a determinação das isoflavonas daidzeína e genisteína em amostras de soja em grãos e derivados.

5.1 PARTE EXPERIMENTAL

5.1.1 Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas com reagentes de grau analítico e água ultrapura, com resistividade específica de 18 MΩ cm⁻¹, de um sistema de purificação Millipore (Milli-Q®, Millipore, Bedford, MA, EUA). Todas as vidrarias e frascos foram previamente descontaminados em banho ácido contendo HNO₃ 10% (v v⁻¹), por no mínimo 24 h e lavadas com água desionizada antes do uso.

Padrões analíticos das isoflavonas daidzeína e genisteína (Sigma-Aldrich, 98% pureza) foram empregados para a determinação destas substâncias nas amostras.

Na execução dos trabalhos experimentais, os seguintes reagentes foram utilizados: álcool metílico (Merck, Alemanha), acetonitrila (Merck, Alemanha) e ácido acético (Merck, Alemanha).

5.1.2 Amostras

Neste estudo foram avaliadas as amostras de soja em grãos convencional (SG1, SG2, SG3 e SG4), soja em grãos transgênica (SGT1 e SGT2) e proteína texturizada de soja (PTS8, PTS9, PTS10 e PTS11) (Tabela 25) comercializadas/cultivadas nas cidades de Salvador e Barreiras na Bahia e em Uberlândia em Minas Gerais.

5.1.3 Instrumentação

5.1.3.1 Procedimentos de extração

Para os procedimentos de extração foram usados os equipamentos:

- 1) Evaporador rotativo, com banho de aquecimento com circuito de segurança ajustável, (IKA®, RV-10 Digital).
- 2) Equipamento para extração acelerada com solvente ASE 100™ (Dionex).

5.1.3.2 Determinação dos analitos

O equipamento empregado para a determinação das isoflavonas foi o Cromatógrafo a Líquidos Dionex UltiMate 3000, bomba quaternária LPG-3400SD, auto-injetor com forno ACC-3000 e detector de arranjo de diodos VWD-3100 (190 a 400 nm).

5.2 ESTRATÉGIAS DE PREPARO DAS AMOSTRAS

As amostras de soja em grãos e derivados foram previamente moídas em moinho de bolas (modelo 8000 M, *Spex Sample Prep*, USA), antes da execução de procedimentos de extração para a posterior determinação das isoflavonas daidzeína e genisteína.

5.2.1 Preparação dos extratos

A amostra de soja em grãos (SG1) foi selecionada para avaliação do melhor procedimento de extração das isoflavonas considerando dois procedimentos: procedimento de extração por maceração (PEM) e procedimento de extração acelerada com solvente (PEAS).

5.2.1.1 *Procedimento de extração por maceração (PEM)*

Foram pesados 5,00 g da amostra moída e preparado o extrato por maceração com metanol, seguido de concentração à pressão reduzida com evaporador rotativo. O procedimento foi realizado em triplicata.

5.2.1.2 Procedimento de extração acelerada com solvente (PEAS)

Este procedimento de extração é realizado considerando a influência da temperatura e pressão no processo. A temperatura pode estar acima do ponto de ebulição do solvente, no entanto, a pressão no interior da célula deverá ser suficientemente elevada para manter o solvente no estado líquido. O aumento da temperatura leva ao aumento da solubilidade e da difusão dos analitos, enfraquecendo e/ou rompendo a interação dos mesmos com a matriz, diminuindo a viscosidade e a tensão superficial do solvente, promovendo uma maior penetração do solvente nos poros da amostra (FREITAS, 2007).

Neste trabalho, utilizou-se o equipamento de extração acelerada com solvente ASE 100™, da empresa Dionex, mostrado na Figura 8. Foram utilizadas células extratoras de aço inoxidável com capacidade de 34 mL, frasco de lavagem (*rinse*) e frascos coletores de vidro com capacidade de 250 mL. O processo de extração, utilizando este equipamento, ocorre em diferentes etapas até a coleta final do extrato conforme descrição na Figura 9. As condições utilizadas para o procedimento PEAS foram: 5,0 gramas de amostra, 3 ciclos de 5 minutos de extração a 60°C ou 80°C (o valor ótimo de temperatura foi avaliado) e com 100% de *flush*.



Figura 8. Equipamento de extração acelerada com solvente, Dionex (ASE 100™).

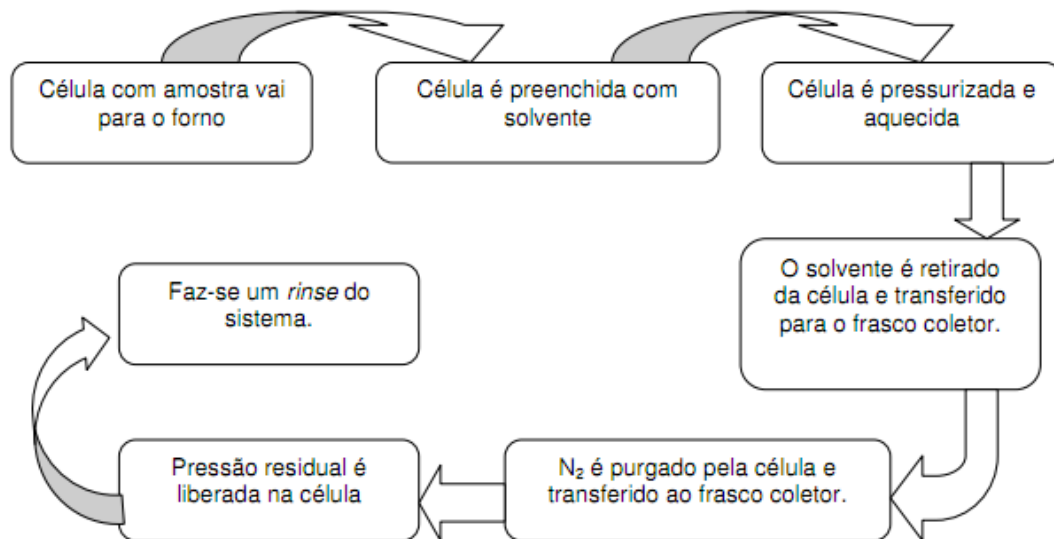


Figura 9. Esquema do procedimento de extração acelerada com solvente.

Fonte: FREITAS, 2007

5.2.2 Otimização das condições da análise cromatográfica por HPLC-DAD

No intuito de se definir as melhores condições para a execução da análise cromatográfica foram avaliados diversos parâmetros, tomando como base o estudo anterior realizado por Delmonte e colaboradores (2006), no qual foi feita a determinação de isoflavonas em amostras de suplementos alimentares à base de soja. As condições de análise estudadas foram: coluna Waters NovaPack® C18 de 4 μm (150 x 3,9 mm²); fase móvel constituída de mistura de dois solventes – (A) 0,1% de ácido acético em água e (B) 0,1% de ácido acético em acetonitrila, em diferentes gradientes. A vazão da fase móvel foi de 1,0 mL min⁻¹, volume de injeção de 5,0 μL , tempo total de corrida de 100 minutos e detecção em comprimento de onda de 260 nm.

Na execução do processo de otimização das condições cromatográficas deste trabalho, foram testadas inicialmente as condições acima citadas utilizando coluna Dionex® de 3 µm (75 x 3,0 mm²) e coluna Shimadzu® de 5 µm (150 x 2,0 mm²).

5.2.3 Validação do método analítico

O método analítico foi validado, para os padrões de daidzeína e genisteína de acordo com os critérios de: seletividade, linearidade, precisão e limite de detecção e quantificação (BRASIL, 2003 e INMETRO, 2003).

A seletividade foi determinada por meio da comparação de picos dos padrões amostras, considerando o tempo de retenção e a análise de similaridade dos espectros no ultravioleta.

A linearidade foi determinada pelas curvas de calibração, tomando como parâmetro o coeficiente de correlação (r). Estas curvas foram construídas após injeções em triplicata de soluções em diferentes concentrações dos padrões externos.

A precisão foi determinada pela injeção em triplicata de três soluções dos padrões das isoflavonas. Esse parâmetro foi expresso como coeficiente de variação (CV%) e calculado através da fórmula:

$$CV\% = \frac{dp}{x} \cdot 100 \quad (\text{Eq. 5})$$

Onde “dp” corresponde ao desvio padrão e “x” à concentração média calculada.

O limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) foram estimados pela relação entre os valores do desvio padrão (DP_{branco}) obtido para dez injeções

sucessivas da solução branco e a inclinação da curva de calibração (a), segundo as fórmulas:

$$LOD = \frac{3 \times DP_{branco}}{a} \times 100 \quad (\text{Eq. 6})$$

$$LOQ = \frac{10 \times DP_{branco}}{a} \times 100 \quad (\text{Eq. 7})$$

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A seguir são apresentados os resultados para a determinação das isoflavonas daidzeína e genisteína em amostras de soja em grãos e derivados considerando as etapas de otimização dos procedimentos de extração e das condições da análise cromatográfica para posterior aplicação do método otimizado.

5.3.1 Otimização das condições da análise cromatográfica por HPLC-DAD

Foram utilizados padrões analíticos das isoflavonas daidzeína e genisteína para otimização das condições da análise cromatográfica para a posterior separação e determinação destas isoflavonas em amostras de soja em grãos e derivados. Os estudos iniciais foram efetuados tomando como referência o método descrito por Delmonte e colaboradores (2006). A primeira avaliação consistiu na utilização de uma coluna Dionex® de 3 μm (75 x 3,0 mm²), considerando ajustes na vazão da fase móvel, sendo definido o valor 1,05 mL min⁻¹ para um volume de injeção de 5,00

μL , fazendo uso de eluição por gradiente testando diferentes proporções dos solventes: metanol, ácido acético aquoso a 0,1% e ácido acético a 0,1% em acetonitrila. Constatou-se que o tempo total de corrida se mostrou demasiadamente longo (35 min.) e também foi notável a assimetria dos picos pela observação de distorções posteriores (caudas) nos mesmos, para os padrões de daidzeína e genisteína, como mostrado na Figura 10.

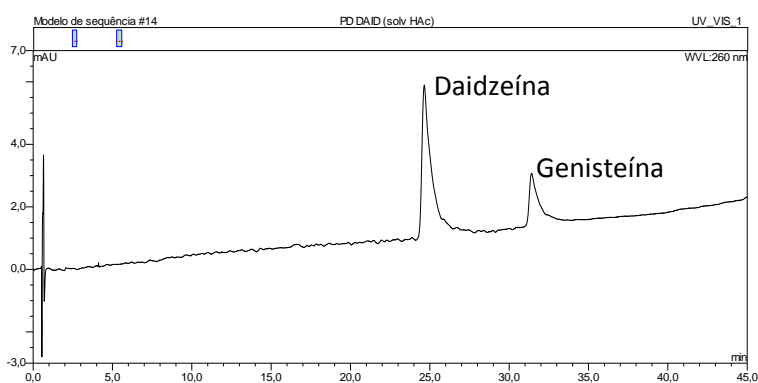


Figura 10. Cromatograma obtido para separação de daidzeína e genisteína nas condições iniciais estudadas.

Com o intuito de melhorar a resolução e definir as condições ótimas para a execução da análise, foram realizadas modificações no tipo de eluição, fase móvel, vazão, volume de injeção e coluna.

Inicialmente foi testada a eluição isocrática em detrimento da eluição por gradiente. Na eluição isocrática, a força cromatográfica da fase móvel permanece constante durante toda a separação. Como vantagens associadas a este tipo de eluição podem ser citadas: simplicidade, conveniência, repetitividade das análises, menor gasto de volume de solvente e menores custos (COLLINS, BRAGA e BONATO, 2006). Também foram testadas diferentes proporções dos solventes: metanol e ácido acético aquoso a 0,1%, assim como variações no volume de injeção e vazão da fase móvel. A Figura 11 mostra um cromatograma obtido durante a

avaliação destes parâmetros, onde podem ser constatadas distorções posteriores (caudas) e alargamento dos picos, além da observação que os tempos de retenção para os picos dos padrões estão muito próximos ao tempo de retenção para a frente de solvente.

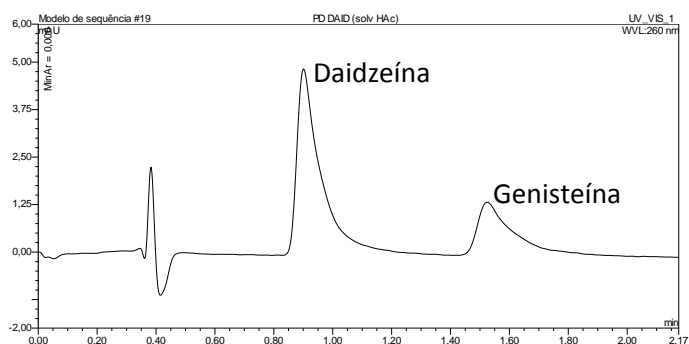


Figura 11. Cromatograma obtido para separação de daidzeína e genisteína durante a otimização.

Foi testada então outra coluna (Shimadzu® de 5 μm (150 x 2,0 mm^2)) de maior comprimento na tentativa de otimizar as condições da análise. Foram utilizadas diferentes proporções dos solventes: acetonitrila e ácido acético a 0,1% em acetonitrila com eluição isocrática. Também foram avaliados diferentes valores para vazão da fase móvel e do volume de injeção.

A Figura 12 mostra o cromatograma obtido para as condições ótimas de análise: coluna Shimadzu® de 5 μm (150 x 2,0 mm^2); fase móvel constituída de mistura de dois solventes – (A) acetonitrila e (B) 0,1% de ácido acético em acetonitrila com eluição isocrática nas proporções 30% de A e 70% de B. A vazão da fase móvel foi de 0,8 mL min^{-1} , volume de injeção de 5,0 μL , tempo total de corrida de 10 minutos e detecção nos comprimentos de onda de 250 e 260 nm para daidzeína e genisteína, respectivamente. Pode-se inferir que foi obtida boa separação e resolução das isoflavonas, redução significativa do tempo de corrida de 35 minutos para 10 minutos aumentando a frequência analítica e reduzindo o gasto em solventes.

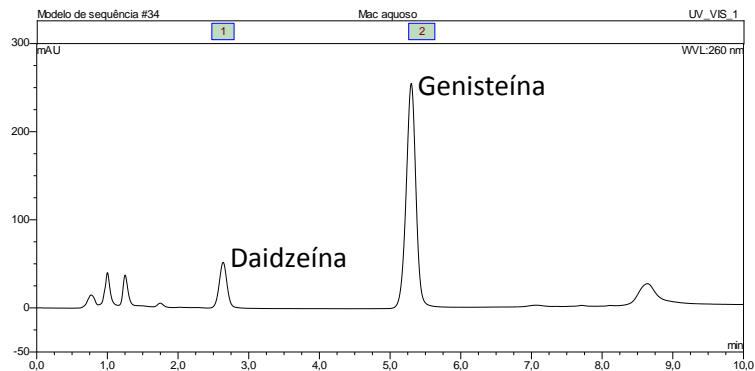


Figura 12. Cromatograma obtido para separação de daidzeína e genisteína para as condições ótimas de análise.

5.3.2 Otimização dos procedimentos de extração PEM e PEAS

Foram avaliados dois procedimentos extrativos, PEM e PEAS, para a extração das isoflavonas daidzeína e genisteína na amostra de soja em grãos (SG1) para posterior separação e determinação por HPLC-DAD. O parâmetro avaliado para a escolha do procedimento de extração mais adequado corresponde ao valor de concentração obtido para as isoflavonas estudadas neste trabalho. Estes valores estão mostrados na Tabela 39.

Tabela 39. Concentrações ($\mu\text{g g}^{-1}$) de daidzeína e genisteína em amostra de soja em grãos (SG1) para os procedimentos de extração PEM e PEAS.

Procedimento de Extração	Daidzeína ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Genisteína ($\mu\text{g g}^{-1}$)
PEM	15,13 \pm 0,09	18,86 \pm 0,05
PEAS (60°C)	21,790 \pm 0,001	27,42 \pm 0,08
PEAS (80°C)	16 \pm 1	21,16 \pm 0,06

De acordo com os resultados obtidos, foi possível constatar que as maiores concentrações para daidzeína e genisteína foram encontradas para o procedimento de extração PEAS, com a temperatura de 60°C, que foi selecionada para os estudos subsequentes.

5.3.3 Validação do método analítico

5.3.3.1 Seletividade / Especificidade

Para a avaliação da seletividade do método, foram avaliados os parâmetros: tempo de retenção (TR) dos padrões, de modo que os valores obtidos para estes foram comparados aos obtidos para a amostra (SG1) e análise de similaridade dos espectros no ultravioleta para os padrões utilizados.

Os valores de TR para os padrões de daidzeína e genisteína corresponderam a 2,58 e 5,26 min, enquanto que para a amostra SG1 estes valores corresponderam a 2,84 e 5,57 para daidzeína e genisteína, respectivamente. Os valores de TR se apresentaram coincidentes considerando os valores obtidos para padrão e amostra. As diferenças encontradas para os valores de TR, considerando padrões e amostra,

podem ser atribuídas ao efeito de matriz, pelo qual ocorrem interferências causadas pela presença de outras substâncias nas amostras.

Para a análise de similaridade dos espectros no ultravioleta foram considerados os gráficos mostrados nas Figuras 13 e 14.

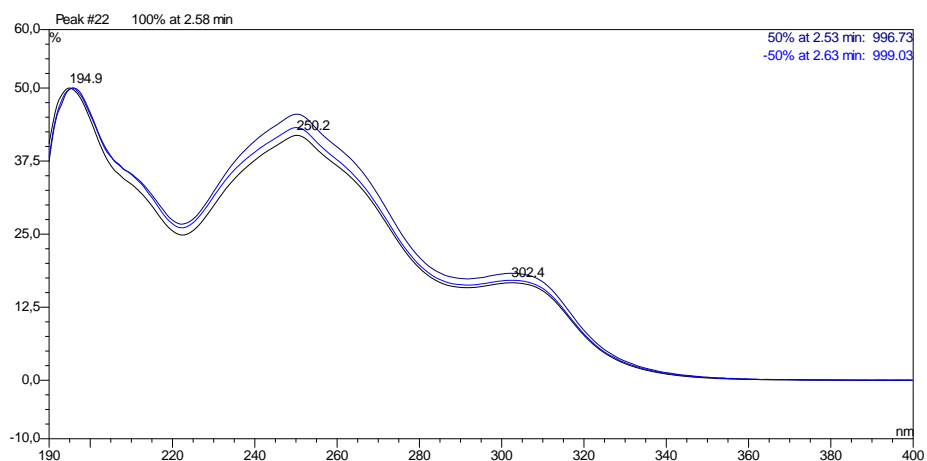


Figura 13. Espectros no ultravioleta para a daidzeína.

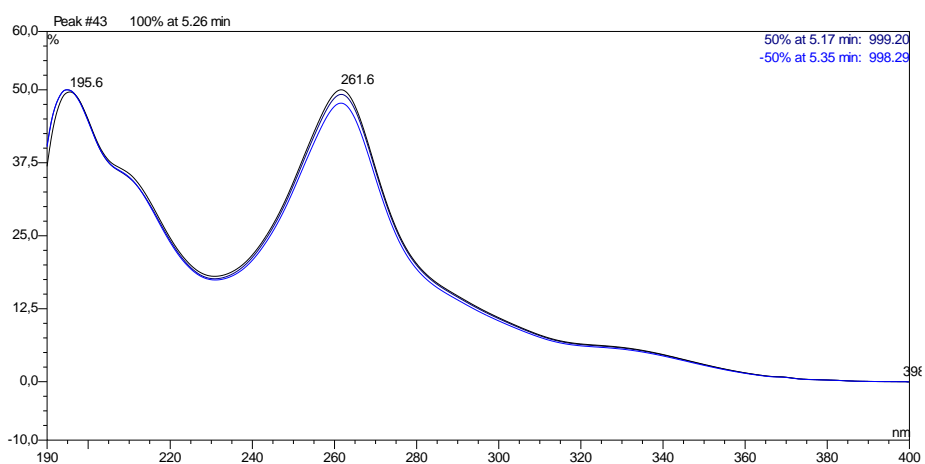


Figura 14. Espectros no ultravioleta para a genisteína.

Em cada um dos gráficos, estão contidos três espectros na região do UV que se mostraram coincidentes, uma vez que foram correspondentes no início, meio e final do pico obtido para cada padrão de isoflavona. Deste modo, foi possível concluir que somente a isoflavona específica foi eluída no intervalo de tempo correspondente ao pico cromatográfico.

Os resultados obtidos para os parâmetros tempo de retenção e similaridade de espectros, confirmam, portanto, a seletividade do método.

5.3.3.2 *Linearidade*

A linearidade das curvas analíticas para os padrões de daidzeína e genisteína foi avaliada com soluções com diferentes concentrações dos analitos. Foram preparadas cinco soluções de referência entre 10,0 e 100,0 (mg L⁻¹) para as isoflavonas daidzeína e genisteína. Os valores obtidos para as áreas dos picos (expressas em mAu) foram plotadas como valores médios das injeções em triplicata. As curvas analíticas obtidas para os padrões das isoflavonas bem como seus coeficientes de correlação (r) estão apresentados na Tabela 40 e nas Figuras 15 e 16. Os cálculos da regressão linear confirmam que os resultados são diretamente proporcionais à concentração e apresentam boa linearidade ($r > 0,999$, RIBANI et al, 2004) para as isoflavonas estudadas considerando a faixa de concentração testada.

Tabela 40. Equações referentes às curvas analíticas e valores de coeficientes de correlação para as isoflavonas de interesse.

Padrão da Isoflavona	Equação	Coef. de correlação (r)
Daidzeína	$y = 0,224x + 2,8858$	0,9997
Genisteína	$y = 1,9759x - 9,6741$	0,9995

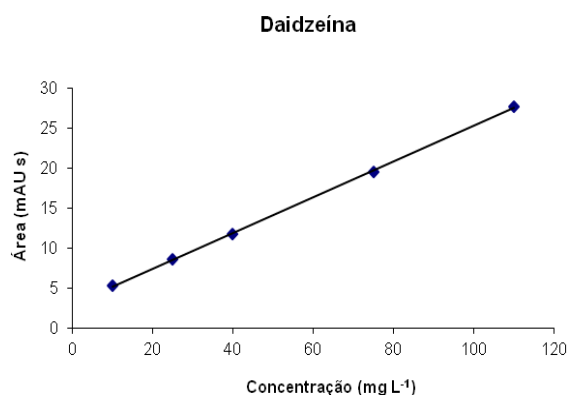


Figura 15. Curva analítica para a daidzeína.

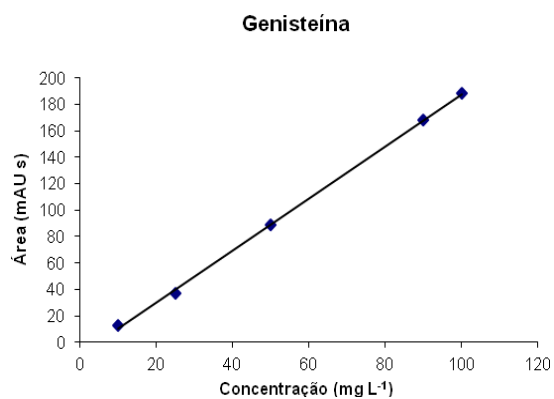


Figura 16. Curva analítica para a genisteína.

5.3.3.3 Precisão

Para a avaliação da precisão do método desenvolvido o parâmetro considerado foi a repetibilidade (BRASIL, 2003). Foram efetuadas três injeções sucessivas dos padrões de daidzeína e genisteína em três diferentes concentrações e foi calculada a média dos valores correspondentes às áreas dos picos e os respectivos desvios padrão para o cálculo do coeficiente de variação para as injeções. Os resultados estão mostrados na Tabela 41.

Tabela 41. Resultados para a precisão do método.

Padrão	Concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CV%
Daidzeína	10,0	4,7
	75,0	2,1
	100,0	3,4
Genisteína	10,0	2,4
	50,0	1,5
	100,0	3,7

Os valores de CV% encontrados para os três níveis de concentração avaliados foram inferiores a 5% o que está de acordo o limite estabelecido pela ANVISA, de modo que o maior valor encontrado correspondeu a 4,7% para a concentração de 10 mg L^{-1} em daidzeína enquanto que o menor valor encontrado correspondeu a 1,5% para a concentração de $75,0 \text{ mg L}^{-1}$ em genisteína.

5.3.3.4 Limites de Detecção e Limites de Quantificação

Os valores de LOD e LOQ obtidos para o método estão mostrados na Tabela 42.

Tabela 42. Limites de detecção e quantificação obtidos para daidzeína e genisteína.

Isoflavona	LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Daidzeína	0,46	1,54
Genisteína	0,61	2,04

De acordo com os valores de LOD e LOQ obtidos para o método é possível inferir sobre a boa sensibilidade apresentada considerando a detecção e quantificação das isoflavonas daidzeína e genisteína. Os limites de detecção e quantificação para a daidzeína foram inferiores em comparação aos obtidos para a genisteína, provavelmente em função da absorvidade molar para a daidzeína (para $\lambda_{\text{máx}} = 250 \text{ nm}$) ser maior que a absorvidade molar (para $\lambda_{\text{máx}} = 260 \text{ nm}$) para a genisteína, considerando os respectivos valores de comprimento de onda de máxima absorção ($\lambda_{\text{máx}}$) para cada analito.

5.3.4 Determinação das concentrações de daidzeína e genisteína em amostras de soja em grãos e derivados

O método foi aplicado para a determinação de daidzeína e genisteína em dez amostras de soja em grãos e derivados considerando o procedimento de extração

selecionado (PEAS) e as condições cromatográficas estabelecidas após a otimização. Os resultados estão mostrados na Tabela 43.

A ordem de eluição foi confirmada pela análise das soluções padrão individuais de cada isoflavona. A separação ocorreu com prévia programação da corrida por um tempo máximo de 10 minutos. Os espectros de UV das isoflavonas foram registrados em 250 e 260 nm, para daidzeína e genisteína respectivamente, através de detector de arranjo de diodos.

A identificação das isoflavonas estudadas foi efetuada pela caracterização dos picos da amostra em termos de tempo de retenção (TR) e comparação entre os espectros de UV. Este TR foi comparado com os valores de TR obtidos para as soluções de referência dos analitos. As concentrações dos analitos, expressas em $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram obtidas através da relação entre a média das áreas de cada pico e a curva analítica correspondente aos padrões de daidzeína e genisteína. A partir de então foram calculados os teores das isoflavonas expressos em μg do analito por g de material vegetal seco ($\mu\text{g g}^{-1}$).

Tabela 43. Valores de concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$) de daidzeína e genisteína para amostras de soja em grãos e derivados.

Amostras		Daidzeína ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Genisteína ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Proteína Texturizada de Soja	PTS8	9,2 ± 0,2	20,6 ± 0,1
	PTS9	10,3 ± 0,9	24,7 ± 0,2
	PTS10	11,8 ± 0,2	25,3 ± 0,1
	PTS11	< LOQ	77,8 ± 0,1
Soja em Grãos	SG1	21,790 ± 0,001	27,42 ± 0,08
	SG2	8,8 ± 0,1	18,53 ± 0,06
	SG3	12,7 ± 0,6	32,7 ± 0,3
	SG4	34 ± 6	35,5 ± 0,1
Soja em Grãos Transgênica	SGT1	11,8 ± 0,1	35,5 ± 0,2
	SGT2	44,02 ± 0,05	55,03 ± 0,01

A determinação do teor de isoflavonas em soja tem sido estudada com frequência em diversos trabalhos de pesquisa ao redor do mundo. Os autores, de modo geral, concluem que as concentrações destes flavonoides variam de acordo com as condições ambientais e com as diferentes cultivares, definindo a existência de interação entre genótipo e ambiente no que se refere a estes teores em sementes de soja (ÁVILA e ALBRECHT, 2010).

Os primeiros estudos sobre as variações foram realizados em 1983 (ELDRIDGE e KWOLEK, 1983) onde foi relacionada a variação na concentração de isoflavonas em função dos aspectos: cultivares, local e ano de semeadura. Em trabalho posterior (WANG e MURPHY, 1994) foi avaliada esta mesma tendência para cultivares americanas e japonesas. Para cultivares brasileiras, foi avaliada esta mesma tendência (CARRÃO-PANIZZI et al., 1998) e Ávila (ÁVILA, 2006).

De acordo com os relatos dos diversos trabalhos descritos até então, as concentrações de isoflavonas na soja podem variar em até três vezes de acordo com fatores genéticos e as condições ambientais de cultivo (temperatura e umidade) além da parte morfológica de onde é extraída a semente. Num estudo prévio (ELDRIDGE e KWOLEK, 1983) isolaram a quantidade de isoflavonas no embrião (hipocótilo) em quantidades até cem vezes maiores que no cotilédone. No entanto, o cotilédone corresponde a 90% da semente de soja e o hipocótilo a apenas 2%. Este fato sugere que estas isoflavonas em maior quantidade no embrião podem estar atuando na proteção da futura planta através de sua propriedade antioxidante (ÁVILA e ALBRECHT, 2010). A capacidade antioxidante das isoflavonas segue a ordem: genisteína > daidzeína > genistina > daidzina, ou seja, está associada ao número de hidroxilas livres do anel A (Figura 17), (RUIZ-LARREA et al., 1997).

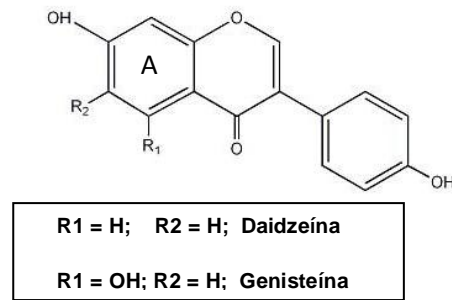


Figura 17. Estrutura geral para as isoflavonas daidzeína e genisteína.

Esta atividade antioxidante está associada ao seqüestro de radicais livres, sendo, portanto, dependente da estrutura da isoflavona e pode ser relacionada à cinco fatores: reatividade como agente doador de H e elétrons, estabilidade do radical flavanoil formado, reatividade frente a outros antioxidantes, capacidade de quelar metais de transição e solubilidade e interação com as membranas (BARREIROS e DAVID, 2006).

Analisando os resultados obtidos para as concentrações de daidzeína e genisteína no presente trabalho, pode se constatar que em todas as amostras foi possível quantificar estas isoflavonas com exceção da amostra PTS11, na qual a concentração de daidzeína esteve abaixo do limite de quantificação do método. O maior valor de concentração encontrado para a daidzeína foi observado na amostra SGT2 ($44,02 \pm 0,05 \mu\text{g g}^{-1}$) que corresponde a uma amostra de soja transgênica em grãos cultivada no estado de Minas Gerais, a soja *Round up Ready* (RR), cuja transgenia está associada à resistência ao herbicida glifosato. Uma amostra de soja em grãos transgênica (SGT1) cultivada no estado da Bahia também foi analisada e a concentração de daidzeína para esta amostra ($11,8 \pm 0,1 \mu\text{g g}^{-1}$) diferiu com relação à concentração encontrada na amostra SGT2, sugerindo que as diferenças entre estas concentrações e o perfil de distribuição está associado a aspectos como: cultivar, local de plantio, tipo de solo, efeitos do ambiente, ano de safra, além da própria variabilidade genética inerente à cada planta (LUI et al., 2003). Do mesmo modo, o maior teor para genisteína foi obtido para a amostra SGT2 ($55,03 \pm 0,01 \mu\text{g g}^{-1}$), valor este que foi superior ao obtido para a concentração desta isoflavona na

amostra SGT1 ($35,5 \pm 0,2 \mu\text{g g}^{-1}$). Estes valores estão de acordo com os valores encontrados para estas isoflavonas em amostra de soja em grãos transgênica (ALEZANDRO et al., 2008): daidzeína ($44,1 \mu\text{g g}^{-1}$) e genisteína ($37,4 \mu\text{g g}^{-1}$).

As amostras SG4 e SGT1 correspondem a amostras de soja em grãos convencional e soja em grãos transgênica cultivadas na cidade de Barreiras, Bahia. Foi possível constatar (Tabela 43) que a concentração encontrada para daidzeína na amostra SGT1 ($11,8 \pm 0,1 \mu\text{g g}^{-1}$) foi inferior à concentração obtida para SG4 ($34 \pm 6 \mu\text{g g}^{-1}$). De acordo com o Princípio da Equivalência Substancial, o alimento geneticamente modificado é seguro caso não possua diferença aparente entre ele e o alimento convencional (ALEZANDRO et al., 2008). Sabe-se que a soja em grãos resistente ao herbicida conhecido como glifosato corresponde a aproximadamente 76 % da área cultivada com transgênicos no Brasil (ISAAA, 2009). A aplicação deste herbicida altera significativamente a composição química desta leguminosa, essencialmente no que se refere ao teor de macronutrientes e de compostos fenólicos a exemplo das isoflavonas (MILLSTONE, BRUNNER e MAYER, 2006), de modo que a aplicação de glifosato na soja transgênica é superior com relação à aplicação na soja convencional, o que pode sugerir a diferença encontrada para o teor de daidzeína entre as amostras SG4 e SGT1.

Para as amostras de soja em grãos (SG1 – SG4) as concentrações de daidzeína e genisteína estiveram na faixa de 8,8 a $34 \mu\text{g g}^{-1}$ e 18,53 a $35,5 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente. Em um estudo prévio (BARBOSA, et al., 2006), foram determinadas as concentrações de daidzeína (39 ± 1) e genisteína (54 ± 1) numa amostra de soja em grãos e os resultados se apresentaram similares aos obtidos no presente estudo. Um método de extração por dispersão de matriz em fase sólida (DMFS) com separação por HPLC foi utilizado para determinação do teor de daidzeína e genisteína em amostras de soja em grãos (BARFI et al. 2009). Os valores médios obtidos para as concentrações das isoflavonas corresponderam a $39,1 \pm 7,4$ e $103,3 \pm 6,5 \mu\text{g g}^{-1}$ para daidzeína e genisteína, respectivamente. Estes resultados foram comparáveis aos resultados obtidos no presente trabalho essencialmente para a daidzeína.

Para as amostras de proteína texturizada de soja (PTS8 – PTS11) as concentrações de daidzeína e genisteína estiveram na faixa de <LOQ a 11,8 $\mu\text{g g}^{-1}$ e 20,6 a 77,8 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente. Em estudo previamente realizado (BARBOSA et al., 2006) foram determinadas as concentrações de daidzeína (38 ± 1) e genisteína (53 ± 1) numa amostra de soja em grãos e os resultados se apresentaram similares aos obtidos no presente estudo.

A Figura 18 mostra o cromatograma referente à determinação de daidzeína e genisteína na amostra de soja em grãos (SG1).

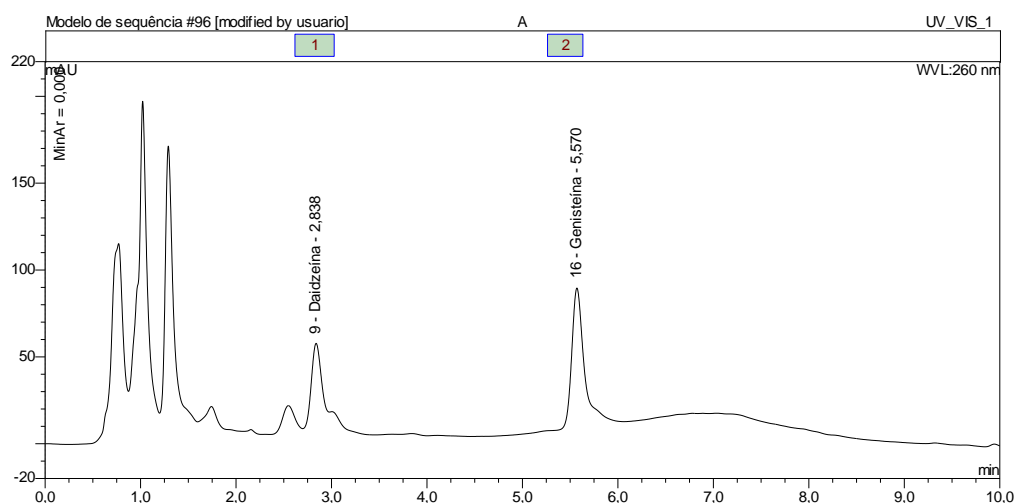


Figura 18. Cromatograma referente à determinação de daidzeína e genisteína na amostra SG1.

Tomando para análise os espectros de UV de alguns picos não identificados no cromatograma acima, podem ser constatadas bandas características de absorção para isoflavonas para alguns picos (Figuras 19 a 22). Desta forma pode-se sugerir que estes picos podem ser correspondentes a outras isoflavonas não contempladas no presente trabalho.

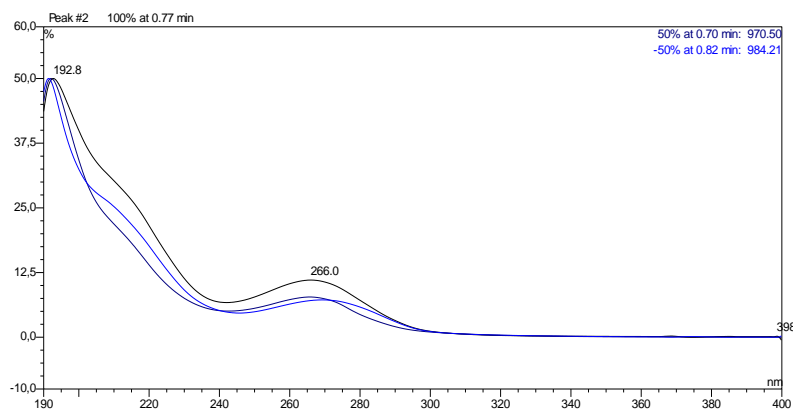


Figura 19. Espectro no UV para pico não identificado no tempo de retenção 0,77 min.

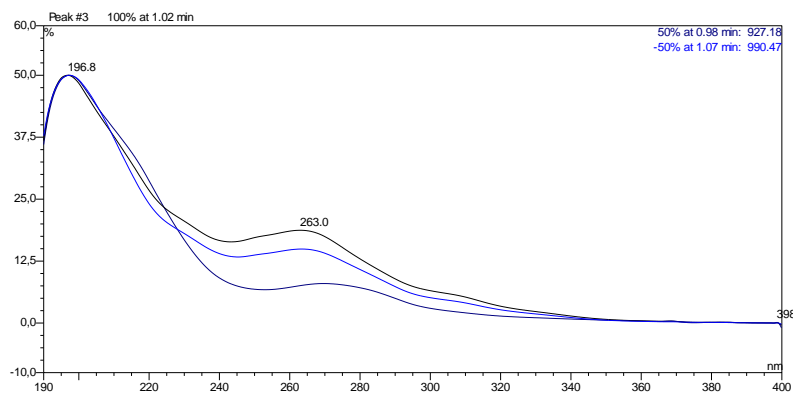


Figura 20. Espectro no UV para pico não identificado no tempo de retenção 1,02 min.

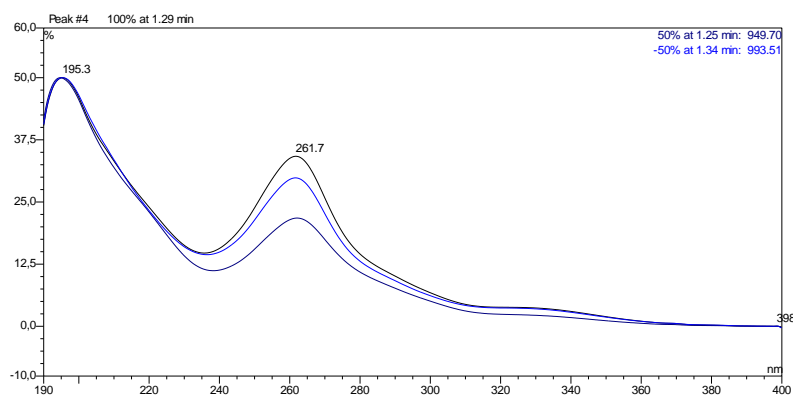


Figura 21. Espectro no UV para pico não identificado no tempo de retenção 1,29 min.

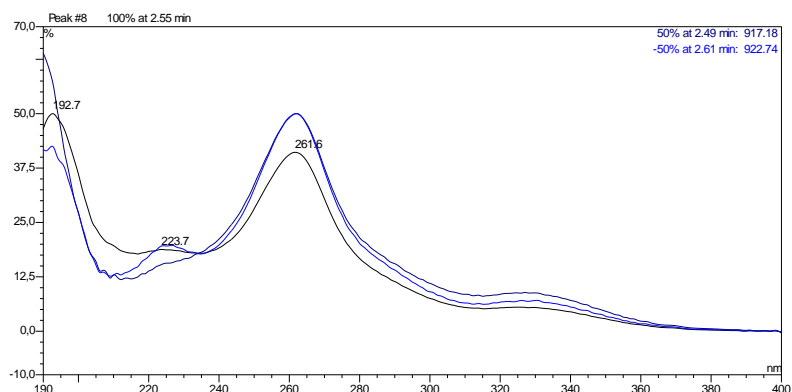


Figura 22. Espectro no UV para pico não identificado no tempo de retenção 2,55 min.

5.4 AVALIAÇÃO COMPARATIVA ENTRE A COMPOSIÇÃO MULTIELEMENTAR E OS TEORES DE DAIDZEÍNA E GENISTEÍNA NAS AMOSTRAS ESTUDADAS

Com o objetivo de sugerir correlações entre os teores de alguns micronutrientes (Cu, Fe, Mn e Zn) e os teores das isoflavonas daidzeína e genisteína foram calculados valores de coeficiente de correlação de Pearson para as amostras de soja em grãos (SG1 – SG4) e proteína texturizada de soja (PTS8 – PTS11).

A correlação é uma medida de associação entre duas variáveis. Quando existe correlação, os valores ao longo das variáveis estão relacionados entre si de forma que uma variável proporciona informações sobre a outra (RAMOS e ÁLVAREZ-COQUE, 2001). A associação entre variáveis é estimada através da covariância e do coeficiente linear de Pearson (r). Este coeficiente de correlação varia de -1 (relação perfeitamente inversa entre as duas variáveis) a +1 (relação perfeitamente direta entre as duas variáveis). Segundo Schmidt (SCHMIDT et al., 1975), o coeficiente de correlação pode ser classificado em cinco categorias de acordo com seu valor numérico: desprezível (0,00 a 0,29); baixo (0,30 a 0,49); moderado (0,50 a 0,79); alto (0,80 a 0,99) e perfeito (1,00). Essencialmente, valores de coeficiente de correlação superiores a 0,80 elucidam que a reta é representativa para as variáveis consideradas (VANNI et al., 1998).

Considerando que nessas circunstâncias podem ser obtidos valores de r de 0,00 a 1, se faz necessária a comprovação estatística adequada para se constatar que o valor para o coeficiente de correlação é realmente significativo, considerando o número de pares de valores usados em seu cálculo (RAMOS e ÁLVAREZ-COQUE, 2001). O método mais simples consiste no cálculo de um valor de t utilizando a equação (MILLER e MILLER, 1998):

$$t = \frac{|r|\sqrt{(n-2)}}{\sqrt{(1-r^2)}} \quad (\text{Eq. 8})$$

O valor calculado de t é comparado ao valor tabelado ao nível de 95% de confiança para $(n - 2)$ graus de liberdade. Neste caso, a hipótese nula é que não existe correlação entre as variáveis. Se o valor de t calculado é maior que o valor tabelado a hipótese nula é rejeitada, e pode-se concluir que existe uma correlação significativa.

Os valores obtidos para os coeficientes de correlação de Pearson estão mostrados nas Tabelas 44 e 45 para as amostras de soja em grãos e proteína texturizada de soja, respectivamente.

Tabela 44. Correlação linear de Pearson (r) para Cu, Fe, Mn, Zn, daidzeína e genisteína para amostras de soja em grãos ($n=4$).

	Cu	Fe	Mn	Zn	daidzeína	genisteína
Cu	1	0,88	0,85	0,37	-0,36	-0,86
Fe		1	0,49	0,10	-0,48	-0,97
Mn			1	0,49	-0,19	-0,51
Zn				1	0,72	0,10
daidzeína					1	0,68
genisteína						1

Tabela 45. Correlação linear de Pearson (*r*) para Cu, Fe, Mn, Zn, daidzeína e genisteína para amostras de proteína texturizada de soja (n=4).

	Cu	Fe	Mn	Zn	daidzeína	genisteína
Cu	1	0,43	0,51	0,35	-0,68	0,64
Fe		1	0,29	-0,69	0,27	-0,14
Mn			1	0,07	-0,63	0,81
Zn				1	-0,80	0,63
daidzeína					1	-0,96
genisteína						1

Analisando as correlações existentes entre os micronutrientes Cu, Fe, Mn e Zn é possível se constatar que estas não foram significativas (<0,51), com exceção para as correlações entre Cu e Fe (0,88); e Cu e Mn (0,85) para as amostras de soja em grãos.

Para a correlação entre as isoflavonas daidzeína e genisteína foi possível se constatar uma correlação moderada (0,68) para as amostras de grãos de soja e correlação alta (-0,96) para as amostras de proteína texturizada de soja. Em trabalho prévio (JUSTEN, 2007), foi estabelecida uma correlação entre as concentrações de daidzeína e genisteína em amostras de soja em grãos, de modo que o valor encontrado para o coeficiente de correlação de Pearson (0,72) foi muito próximo ao encontrado no presente trabalho.

Foram calculados os coeficientes de correlação de Pearson para as correlações existentes entre Cu, Fe, Mn e Zn e as isoflavonas daidzeína e genisteína. Os coeficientes de correlação significativos considerados altos nesta avaliação foram: Cu e genisteína (-0,86) e Fe e genisteína (-0,97) para as amostras de soja em grãos, e Zn e daidzeína (-0,80) e Mn e genisteína (0,81) para as amostras de proteína texturizada de soja.

Os coeficientes de correlação significativos considerados moderados, identificados foram: Zn e daidzeína (0,72) e Mn e genisteína (-0,51) para as amostras de soja em grãos, e Cu e daidzeína (-0,68); Cu e genisteína (0,64); Mn e daidzeína (-0,63) e Zn e genisteína (0,63) para as amostras de proteína texturizada de soja.

5.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foram avaliadas dez amostras de soja em grãos e derivados incluindo extrato, farinha e proteína texturizada de soja para a determinação das isoflavonas daidzeína e genisteína após aplicação do procedimento de extração adequado e otimização do método de análise cromatográfica por HPLC.

A validação do método analítico para identificação e quantificação de daidzeína e genisteína foi efetuada considerando parâmetros importantes como seletividade e precisão.

A técnica de cromatografia a líquidos de alta eficiência permitiu a determinação dos teores de daidzeína e genisteína utilizando detecção por absorvância no ultravioleta e no visível. Os valores de concentração obtidos para as isoflavonas estiveram de acordo com dados da literatura para estes analitos considerando as amostras avaliadas.

Capítulo VI

Conclusões

6 CONCLUSÕES

No presente trabalho foram propostos dois procedimentos de preparo de amostras de soja em grãos e derivados: decomposição assistida por radiação micro-ondas empregando ácido nítrico diluído (PAD) e combustão induzida por micro-ondas (MIC) empregando técnicas espectrométricas (ICP OES e ICP-MS) para detecção dos analitos.

A condição ótima para o sistema PAD consistiu na utilização de HNO_3 (2,1 mol L^{-1}) e H_2O_2 para uma massa de 250 mg usando um programa de aquecimento em forno de micro-ondas com cavidade com temperatura máxima de 210 °C e tempo total de 42 min. O procedimento foi validado sendo possível determinar as concentrações de Ba, Cu, Fe, Mn, Ni, Se, Sr e Zn por ICP OES e As, Cd, Co, Cr, Pb e V por ICP-MS.

O procedimento de decomposição empregando MIC permitiu a decomposição de uma massa de amostra de 400 mg, usando como solução absorvedora HNO_3 a 6,0 mol L^{-1} para a determinação de Ba, Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Sr e Zn por ICP OES e ICP-MS. Para todas as amostras, as concentrações de As, Cd, Hg, Sb, Se, Sn e Pb estiveram abaixo dos LOQs obtidos para o método. Para a determinação dos halogênios Cl, Br e I, foi utilizada como solução absorvedora NH_4OH a 100 mmol L^{-1} . A exatidão do procedimento foi avaliada empregando material de referência certificado não sendo constatadas diferenças significativas entre os resultados.

Estes procedimentos se mostraram adequados para a determinação multielementar nas amostras sendo considerados alternativas promissoras, devido à minimização do consumo de reagentes e de geração de efluentes, de acordo com os princípios da química verde.

Foi também proposto um procedimento para a determinação das isoflavonas daidzeína e genisteína nas amostras estudadas empregando a técnica HPLC-DAD. Para a obtenção dos extratos destas isoflavonas foi utilizada extração acelerada

com metanol como solvente para posterior separação e detecção destes analitos na análise cromatográfica, fazendo uso dos solventes acetonitrila e ácido acético em eluição isocrática. O método foi validado, sendo possível a identificação e quantificação de daidzeína e genisteína.

Como perspectivas futuras, para uma melhor caracterização da diferença entre a composição da soja transgênica e convencional, recomenda-se a análise de um número maior de amostras de forma a estabelecer este perfil. Além disso, convém considerar a determinação de outras isoflavonas nas amostras analisadas mediante aquisição de padrões analíticos para identificação e quantificação das mesmas.

Capítulo VII

Referências

7 REFERÊNCIAS

ABMBN, **Associação Brasileira de Medicina Biomolecular e Nutrigenômica, Genisteína e Câncer**, Disponível em: <<http://www.medicinacomplementar.com.br>> Acesso em: 31 jan. 2010.

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. **Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração**. ABNT NBR ISO/IEC 17025, 2005.

AIBA - **Região Oeste Da Bahia – Safra 2008/2009**, Comunicado Técnico N° 001/2009 – AIBA, Disponível em: <<http://www.aiba.org.br>>. Acesso em: 15 abr. 2011.

ALEZANDRO, M. R.; De ALMEIDA S. A.; MAIA, P. P.; CARVALHO, H. A.; AZEVEDO, L.; VIEIRA, E. P.; Soja transgênica BRS 243 RR: determinação de macronutrientes e das isoflavonas daidzeína e genisteína por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 520-526, 2008.

ANDRADE, G. J. M.; ROSOLEM, C. A. Absorção de manganês em soja sob efeito do glifosate. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v. 35, p. 961 – 968, 2011.

ANTES, F. G.; DUARTE, F. A.; MESKO, M. F.; NUNES, M. A. G.; PEREIRA, V.A.; MÜLLER, E. I.; DRESSLER, V. L.; FLORES, E. M. M. Determination of toxic elements in coal by ICP-MS after digestion using microwave-induced combustion. **Talanta**, 83, 364–369, 2010.

APERS, S.; NAESSENS, T.; STEEN. K. V. D.; CUYCKENS F.; CLAEYS, M.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A. Fast high-performance liquid chromatography method for quality control of soy extracts. **Journal of Chromatography A**, v. 1038, p. 107–112, 2004.

AQUINO NETO, F. R.; NUNES, D. S. S. **Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins**, Rio de Janeiro: Interciência, 2003, p. 187.

ARRUDA, M.A.Z. (Ed.). **Trends in Sample Preparation**, Nova Science Publishers, Hauppauge, 2006, p. 304.

ÁVILA, M.R. **Qualidade das sementes, teor de óleo, proteína, isoflavonas e utilização de bioestimulante na cultura da soja (Glycine max (L.) Merrill), 2006**. 138 f. Tese (Doutorado em Agronomia), Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

BARBOSA, A. C. L., HASSIMOTTO, N. M. A., LAJOLO, F. M., GENOVESE, M. I., Teores de Isoflavonas e Capacidade Antioxidante da Soja e Produtos Derivados, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 4, p. 921 – 926, 2006.

BARFI, B.; HADJMOHAMMADI, M. R.; KASAAI, M. R.; Determination of daidzein and genistein in soybean and its waste by matrix solid-phase dispersion extraction and HPLC, **Monatshefte fur Chemie**, v. 140, p. 1143–1148, 2009.

BARIN, J. S.; BARTZ, F. R.; DRESSLER, V. L.; PANIZ, J. N. G.; FLORES, E. M. M.; Microwave-Induced Combustion Coupled to Flame Furnace Atomic Absorption Spectrometry for Determination of Cadmium and Lead in Botanical Samples, **Analytical Chemistry**, v. 80, p. 9369 – 9374, 2008.

BARION, G.; HEWIDY, M.; MOSCA, G.; VAMERALI, T. Intraspecific variability for soybean cotyledon isoflavones in different cropping and soil conditions, **Europ. J. Agronomy**, v. 33, p. 63-73, 2010.

BERMEJO-BARRERA, P.; MOREDA-PIÑEIRO, A.; MUÑIZ-NAVEIRO, O.; GÓMEZ-FERNÁNDEZ, A. M. J.; BERMEJO-BARRERA, A. Optimization of a microwave-pseudo-digestion procedure by experimental designs for the determination of trace elements in seafood products by atomic absorption spectrometry, **Spectrochimica Acta Part B**, v. 55, p. 1351-1371, 2000.

BERNADÁ, M. H. G., **Metabolismo do Iodo**, Seminário (Disciplina: Bioquímica do Tecido Animal), Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2004.

BIZZI, C. A.; FLORES, E. M. M.; PICOLATO, R. S.; BARI, J. S.; NOBREGA, J. A. Microwave-assisted digestion in closed vessels: effect of pressurization with oxygen on digestion process with diluted nitric acid. **Analytical Methods**, v. 2, p. 734-738, 2010.

BONETTI, L. P. **Distribuição da soja no mundo. Origem, história e distribuição**, In: MIYASA, S & MEDINA, J. C. (ed.) A soja no Brasil. Campinas, SP, ITAL, p. 1 – 6, 1981.

BRASIL, Ministério da Saúde Resolução, Agência Nacional de Vigilância Sanitária nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 02 jun. 2003.

BRASIL. Decreto nº 55871, de 26 de março de 1965. Modifica o Decreto nº 50.040, de 24 de janeiro de 1961, referente a normas reguladoras do emprego de aditivos para alimentos, alterado pelo Decreto nº 691, de 13 de março de 1962. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 9 de abril de 1965.

BRASIL. **Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Portaria n. 685, de 27 de agosto de 1998. Aprova o Regulamento Técnico: “Princípios gerais para o estabelecimento de níveis máximos de contaminantes químicos em alimentos” e seu anexo “Limites máximos de tolerância para contaminantes químicos inorgânicos”, Brasília, DF, 1998.

CANELA, M. C., **Determinação de Mercúrio a Nível de Traço: Aplicação em Amostras de Interesse Ambiental, 1995**. 79 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

CARRÃO-PANIZZI, M.C.; KITAMURA, K.; BELÉIA, A.D.P.; OLIVEIRA, M.C.N. Influence of growth locations on isoflavona contents in Brazilian soybean cultivars. **Breeding Science**, v. 48, p. 409-413, 1998.

CASTRO, J. T.; SANTOS, E. C.; SANTOS, W. P.; COSTA, L. M.; KORN, M.; NOBREGA, J. A.; KORN, M. G. A.; A critical evaluation of digestion procedures for coffee samples using diluted nitric acid in closed vessels for inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Talanta**, v. 78, p. 1378–1382, 2009.

CHEDL - **Chemical Education Digital Library**. Disponível em: <<http://www.chemkeys.com/blog/?s=tabela>>. Acesso em: 11 jan. 2009.

CHEFTEL, J. C.; CUQ, J. L.; LORIENT, D. **Proteínas Alimentarias, Bioquímica, Propriedades Funcionales e Valores Nutritivos, Modificaciones Químicas**. Editorial Acribia S. A., 1989, p. 257.

CHENA, L. J.; Zhao X.; Plummer, S.; Tang, T. Games, D. E.; Quantitative determination and structural characterization of isoflavones in nutrition supplements by liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1082, p. 60 – 70, 2005.

COCKELL, K, A.; BONACCI, G; BELONJE, B. Manganese Content of Soy or Rice Beverages is High in Comparison to Infant Formulas. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 23, n. 2, p. 124–130, 2004.

COELHO, N. M. M.; **Digestão em micro-ondas - uma nova proposta para o tratamento de amostras**. Em: Mostra de trabalhos financiados pela FAPEMIG - Ciência para o desenvolvimento, 2001. Belo Horizonte, Mostra de trabalhos financiados pela FAPEMIG. Belo Horizonte. FAPEMIG, 2001.

COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006, p. 452.

COSTA, L. M.; SILVA, S. T.; GOUVEIA, A. R. A.; NOBREGA, J. A. Focused microwave-assisted acid digestion of oils: an evaluation of the residual carbon content. **Spectrochimica Acta Part B**. v. 56, p. 1981 – 1985, 2001.

COZZOLINO, S. M. F.; **Biodisponibilidade de Nutrientes**. Ed. Manole Ltda: Barueri, 2005, p. 878.

DANIEL, B.; CORREIA, N.M. **Teores foliares de macro e micronutrientes em soja transgênica pulverizada com glifosato**. Em: XXVII Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas, 2010, L Ribeirão Preto – SP.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia: um breve ensaio. **Química Nova na Escola**, v. 7, p. 21-25, 1998.

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**, v. 1107, p. 59–69, 2006.

DEMICHELI, C. P.; MAIA, E. C. P; **Química de coordenação em sistemas biológicos**, Em: FARIAS, R. F. Química de coordenação: fundamentos e atualidades, Editora Átomo, Campinas, 2005, p. 158-193.

DUARTE F. A.; PEREIRA, J. S. F.; BARIN, J. S.; MESKO, M. F. , DRESSLER, V. L., FLORES, E. M. M, KNAPP, G., Seafood digestion by microwave-induced combustion for total arsenic determination by atomic spectrometry techniques with hydride generation, **Journal Analytical Atomic Spectrometry**, v. 24, p. 224-227, 2009.

DUGO, G. Determination of Cd(II), Cu(II), Pb(II), and Zn(II) content in commercial vegetable oils using derivative potentiometric stripping analysis, **Food Chemistry**, v. 87, p. 639–645, 2004.

EKER, S.; OZTURK, L.; YAZICI, A.; ERENOGLU, B.; ROMHELD, V. & CAKMAK, I. Foliar-applied glifosate substantially reduced uptake and transport of iron and manganese in sunflower (*Helianthus annuus* L.) plants. **Journal of Agricultural Food Chemistry**. v. 54, p. 10019-10025, 2006.

ELDRIDGE, A, C; Determination of Isoflavones in Soybean Flours, Protein Concentrates, and Isolates. **Journal of Agricultural Food Chemistry**. v. 30, (2), p. 353 – 355, 1982.

ELDRIDGE, A. C.; KWOLEK, W. F. Soybean Isoflavones: effects of environment and variety on composition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 31, p. 394 – 396, 1983.

EMBRAPA, **A Soja**. Disponível em: <<http://www.cnpso.embrapa.br>>. Acesso em: 15 abr. 2011.

EMBRAPA, **A Soja no Brasil**. Disponível em: <<http://www.cnpso.embrapa.br/producao/soja/SojanoBrasil.htm>>. Acesso em: 06 out. 2006.

EMBRAPA, **Soja na alimentação**. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/soja_alimentacao/index.php?pagina=22>. Acesso em: 03 dez. 2009.

ESAKI, H. Formation mechanism for potent antioxidative o-dihydroxyisoflavones in soybeans fermented with *Aspergillus saitoi*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 63, p. 851-858, 1999.

ESTEVES, E. A.; MONTEIRO, J. B. R. Efeitos benéficos das isoflavonas de soja em doenças crônicas. **Revista de Nutrição**, v. 14, p. 43-52, 2001.

FERNANDEZ, D. R.; VANDERJAGT, D. J.; WILLIAMS, M.; HUANG, Y. S.; CHUANG, L.; MILLSON, M.; ANDREWS, R.; PASTUSZYN, A.; GLEW, R. H.; Fatty acid, amino acid, and trace mineral analyses of five weaning foods from Jos, Nigeria. **Plant Foods for Human Nutrition**. v. 57, p. 257–274, 2002.

FERRARI, R. A. DEMIATE, I. M. Isoflavonas de soja – uma breve revisão, **Publication UEPG – Biological and Health Sciences**. v. 7 (1), p. 39-46, 2001.

FLORES, E. M. M.; BARIN, J. S.; MESKO, M. F.; KNAPP, G. Sample preparation techniques based on combustion reactions in closed vessels -- A brief overview and recent applications. **Spectrochim. Acta. Part B**, v. 62, p. 1051 – 1064, 2007.

FLORES, E. M. M.; SAIDELLES, A. P. F.; BARIN, J. S.; MORTARI, S. R.; MARTINS, A. F. Hair sample decomposition using polypropylenebeads for determination of arsenic by hydride generation atomic absorption spectrometry, **Analytical Methods**, v. 2, p. 734 – 738, 2010.

FLORES, E.M.M.; MESKO, M.F.; MORAES, D.P.; PEREIRA, J.S.F.; MELLO, P.A; BARIN, J.S.; KNAPP, G. Determination of halogens in coal after digestion using the microwave-induced combustion technique. **Analytical Chemistry**. v. 80, p. 1865–1870, 2008.

FOSTER, L. H.; SUMAR, S. Selenium concentrations in soya based milks and infant formulae available in the United Kingdom. **Food Chemistry**. v. 56, (1) p. 93-98, 1996.

FREITAS, L. S. **Desenvolvimento de procedimentos de extração do óleo de semente de uva e caracterização química dos compostos extraídos, 2007**. 205 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

GARCIA, C.; MARINA, L.; LABORDAB, F.; TERRE, M.; Chemical characterization of Products commercial soybean, **Food Chemistry**, v. 62, (3), p. 325 – 331, 1998.

GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M.; Determinação de isoflavonas em derivados de soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 21(1), p. 86-93, 2001.

GOUVEIA, S. T.; SILVA, F. V.; COSTA, L. M.; NOGUEIRA, A R. A.; NÓBREGA, J. A. Determination of residual carbon by inductively-coupled plasma optical emission spectrometry with axial and radial view configurations. **Analytica Chimica Acta**, v. 445, p. 269-275, 2001.

HARRIS, DANIEL C., **Análise Química Quantitativa**, 6ª Edição, LTC-Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., Rio de Janeiro-RJ, p. 862, 2005.

HARRISON, L.A.; BAILEY, M.R.; NAYLOR, M.; REAM, J. & HAMMOND, D.L. The expressed protein in synthase in glifosato-tolerant soybeans, 5-enolpyruvylshikimate-

3phosphate synthase from *Agrobacterium* sp. strain CP4, is rapidly digested and is not toxic to mice upon acute gavage administration. **Journal of Nutrition**, v. 128, p. 756-761, 1996.

HARTWIG, A. C., FERREIRA, L. R., SANTOS, L. A., COSTA, V. C., MULLER, A. H., MESKO, M. F., **Determinação de Bromo e Iodo em Camarão por ICP-MS após Diferentes Procedimentos de Preparo de Amostras**, Em: XIII Encontro de Pós-Graduação UFPEL (ENPOS), 2011.

HSEU, Z.; Evaluating heavy metal contents in nine composts using four digestion methods. **Bioresource Technology**. v. 95, p. 53–59, 2004.

HUI, E. Genistein and Daidzein/Glycitein Content in Tofu, **Journal of Food Composition And Analysis**, v. 14, p. 199 – 206, 2001.

HUTABARATA, L. S.; GREENFIELDA H.; Mulhollandb, M.; Quantitative determination of isoflavones and coumestrol in soybean by column liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 886, p. 55–63, 2000.

IBGE - **Produção Agrícola Municipal - Cereais, Leguminosas e Oleaginosas – 2002 - 2006**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia>>. Acesso em 11 mar. 2007.

IKEMA, A.; NWANKWOALAB, A.; ODUEYUNGBOA, S.; NYAVOR, K.; EGIEBORA, N.; Levels of 26 elements in infant formula from USA, UK, and Nigeria by microwave digestion and ICP–OES. **Food Chemistry**. v. 77, p. 439–447, 2002.

INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial; **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos**, DOQ-CGCRE-008, 2003.

INMETRO. **Normalização e qualidade industrial: Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. DOQCGCRE-008, 2002.

ISAAA - **International Service for The Acquisition of Agri-Biotech Applications Agrobio-Tecnologia**. Resumo executivo - BRIEF 41 - Situação global das culturas biotecnológicas/GM comercializadas: 2009. Disponível em: <www.isaaa.org>. Acesso em: 14 nov. 2011.

JARDIM, W. F., GIMENEZ, S. M. N., CANELA, M. C., MORAES, S. G., Acute toxicity of Hg⁰ and Hg²⁺ ions to Escherichia coli, **Chemical Speciation and Bioavailability**, v. 5, p. 97, 1993.

JUN-MING S.; Bao-Li, S.; Fen-Xia, H.; Shu-rong, Y.; Hua, Y. and Kikuchi, A. Rapid HPLC Method for determination of 12 isoflavone components in soybean seeds. **Agricultural Sciences in China**. v. 10, p. 70-77, 2011.

JUSTEN, G. C., **Composição Química da Soja (*Glicine max (L.) Merrill*) em Conversão para Agricultura Orgânica Considerando as Condições Climáticas do Oeste do Paraná, 2007**. 68 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon.

KARR-LILIENTHAL, L. K.; GRIESHOP, C. M.; MERCHEN, N. R.; MAHAN, D. C.; FAHEY, G. C. Chemical Composition and Protein Quality Comparisons of Soybeans and Soybean Meals from Five Leading Soybean-Producing Countries. **Journal of Agricultural Food Chemistry**. v. 52, p. 6193-6199, 2004.

KAZI, T. G. Determination of toxic elements in infant formulae by using electrothermal atomic absorption spectrometer. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 1425–1429, 2009.

KINGSTON, H, M.; HASWELL, S. J. (Eds.), **Microwave-enhanced chemistry fundamentals, sample preparation and application**, Washington: American Chemical Society, Washington, DC, p. 223 – 349, 1997.

KLEJDUS, B. Determination of isoflavones in soy bits by fast column high-performance liquid chromatography coupled with UV–visible diode-array detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1084, p. 71–79, 2005.

KLEJDUS, B. Liquid chromatographic–mass spectrometric determination of genistin and daidzin in soybean food samples after accelerated solvent extraction with modified content of extraction cell. **Analytica Chimica Acta**, v. 517, p. 1–11, 2004.

KNAPP, G.; PANHOLZER, S.; KETTISCH, P. Pressure-controlled microwave-assisted wet digestion systems. Fundamentals sample preparation and applications. **American Chemical Society**, p. 423 – 451, 1998.

KOHLMEIER, M., **Nutrient Metabolism**, Ed. Amsterdam: Academic Press, p. 826, 2003.

KONDO, K.; SUZUKI, Y.; IKEDA, Y.; UMEMURA, K. Genistein, an isoflavone included in soy, inhibits thrombotic vessel occlusion in the mouse femoral artery and in vitro platelet aggregation, **European Journal of Pharmacology**, v. 455, p. 53– 57, 2002.

KRUG, F. J. (Org.). **Métodos de Preparo de Amostras: Fundamentos sobre métodos de preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar**, 1ª ed. Piracicaba: Edição do autor, v. 1, p. 340, 2008.

KRUSHEVSKA, A.; BARNES, R. M.; AMARASIRIWARADENA, C. J.; FONER, H.; MARTINES, L. Determination of the residual carbon content by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry after decomposition of biological samples. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v.7, p. 845 – 850, 1992.

LIPPARD, S. J.; BERG, J. M.; **Principles of bioinorganic chemistry**. University Science Books. California, p. 411, 1994.

LUI, M.C.Y; AGUIAR, C.L.; ALENCAR, S.M.; SCAMPARINI, A. R.P.; PARK, Y. K. Isoflavonas em isolados e concentrados proteicos de soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, p. 206-212, 2003.

LYON, T.D.B., ROBIN, P.A., WATSON, W.S., LITTLEJOHN, D., Determination of elevated concentrations of bromine in serum by ICP-MS and ICP-OES, **Journal Analytical and Atomic Spectrometry**, v. 20, p. 757, 2005.

MESKO, M. F.; PEREIRA, J. S.; MORAES, D. P.; BARIN, J. S.; MELLO, P. A.; PANIZ, J. N.; NÓBREGA, J. A.; KORN, M. G.; FLORES, E. M.; Focused microwave-induced combustion: a new technique for sample digestion, **Analytical Chemistry**, v. 82, p. 2155-2160, 2010.

MESSINA, M.; MESSINA, V. Soyfoods, Soybean Isoflavones, and Bone Health: A Brief Overview. **Journal of Renal Nutrition**, v. 10, (2), p. 63-68, 2000.

MICARONI, R. C. C.; SILVEIRA BUENO M. I. M.; JARDIM, W. F. Compostos de mercúrio. Revisão de métodos de determinação, tratamento e descarte. **Química nova**, v. 23 (4), p.487- 495, 2000.

MILLER, J. C., MILLER, J. N., **Estadística para Química Analítica**, Segunda edição, Ed. Addison-Wesley Iberoamericana, 1988, cap. 5, p. 87-121.

MILLSTONE, E.; BRUNNER, E.; MAYER, S. **Para além da "equivalência substancial"**. Nature, Brighton, v. 401, p. 525-526, 1999

MITANI, K.; NARIMATSU, S.; KATAOKA, H. Determination of daidzein and genistein in soybean foods by automated on-line in-tube solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 986, p. 169–177, 2003.

MONTASER, A.; GOLIGHTLY, D. W. **Inductively Coupled Plasma in Analytical Atomic Spectrometry**. Second Edition. New York: VCH Publishers, p. 1017, 1992.

MORAES, F. P.; COLLA, L. M; Alimentos Funcionais e Nutracêuticos: Definições, Legislação e Benefícios à Saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3 (2), p. 109-122, 2006.

MORAIS, A. A. C.; da SILVA, A. L. **Soja: Suas Aplicações**. Editora médica e científica LTDA (MEDSI), p. 240, 1996.

MORÉS, S., MONTEIRO, G. C., SANTOS, F. S., CARASEK, E., WELZ, B., Determination of fluorine in tea using high-resolution molecular absorption

spectrometry with electrothermal vaporization of the calcium mono-fluoride CaF, **Talanta**, n. 85, p. 2681 – 2685, 2011.

MULLNER, C.; SONTAG, G. HPLC with coulometric electrode array detection. **European Food Research Technology**. v. 211, p. 301 – 304, 2000.

NAGATA, N.; BUENO, M. I. M. S.; PERALTA-ZAMORA, P. G. Métodos matemáticos para correção de interferências espectrais e efeitos interelementos na análise quantitativa por fluorescência de raios-x, **Química Nova**, v. 24, n. 4, p. 531-539, 2001.

NAIM, M. Soybean Isoflavones, Characterization, Determination, and Antifungal Activity. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 22 (5), p. 806-810, 1974.

NAOZUKA J.; MARCIA A.; DA VEIGA, M.S.; OLIVEIRA, P. V.; DE OLIVEIRA, E. Determination of chlorine, bromine and iodine in milk samples by ICP-OES. **Journal Analytical and Atomic Spectrometry**, v.18, p. 917–921, 2003.

NARDA, F., TONIOLO, R., BONTEMPELLI, G., Improved microwave digestion procedure for inductively coupled plasma mass spectrometric determinations of inorganic bromide residues in foodstuffs fumigated with methyl bromide, **Analytica Chimica Acta**, v. 436, p. 245-252, 2001.

NÓBREGA, J. A.; CARRILHO, E. N. V. M.; NOGUEIRA, A. R. A.; SOUZA, G. B.; CRUZ, G. An attempt to correlate fat and protein content of biological samples with residual carbon after microwave-assisted digestion. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 371, p. 536-540, 2001.

OKADA, I. A.; DURAN, M. C.; BUZZO, M. L.; DOVIDAUSKAS, S.; SAKUMA, A. M.; ZENEBON, O. Validation and application of an analytical method for determining inorganic nutrients in milled rice, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 27 (3), p. 492-497, 2007.

PAVELKA, S., BABICKÝ, A., LENER, J., VOBECKÝ, M., Impact of High Bromide Intake in the Rat Dam on Iodine Transfer to the Sucklings, **Food Chemistry. Toxicology**, v. 40, p. 1041–1045, 2002.

PENALVO, J. L.; NURMI, T.; ADLERCREUTZ, H. A simplified HPLC method for total isoflavones in soy products. **Food Chemistry**, v. 87, p. 297–305, 2004.

PENG, A. B. Y. Determination of isoflavones in soy products by capillary electrophoresis with electrochemical detection. **Food Chemistry**, v.87, p. 135–139, 2004.

PEREIRA, J. S. F., MELLO, P. A., MORAES, D. P., DUARTE, F. A., DRESSLER, V. L., KNAPP, G., FLORES, E. M. M., Chlorine and sulfur determination in extra-heavy crude oil by inductively coupled plasma optical emission spectrometry after microwave-induced combustion, **Spectrochimica Acta Part B**, v. 64, p. 554 – 558, 2009.

PEREIRA, J. S. F.; GUIMARÃES R. C. L.; FONSECA T. C. O.; MORAES, D. P.; ANTES F. G.; DIEHI L. O.; SANTOS, M. F. P.; DRESSLER, V. L.; FLORES, E. M. M.; Determination of metals and metalloids in light and heavy crude oil by ICP-MS after digestion by microwave-induced combustion. **Microchemical Journal**, v. 96, p. 4 –11, 2010.

PLESSI, M.; BERTELLI, D.; MONZANI, A. Determination of Aluminum and Zinc in Infant Formulas and Infant Foods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v 10, p. 36–42, 1997.

PREINERSTORFER, B. SONTAG, G.; Determination of isoflavones in commercial soy products by HPLC and coulometric electrode array detection. **European Food and Research Technology**, v. 219, p. 305–310, 2004.

QUEIROZ, S. C. N.; NOGUEIRA, R. T.; SCRAMIN, S. **Importância dos Fitoestrógenos Presentes na Soja Para a Saúde Humana**. EMBRAPA Meio Ambiente, Jaguariúna, Fevereiro, 2006.

RAMOS, G. R., ÁLVAREZ-COQUE, M. C. G., **Quimiometria**, Ed. Síntesis S. A., p. 238, 2001.

RIBANI, M., BOTTOLI, C. B. G., COLLINS, C. H., JARDIM, I. C. F. S., MELO, L. F. C., Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos, **Química Nova**, n. 27, p. 771-780, 2004.

ROMARÍS-HORTAS V.; MOREDA-PIÑEIRO A.; BERMEJO-BARRERA P. Microwave assisted extraction of iodine and bromine from edible seaweed for inductively coupled plasma-mass spectrometry determination. **Talanta**, v. 79, p. 947–952, 2009.

ROSTAGNO, M. A.; PALMA, M.; BARROSO, C. G. Solid-phase extraction of soy isoflavones. **Journal of Chromatography A**, v. 1076, p. 110-117, 2005.

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

ROSTAGNO, M. A.; PALMA, M.; BARROSO, C. G. Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavonas. **Journal of Chromatography A**, v. 1012, p. 119 – 128, 2003.

RUIZ-LARREA, M. B. Antioxidant activity of phytoestrogenic isoflavones. **Free Rad. Res. London**, v. 26, p. 63-70, 1997.

SCHMIDT, M. J. **Understanding and using statistic basic concepts**. Lexington: D.C. Heath and Company, Cap. 6.: Correlation: measuring relations, p. 131-157, 1975.

SCHWARTZ, H.; SONTAG, G. Determination of isoflavones in nutritional supplements by HPLC with coulometric electrode array detection. **Monatsh Chem**, v. 139, p. 865–872, 2008.

SENA, M. M.; POPPI R. J. Avaliação do uso de métodos quimiométricos em análise de solos. **Química Nova**, v. 23 (4), p. 547 – 556, 2000.

SHEN, D., WU, Q., SCIRAPPA, W. J., SIMON, J. E., Chromatographic fingerprints and quantitative analysis of isoflavones in Tofu-type soybeans, **Food Chemistry**, v. 130, p. 1003 – 1009, 2012.

SILVA, M. L. S.; VITTI, G. S.; TREVIZAM, A. R. Concentração de metais pesados em grãos de plantas cultivadas em solo com diferentes níveis de contaminação. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 42 (4), p. 527-535, 2007.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**, 8ª edição, (Tradução Marco Grassi, revisão técnica Célio Pasquini), São Paulo: Thomson, p.999, 2006.

SOLA-LARRAÑAGA, C.; NAVARRO-BLASCO, I. Optimization of a slurry dispersion method for minerals and trace elements analysis in infant formulae by ICP OES and FAAS. **Food Chemistry**, v. 115, p. 1048–1055, 2009.

SOUZA, R. M. Inductively coupled plasma optical emission spectrometry for trace multi-element determination in vegetable oils, margarine and butter after stabilization with propan-1-ol and water. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 60, p. 711 – 715, 2005.

SOYSTATS, **Welcome to Soystats 2011**, Disponível em: <<http://www.soystats.com/2011/Default-frames.htm>>, Acesso em: 15 out. 2011.

STANLEY, E. M. **Environmental Chemistry**, Ed. Lewis Publishers: Boca Raton United States of America, p. 811, 1994.

SUN Jun-ming, SUN Bao-li, HAN Fen-xia, YAN Shu-rong, YANG Hua and Akio Kikuchi. Rapid HPLC Method for Determination of Isoflavone Components in Soybean Seeds. **Agricultural Sciences in China**, v. 10, p. 70-77, 2011.

TOMA, H. E.; **Química bioinorgânica**. Departamento de Assuntos Científicos e tecnológicos da Secretária Geral dos Estados Americanos, Monografia n. 29, 1984.

TONHI, E. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (HPLC-RP) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Química Nova**, v. 25, p. 616-623, 2002.

TORRES, M. A.; VERDOY, J.; ALEGRÍA, A.; BARBERA, R.; FARREU, R.; LAGARDA, M. J. Selenium contents of human milk and infant formulas in Spain. **The Science of the Total Environment**, v. 228, p. 185 – 192, 1999.

TRISOJA, **Isoflavonas**. Disponível em: <www.trisoja.com/por/pdf/isoflavonas.pdf>. Acesso em: 02 dez. 2009.

VAN DOKKUM. W.; DE VOS, R. H.; MUYS, TH.; WESSTRA, J.A. Minerals and trace elements in total diets in The Netherlands. **British Journal of Nutrition**, v. 61, p. 7-15, 1989.

VANNI, S. M. **Modelos de regressão: estatística aplicada**. São Paulo: Legmar informática & e Editara, p.177, 1998.

VOBECKY, M.; BABICKY, A.; LENER, J. Effect of increased bromide intake on iodine excretion in rats. **Biological Trace Element Research**, v. 55, p. 215-19, 1996.

WALTON., R. M., **Validation of Laboratory Tests and Methods**, Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine, v. 10, n. 2, p. 59 – 65, 2001.

WANG, H.; MURPHY, P.A. Isoflavone Content in Commercial Soybean Foods. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v. 42, p. 1666-1673, 1994.

WANG, Y.; LU, C.; XIAO, Z.; WANG, G. Determination of Aluminum in Foods by Stabilized Temperature Platform Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, p. 724-726, 1991.

WIETESKA, E.; ZIOEK, A.; DRZEWINSKA, A. Extraction as a method for preparation of vegetable samples for the determination of trace metals by atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 330, p. 251-257, 1996.

YAMADA, L. T. P.; BARCELOS, M. F. P. B.; SOUSA, R. V.; DE LIMA, A. L.
Composição química e conteúdo de ferro solúvel em soja [Glycine max (L.) Merrill].
Ciência e Agrotecnologia. v. 27, p.406-413, 2003.