



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**  
**GRUPO DE PESQUISA EM QUÍMICA ANALÍTICA**

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO**  
**DA COMPOSIÇÃO MINERAL EM DERIVADOS DE SOJA**  
**EMPREGANDO TÉCNICAS ESPECTROMÉTRICAS**

**JOSÉ TIAGO PEREIRA BARBOSA**

**Salvador, Bahia**

**Abril de 2008**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM QUÍMICA  
GRUPO DE PESQUISA EM QUÍMICA ANALÍTICA**



**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO  
DA COMPOSIÇÃO MINERAL EM DERIVADOS DE SOJA  
EMPREGANDO TÉCNICAS ESPECTROMÉTRICAS**

**JOSÉ TIAGO PEREIRA BARBOSA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós – Graduação, Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria das Graças Andrade Korn  
Co – Orientador: Prof. Dr. Madson de Godoi Pereira**

\* Bolsista CAPES

**Salvador, Bahia  
Abril de 2008**

“Aprendizado é ação. Do contrário, é só informação.”  
Albert Einstein

Dedico este trabalho a Beatriz Galvão Barbosa e a Maria José Pacheco dos Santos.

A Maria das Graças, pela amizade, credibilidade e contribuição decisiva para o meu crescimento durante o mestrado.

A Madson,  
pela confiança e pela relação de amizade construída desde a iniciação científica.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por tudo.

Aos meus pais, Djalma e Lea e à minha irmã Beatriz, minha família.

À minha namorada Adriana pelo amor, cuidado e compreensão.

À toda a minha família.

Aos membros da Comissão Examinadora.

À professora Maria das Graças Korn pela orientação no presente trabalho.

Ao professor Madson pela co-orientação neste trabalho.

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

Aos professores Antônio Celso Spínola e Sérgio Luís Costa Ferreira.

Ao professor Ivo pela orientação específica e ao amigo Alexandre pelo grande auxílio dispensado.

Ao professor Alaílson pelas discussões científicas e contribuição no trabalho.

À Daniele, Denílson, Elane, Sadi, Adriana, Mauro, e Cláudio pela amizade e apoio.

À Kássio pela recepção e auxílio, juntamente com os amigos da moradia e laboratório em Campinas.

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, Cristóvão e Paulo.

À Jacira e a Wagna pelas discussões científicas.

Ao pessoal do GPQA: Aníbal, Andréa, Anderson, Alete, Ayala, Betânia, Cássia, Daniel, Diego, Domingos, Elecy, Elisângela, Érik, Euliane, Fernanda, Fábio Dias, Fábio Alan, Gabriel, Geovanni, Hadla, Jéssica, João, Lindomar, Pedro, Raíldo, Rennan, Robson, Samuel, Sara, Stéfano, Suzana, Vanessa, Walter, Zenira.

Aos meus amigos de graduação e iniciação científica Eduardo, Tiago, Daniel, Enaldo, George, Josué, Igor, Fredson, Lucas, Marcos, Manoel, Pereira, Rodolfo, Sapé.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio concedido na forma de bolsa de estudo nos devidos períodos.

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.

**MUITO OBRIGADO!**

## RESUMO

A proteína texturizada de soja possui alto conteúdo protéico e é usualmente utilizada como alternativa na substituição de uma porção de carne. O objetivo deste trabalho foi avaliar três procedimentos de decomposição úmida, visando determinação multielementar (Ca, K, Mg, P, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni e Zn) em amostras de proteína texturizada de soja por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES). Nos procedimentos usando chapa aquecedora (PC) e bloco digestor (PB) foi utilizada a mistura de  $\text{HNO}_3$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ , enquanto que para o procedimento com forno de microondas focalizadas (PF) foi necessária a introdução também de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . As figuras analíticas de mérito, tais como precisão, limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) e efeito de matriz, foram avaliadas para os procedimentos propostos. As concentrações de Al, Cd, Co e Pb, encontraram-se abaixo do LOQ dos procedimentos para as amostras. A exatidão foi verificada com material de referência certificado e por comparação com método de referência da AOAC. Além disso, foi otimizado um sistema miniaturizado de análise por injeção em fluxo visando a determinação de ferro nos digeridos com o reagente 1,10-fenantrolina e os resultados foram concordantes com o método de referência.

*Palavras-Chave: proteína texturizada de soja; preparo de amostras; espectrometria*



## ABSTRACT

The texturized soy protein is a good source of protein and is usually used as an alternative to meat. The aim of this study was the evaluation of three wet decomposition procedures for multi-element analytical determination (Ca, K, Mg, P, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni e Zn) in texturized soy protein samples using inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES). In procedures using hot plate (PC) and heating block (PB), a mixture of HNO<sub>3</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was used, whereas for decomposition in a focused-microwave-oven (PF), the use of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> was necessary. The analytical figures of merit of the developed analytical procedures such as precision, accuracy and matrix effect, were statistically assessed. The concentrations of Al, Cd, Co and Pb were found below oh the LOQ. The accuracy of the results was demonstrated using one certified reference material (spinach leaves NIST 1570a) and comparison with recommended AOAC official method. Moreover, a flow injection analysis microsystem for determination of iron with 1,10-phenantroline was optimized and the results were concordant with those obtained with the reference method.

*Keywords: texturized soy protein, sample preparation, spectrometry*

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Condições experimentais utilizadas no equipamento de ICP OES com configuração axial .....	16
Tabela 2. Linhas de Emissão Estudadas para cada Elemento .....	24
Tabela 3. Programa de aquecimento para decomposição de amostras de proteína texturizada de soja em forno de microondas focalizadas .....	27
Tabela 4. Inclinações das curvas analíticas para Cr, Cu, Fe, Mn, Ni e Zn para o efeito de matriz com ICP OES nos meios C1 (meio ácido diluído), C2 (meio do branco submetido à decomposição em chapa aquecedora), C3 (proteína texturizada de soja submetida à decomposição em chapa aquecedora), B2 (meio do branco submetido à decomposição em bloco digestor) e B3 (proteína texturizada de soja submetida à decomposição em bloco digestor) .....	37
Tabela 5. Limites de Quantificação obtidos para decomposição ácida em chapa aquecedora e bloco digestor .....	42
Tabela 6. Comparação dos teores (n = 3) de macro, micro e elementos traço obtidos por decomposição em placa aquecedora e bloco digestor para o material de referência NIST 1570a.....	43
Tabela 7. Teor médio (mg g <sup>-1</sup> ) ± desvio padrão (n = 3) de Ca, K, Mg, Na e P quantificados por ICP OES em amostras de proteína texturizada de soja para decomposição em chapa aquecedora.....	45
Tabela 8. Teor médio (µg g <sup>-1</sup> ) ± desvio padrão (n = 3) de Cr, Cu, Fe, Mn, Ni e Zn quantificados por ICP OES em amostras de proteína texturizada de soja para decomposição em chapa aquecedora.....	45
Tabela 9. Teor médio (mg g <sup>-1</sup> ) ± desvio padrão (n = 3) de Ca, K, Mg, Na e P quantificados por ICP OES em amostras de proteína texturizada de soja para decomposição em bloco digestor .....	46
Tabela 10. Teor médio (µg g <sup>-1</sup> ) ± desvio padrão (n = 3) de Cr, Cu, Fe, Mn, Ni e Zn quantificados por ICP OES em amostras de proteína texturizada de soja para decomposição em bloco digestor .....	46
Tabela 11. Inclinações das curvas analíticas para Cr, Cu, Fe, Mn, Ni e Zn para o estudado efeito de matriz com ICP OES nos meios F1 (meio ácido diluído), C2 (meio do branco submetido à decomposição em chapa aquecedora), C3 (proteína texturizada de soja submetida à decomposição em chapa aquecedora) .....	47
Tabela 12. Limites de quantificação obtidos para decomposição ácida em forno de microondas com radiação focalizada.....	49

Tabela 13. Teores (n = 3) de macro, micro e elementos traço obtidos por decomposição em forno de microondas com radiação focalizada para o material de referência NIST 1570a.....	50
Tabela 14. Teor médio (mg g <sup>-1</sup> ) ± desvio padrão (n = 3) de Ca, K, Mg, Na e P por ICP OES em amostras de proteína texturizada de soja para decomposição em forno de microondas com radiação focalizada.....	56
Tabela 15. Teor médio (µg g <sup>-1</sup> ) ± desvio padrão (n = 3) de Cr, Cu, Fe, Mn, Ni e Zn por ICP OES em amostras de proteína texturizada de soja para decomposição em forno de microondas com radiação focalizada.....	56
Tabela 16. Teor médio (mg g <sup>-1</sup> ) ± desvio padrão (n = 3) de Ca, K, Mg, Na e P por ICP OES em amostras de proteína texturizada de soja para diferentes procedimentos de decomposição.....	59
Tabela 17. Teor médio (µg g <sup>-1</sup> ) ± desvio padrão (n = 3) de Cr, Cu, Fe, Mn, Ni e Zn por ICP OES em amostras de proteína texturizada de soja para diferentes procedimentos de decomposição .....	60
Tabela 18. Determinação de Fe <sup>2+</sup> em amostras de proteína texturizada de soja (n=3), utilizando configuração em linha única .....	71
Tabela 19. Determinação de Fe <sup>2+</sup> em amostras de proteína texturizada de soja (n=3), utilizando configuração em confluência .....	72
Tabela 20. Comparação entre os procedimentos em chapa aquecedora (PC), bloco digestor (PB) e forno de microondas com radiação focalizada (PF).....	74

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. ICP OES (Vista Pro, Varian) e tocha na configuração axial.....	17
Figura 2. Forno Mufla Q318S .....	18
Figura 3. Chapa Aquecedora Q313A .....	18
Figura 4. Bloco digestor TE-040/25 .....	19
Figura 5. Forno de microondas com radiação focalizada STAR 2, CEM, Matthews, N.C., EUA.....	19
Figura 6. Fotoexpositora utilizada para a exposição do substrato à radiação UV.....	20
Figura 7. Fotografia de funcionamento do sistema miniaturizado para análise por injeção em fluxo.....	21
Figura 8. Procedimento detalhado da construção do microssistema utilizando a resina foto-sensível à base dos oligômeros uretana e acrilato. (A) esquema do molde e da transparência a Laser, (B) deposição da resina foto-sensível sobre o molde, (C) fechamento do conjunto, (D) exposição durante 75 s, (E) exposição durante 85 s.....	23
Figura 9. Amostras de proteína texturizada de soja submetidas à decomposição mediante procedimentos sugeridos.....	29
Figura 10. Curvas de calibração construídas em H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> para as intensidades das linhas espectrais para os analitos Cr, Cu, Fe, Mn, Ni e Zn.....	32
Figura 11. Curvas de calibração construídas em H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> para as intensidades das linhas espectrais para os analitos Ca, K, Mg, Na e P .....	33
Figura 12. Curvas de calibração construídas em HNO <sub>3</sub> para as intensidades das linhas espectrais para os elementos Cr, Cu, Fe, Mn, Ni e Zn .....	34
Figura 13. Curvas de calibração construídas em HNO <sub>3</sub> para as intensidades das linhas espectrais para os analitos Ca, K, Mg, Na e P .....	35
Figura 14. Curvas analíticas de calibração para avaliação do efeito de matriz para os elementos Cr, Cu, Fe, Mn, Ni e Zn para os diferentes meios considerando o procedimento de decomposição em chapa aquecedora .....	39
Figura 15. Curvas analíticas de calibração para avaliação do efeito de matriz para os elementos Cr, Cu, Fe, Mn, Ni e Zn para os diferentes meios considerando o procedimento de decomposição em bloco digestor.....	40
Figura 16. Curvas analíticas de calibração para avaliação do efeito de matriz para os elementos Cr, Cu, Fe, Mn, Ni e Zn para os diferentes meios considerando o procedimento de decomposição em forno de microondas com radiação focalizada ..	48
Figura 17. Concentrações (mg g <sup>-1</sup> ) dos macro elementos Ca, Mg, Na e P quando na ausência e presença de padrão interno para as amostras 1, 2, 3 e 4 .....	52

Figura 18. Concentração ( $\text{mg g}^{-1}$ ) do macro elemento K quando na ausência e presença de padrão interno para as amostras 1, 2, 3 e 4 .....	53
Figura 19. Concentrações ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) dos micro elementos Cr, Cu e Ni quando na ausência e presença de padrão interno para as amostras 1, 2, 3 e 4 .....	54
Figura 20. Concentrações ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) dos micro elementos Fe, Mn e Zn quando na ausência e presença de padrão interno para as amostras 1, 2, 3 e 4 .....	55
Figura 21. Concentrações de Ca, Mg e P para as amostras de proteína texturizada de soja em diferentes granulometrias considerando a decomposição em bloco digestor (PB).....	61
Figura 22. Concentrações de Cr, Cu, Fe, Mn, Ni e Zn para as amostras de proteína texturizada de soja em diferentes granulometrias considerando a decomposição em bloco digestor (PB).....	61
Figura 23. Adaptação das agulhas e fibras ópticas para o devido funcionamento do microssistema.....	63
Figura 24. Microssistema proposto para determinação de ferro em derivados de soja. C, carregador; E.A., Entrada de Amostra; S.A., Saída de Amostra; L.A., <i>Loop</i> de Amostragem ( $ab = 0,6 \mu\text{L}$ ); R <sub>1</sub> , Canal para inserção de Reagente; R <sub>2</sub> , Canal para inserção de Reagente; C.R. <sub>1</sub> , Canal de reação (4 cm); C.R. <sub>2</sub> , Canal de reação (6 cm); F.O., Fibra Óptica; C.F., Cella de Fluxo (0,5 cm); D, Descarte .....	63
Figura 25. Microssistema para determinação de ferro em digeridos de proteína texturizada de soja.....	64
Figura 26. Gráfico de Absorvância x Tempo para a injeção de $10 \text{ mg L}^{-1}$ de $\text{Fe}^{3+}$ .....	65
Figura 27. Novo microssistema proposto para determinação de ferro em derivados de soja. C, carregador; E.A., Entrada de Amostra; S.A., Saída de Amostra (dois canais possíveis); L.A., <i>Loop</i> de Amostragem ( $ab = 0,6 \mu\text{L}$ , $ac = 1,0 \mu\text{L}$ ); R <sub>1</sub> , Canal para inserção de Reagente; R <sub>2</sub> , Canal para inserção de Reagente; C.R. <sub>1</sub> , Canal de reação (7 cm); C.R. <sub>2</sub> , Canal de reação (7 cm); F.O., Fibra Óptica; C.F., Cella de Fluxo (0,5 cm); D, Descarte .....	66
Figura 28. Novo microssistema proposto para determinação de ferro .....	66
Figura 29. Diagrama obtido para a curva analítica de calibração para $\text{Fe}^{3+}$ ( $1 \text{ a } 5 \text{ mg L}^{-1}$ ) .....	68
Figura 30. Diagrama obtido na determinação de ferro ( $n=3$ ) em amostras de proteína texturizada de soja utilizando configuração em linha única .....	70

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AAS</b>	do Inglês <i>Atomic Absorption Spectrometry</i> (Espectrometria de absorção atômica)
<b>FAAS</b>	do Inglês <i>Flame Atomic Absorption Spectrometry</i> (Espectrometria de Absorção atômica com chama)
<b>ET AAS</b>	do Inglês <i>Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry</i> (Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica)
<b>FAES</b>	do Inglês <i>Flame Atomic Emission Spectrometry</i> (Espectrometria de Emissão atômica com chama)
<b>ICP OES</b>	do Inglês <i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i> (Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado).
<b>µTAS</b>	do Inglês <i>Micro Total Analytical System</i>
<b>µFIA</b>	do Inglês <i>Micro Flow Injection Analysis</i>
<b>NIR</b>	do Inglês <i>Near Infrared</i>
<b>RMN</b>	do Inglês <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
<b>NIST</b>	do Inglês <i>National Institute of Standards and Technology</i>
<b>PTS</b>	Proteína Texturizada de Soja
<b>PC</b>	Procedimento de Decomposição em Chapa Aquecedora
<b>PB</b>	Procedimento de Decomposição em Bloco Digestor
<b>PF</b>	Procedimento de Decomposição em Forno de Microondas Focalizadas
<b>PR</b>	Procedimento Referência
<b>MS</b>	Do Inglês <i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometria de Massas)
<b>LOD</b>	Limite de Detecção
<b>LOQ</b>	Limite de Quantificação
<b>RSD</b>	do Inglês <i>Relative Standard Deviation</i> (Desvio Padrão Relativo)
<b>1</b>	Amostra de PTS (granulometria 1)
<b>2</b>	Amostra de PTS (granulometria 2)
<b>3</b>	Amostra de PTS (granulometria 3)
<b>4</b>	Amostra de PTS (granulometria 4)

# ÍNDICE

<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>1</b>
<b>1.0 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>2</b>
1.1 A Soja .....	2
1.2 A Proteína Texturizada de Soja .....	3
1.3 Procedimentos para decomposição de amostras de soja e derivados. ....	4
1.4 Utilização de Microssistemas para a Determinação de Ferro .....	6
1.5 Objetivos .....	7
1.5.1 Objetivo Geral .....	7
1.5.2 Objetivos Específicos .....	7
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>8</b>
<b>2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>9</b>
2.1 Procedimentos para avaliação da composição de amostras de soja e derivados .....	9
2.2 O emprego de microssistemas para a determinação de metais .....	12
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>14</b>
<b>3.0 PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	<b>15</b>
3.1 Limpeza do material .....	15
3.2 Amostras e reagentes .....	15
3.2.1 Amostras e reagentes para avaliação dos procedimentos de decomposição .....	15
3.2.2 Amostras e reagentes para estudos com microssistemas .....	15
3.3 Instrumentação.....	16
3.3.1 ICP OES.....	16
3.3.2 Equipamento para decomposição por via seca .....	17
3.3.3 Equipamentos para a decomposição de amostras por aquecimento condutivo .....	18
3.3.4 Equipamento para decomposição de amostras por radiação microondas .....	19
3.3.5 Microssistemas.....	20
3.4 Construção do microssistema para determinação de ferro.....	21
3.5 Estudo de linhas de emissão e avaliação da utilização de padrão interno nas medidas por ICP OES .....	24
3.6 Avaliação do Efeito de Matriz nas medidas por ICP OES.....	25

3.7 Procedimentos experimentais para decomposição das amostras de proteína texturizada de soja.....	26
3.7.1 Procedimento de decomposição por via seca.....	26
3.7.2 Otimização do procedimento de decomposição em placa com aquecimento condutivo.....	26
3.7.3 Otimização do procedimento de decomposição em bloco digestor.....	27
3.7.4 Otimização do procedimento de decomposição em forno de microondas com radiação focalizada.....	27
3.8 Determinação da acidez final dos digeridos.....	27
3.9 Determinação do carbono residual.....	28
3.10 Características analíticas do método.....	28
3.11 Material de Referência Certificado.....	28
3.12 Aplicação Analítica.....	29
<b>CAPÍTULO 4.....</b>	<b>30</b>
<b>4.0 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....</b>	<b>31</b>
4.1 Estudo de linhas de emissão dos analitos.....	31
4.2 Sistemas por aquecimento condutivo.....	36
4.2.1 Validação dos procedimentos no sistema condutivo.....	37
4.2.1.1 Efeito de matriz.....	37
4.2.1.2 Precisão.....	38
4.2.1.3 Limites de Detecção e Quantificação.....	41
4.2.1.4 Exatidão.....	42
4.2.2 Aplicação do procedimento em placa aquecedora.....	43
4.2.3 Aplicação do procedimento em bloco digestor.....	44
4.3 Sistemas assistidos por radiação microondas.....	47
4.3.1 Validação do procedimento de decomposição por forno de microondas focalizadas.....	47
4.3.1.1 Efeito de matriz.....	47
4.3.1.2 Precisão.....	49
4.3.1.3 Limites de Detecção e Quantificação.....	49
4.3.1.4 Exatidão.....	50
4.3.2 Padrão interno.....	50
4.3.3 Aplicação do procedimento em forno de microondas com radiação focalizada.....	51
4.4 Aplicação do procedimento de decomposição por via seca.....	57



4.5	Comparação entre os três procedimentos de decomposição estudados. ....	58
4.6	Resultados para a determinação de ferro em amostras de proteína texturizada de soja empregando microssistemas .....	62
4.6.1	Ensaio preliminares .....	62
4.6.2	Construção de um novo microssistema alterando a configuração.....	65
4.6.3	Construção de um novo microssistema alterando as dimensões.....	69
4.6.3.1	Estudos com configuração em linha única .....	69
4.6.3.2	Estudos admitindo configuração em confluência.....	71
<b>CAPÍTULO 5</b>	.....	<b>73</b>
<b>5.0</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>74</b>
<b>5.1</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>77</b>

# *Capítulo 1*

---

## **Introdução**

## 1.0 INTRODUÇÃO

A instrumentação analítica para análise de alimentos tem avançado significativamente na última década com destaque para técnicas como espectrometria de massas (MS), espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES), ressonância magnética nuclear (RMN) e técnicas de espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica e com chama [1]. Destas técnicas, a espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) vem sendo constantemente aplicada devido a vantagens como alta sensibilidade e precisão, bem como análise multielementar simultânea.

A importância da quantificação de macro e micro nutrientes, assim como a de elementos traços em alimentos, está associada à evidente necessidade de implementação de nutrientes essenciais na dieta, além do controle da composição mineral dos alimentos e prevenção de quaisquer distúrbios no organismo causados pela ingestão excessiva de determinados elementos.

No presente trabalho será apresentada uma discussão sobre procedimentos de decomposição de amostras de proteína texturizada de soja em diferentes granulometrias.

### 1.1 A Soja

A soja (*Glycine Max (L.) Merrill*) é uma planta herbácea originada de espécies de plantas rasteiras que se desenvolviam no oeste da Ásia, especificamente na China. A sua evolução teve início com cruzamentos de espécies de soja selvagem, e sua importância na dieta alimentar daquela época era ímpar, a tal ponto de se realizar rituais sagrados nas vésperas da semeadura e colheita [2].

A soja é pertencente à família das leguminosas, assim como o feijão, lentilha, grão de bico, ervilha, destacando-se por sua riqueza nutricional com destaque para as proteínas, lipídeos, fibras, vitaminas A, C, E e do complexo B, além de elementos como cálcio, fósforo, ferro e potássio. Em adição ao expressivo teor protéico, o referido vegetal é rico em substâncias antioxidantes pertencentes à classe dos isoflavonóides, que, entre outros benefícios, previnem o surgimento de tumores nas glândulas mamárias e atenuam os efeitos da menopausa, atuando também na prevenção contra complicações cardiovasculares [3].

Somente a partir de 1920, o ocidente iniciou o cultivo da soja, sendo os EUA os pioneiros em termos de exploração comercial. Desde 1941, a produção de grãos vem crescendo exponencialmente [4].

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 [5].

A partir da década de 60 o cultivo de soja consolidava-se como uma das principais culturas do agronegócio brasileiro, atingindo a produção de 130 milhões de toneladas de grãos na safra 2006/2007 [6], que corresponde hoje por 20% da produção mundial de soja. A Região Centro-Oeste produz cerca de 50% da produção nacional e estima-se que nos próximos dez anos terá que aumentar sua produção em 63% para atender a atual demanda nacional e internacional [7].

No Estado da Bahia, a produção de soja concentra-se na região oeste, com produção estimada de 59,6 milhões de toneladas para o ano de 2008 [8], destacando-se o município de São Desidério, classificado como um dos dez municípios de maior produção de soja [9].

## **1.2 A Proteína Texturizada de Soja**

Os grãos da soja são ricos em proteínas, carboidratos e elementos essenciais, e destes grãos derivam-se o farelo, o óleo, o missô e o extrato, que por sua vez originam produtos como leite de soja, alimentos infantis à base de soja, farinha de soja, biscoitos, tofus e proteína texturizada de soja.

As proteínas constituem um componente essencial das células e do processo biológico de uma forma geral. Dentre suas múltiplas funções, são responsáveis pelo controle das condições intra e extracelular, além de fornecerem aminoácidos responsáveis pela formação dos músculos e de outros constituintes essenciais como enzimas, imunoglobulinas e hormônios.

As proteínas vegetais são entre si diferentes no que diz respeito ao aspecto nutricional, sendo as proteínas de soja as únicas a apresentar qualidade protéica muito semelhante à da carne. A proteína de soja é encontrada essencialmente sob a forma de proteína texturizada, concentrada e isolada de soja, e, por isso, apresenta-se muito versátil nas aplicações alimentares.

Os grãos de soja contêm cerca de 40% de proteína vegetal, e a importância nutricional deste item tem sido enfatizada na avaliação dos inúmeros produtos derivados do grão de soja [10].

Devido à sua grande aplicabilidade na indústria alimentícia, estes grãos foram inicialmente processados na forma de proteína texturizada, concentrada e isolada de soja. Atualmente, a proteína texturizada de soja (PTS) tem sido utilizada como substituto da carne

e subprodutos. A redução do colesterol e prevenção de distúrbios cardíacos têm sido associadas ao consumo de proteína de soja, justificando o interesse de indústrias no desenvolvimento de produtos à base de soja como barras de cereais, biscoitos, chocolates e bebidas. Dentre as principais características da PTS, é conveniente inferir sobre o seu elevado conteúdo protéico e custo reduzido do produto quando comercializado.

A PTS é produzida a partir da farinha desengordurada de soja por um processo chamado extrusão termoplástica. O teor de proteínas presente nos produtos comerciais de PTS é de 50% a 52%. Uma das etapas mais importantes na produção da proteína texturizada corresponde à secagem, etapa esta necessária para promover o decréscimo da umidade até o nível requerido. O objetivo da desidratação de alimentos consiste em se promover a inibição da degradação causada pelo crescimento de bactérias e fungos [10].

### **1.3 Procedimentos para decomposição de amostras de soja e derivados.**

A manutenção dos padrões de qualidade da soja e derivados requer, obrigatoriamente, o monitoramento da composição química mediante a implantação de metodologias analíticas adequadas. A necessidade de adoção de tais procedimentos está vinculada ao alcance dos níveis internacionais de qualidade necessários para garantir o controle da saúde alimentar da população, no que se refere à presença de nutrientes e/ou de espécies potencialmente tóxicas para o consumo humano.

No campo da avaliação nutricional da soja e de seus sub-produtos, 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 [11]. Portanto, a quantificação dos referidos elementos na constituição dos itens alimentares à base de soja, produzidos e/ou comercializados na Bahia, 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 conseqüente aparecimento de enfermidades diversas incluindo perdas de fertilidade, falência múltipla dos órgãos, disfunções psíquicas e formação de tumores [12].

No que se refere à quantificação de nutrientes inorgânicos em amostras de alimentos, as técnicas analíticas que relacionam espectroscopia atômica são sem dúvida as mais apropriadas [13].

Para a determinação das espécies químicas de interesse se faz necessária a oxidação da matéria orgânica presente nas amostras, numa etapa de tratamento prévio da amostra, sendo esta etapa essencial para a aplicação das técnicas de espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) 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 [14].

Matrizes como a soja e/ou derivados devem passar por etapas de decomposição agressivas no intuito de eliminar a expressiva fração orgânica. Deve-se salientar que dissoluções mal sucedidas implicam sérios erros pelo fato dos analitos não serem totalmente disponibilizados para posteriores detecções.

A etapa de pré-tratamento da amostra é a fase na qual maior número de erros é cometido e mais tempo é consumido. A escolha apropriada de reagentes e do procedimento adequado para a decomposição e dissolução é um aspecto decisivo para o sucesso de uma análise, e para tanto, são utilizados comumente dois tipos de procedimentos para decomposição: via seca e via úmida.

O procedimento de decomposição por via seca é considerado simples e ainda muito utilizado por apresentar vantagens, tais como: utilização de maior massa de amostras, controle de contaminações advindas dos reagentes empregados e elevada eficiência de decomposição de matrizes orgânicas como os alimentos. Entretanto, existem sérias limitações com relação à perda de elementos voláteis como selênio, enxofre, mercúrio e chumbo, maior risco de contaminação promovida pelas correntes de convecção geradas no interior aquecido das muflas e tempo de análise longo, o que configura a necessidade da busca de alternativas mais viáveis para a etapa de preparo da amostra [15].

Os procedimentos de decomposição de via úmida apresentam-se como uma interessante alternativa de decomposição de amostras na qual são empregados ácidos para a destruição da matéria orgânica sob temperaturas elevadas, embora exigindo temperaturas inferiores àquelas usadas na via seca, uma vez que a oxidação da fração orgânica das amostras se efetua pela adição de agentes oxidantes diversos. Este procedimento é muito eficiente, permitindo a combinação de ácidos oxidantes com outros agentes oxidantes similarmente eficazes para degradação completa ou parcial da matéria orgânica presente nas amostras. Quanto à forma de operação, os procedimentos por via úmida são classificados como convencionais e assistidos por radiação microondas. Os primeiros fundamentam-se no uso de superfícies eletricamente aquecidas, notadamente as chapas aquecedoras e os blocos digestores, ao passo que as microondas podem ser utilizadas em fornos focalizados ou de alta pressão. O modo convencional (ou convectivo) de aquecimento, embora apresente custos reduzidos, não possui eficiências aceitáveis para amostras contendo altos teores de gordura e de moléculas mais complexas. Tal

comportamento é devido ao fato das decomposições ocorrerem em ambientes submetidos à pressão atmosférica e das temperaturas de operação se encontrarem limitadas aos pontos de ebulição dos reagentes. Ademais, os frascos reacionais são confeccionados de vidro ou teflon com má condução térmica, o que confere morosidade e elevado consumo de ácidos [16].

A utilização de microondas promove o movimento acelerado e quantizado das moléculas de água em torno de seu eixo (cerca de 4,9 bilhões de vezes por segundo, na frequência de 2450 MHz) [14], assim como a migração iônica no seio da solução reacional como resultado da aplicação do campo eletromagnético. Ambos os fenômenos induzem a liberação de grandes quantidades de energia calorífica, caracterizando um aquecimento na direção do meio reacional para o meio externo em oposição ao perfil de aquecimento convencional. Os principais resultados englobam excepcional diminuição do tempo de decomposição, economia de reagentes e decomposições completas.

#### **1.4 Utilização de Microssistemas para a Determinação de Ferro**

A análise por injeção em fluxo (FIA) tem sido exaustivamente investigada nos últimos 30 anos representando um considerável avanço quando o contexto se refere à automação em química analítica. O sistema de análise por injeção em fluxo é facilmente adaptável à maioria das técnicas espectrométricas empregadas para detecção de diversos metais como Cu, Al, Zn e Fe [17,18].

O método mais popular empregado para a determinação de ferro em matrizes diversas consiste na medição da absorvância do complexo Fe(II) – 1,10-fenantrolina, em 512 nm. O complexo estável é formado na faixa de pH de 2 – 9 e, quando é necessária a determinação do ferro total, faz-se o uso de cloridrato de hidroxilamina ou ácido ascórbico como redutores para o ferro (III) presente na amostra [19].

A contribuição do ferro, no que diz respeito ao desenvolvimento do corpo humano é notável. Este elemento é essencial na síntese da hemoglobina e muito importante como ativador metálico para inúmeras enzimas, constatando-se, neste contexto, a existência de numerosos trabalhos publicados sobre a determinação deste metal. Entre as técnicas analíticas mais empregadas na determinação de ferro, aquelas fundamentadas em espectrometria atômica e espectrofotometria de absorção molecular merecem destaque, notadamente quando acopladas a sistemas de análise em fluxo. Este acoplamento confere uma série de vantagens analíticas, tais como: facilidade de automatização inerente a própria concepção do processo, economia de reagentes, minimização de contaminações, alta frequência analítica, além da facilidade de adaptação com diversos modelos de detectores

[20,21]. Além das vantagens anteriormente descritas, os sistemas de análise em fluxo contínuo devem oferecer características de compacticidade e portabilidade.

A técnica analítica denominada de “micro total analytical system”,  $\mu$ TAS (também conhecida como lab on a chip) é explorada desde a década de 90 e define-se como um procedimento rápido, de alta sensibilidade e com pequena quantidade de resíduos gerada. Isto implica a miniaturização de todos os parâmetros envolvidos na análise química, como exemplo a amostragem, minimização do consumo de reagentes e redução do tamanho de canais de mistura e de reação [22].

Sob esta perspectiva, o presente trabalho contempla o desenvolvimento de um sistema miniaturizado de análise por injeção em fluxo para a determinação de ferro em amostras de proteína texturizada de soja.

## **1.5 Objetivos**

### **1.5.1 Objetivo Geral**

Avaliar o teor de elementos essenciais e não essenciais em amostras de proteína texturizada de soja comercializadas no Estado da Bahia.

### **1.5.2 Objetivos Específicos**

- 1) Comparar diferentes procedimentos de preparo de amostras de soja e derivados: via seca; decomposição por via úmida convencional e aquecimento por via úmida assistida por microondas;
- 2) Acompanhar a eficiência de decomposição dos diferentes procedimentos acima descritos via análises dos digeridos por espectrometria de emissão óptica por plasma indutivamente acoplado (ICP OES), quanto à presença dos nutrientes Ca, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, P e Zn e dos elementos Al, Cd e Pb, potencialmente tóxicos.
- 3) Validar o método selecionado através do estabelecimento das figuras de mérito: limites de detecção e de quantificação, faixa dinâmica linear, efeito de matriz, precisão e exatidão.
- 4) Determinar os teores de elementos essenciais e não essenciais nas amostras coletadas utilizando a metodologia analítica previamente selecionada.
- 5) Determinar o teor de ferro presente em amostras de proteína texturizada de soja após decomposição em forno de microondas com radiação focalizada, empregando, para tanto, sistemas miniaturizados de análise por injeção em fluxo.



# *Capítulo 2*

---

## **Revisão Bibliográfica**

## 2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Procedimentos para avaliação da composição de amostras de soja e derivados

Na literatura são encontrados alguns trabalhos científicos que relatam procedimentos para a determinação da composição de amostras de soja e derivados. Estes trabalhos são descritos a seguir.

Um estudo sobre a avaliação de 26 elementos químicos em amostras de formulações infantis à base de leite e de soja, nos Estados Unidos, Reino Unido e Nigéria, foi executado por IKEMA et al. (2002) [23], os quais empregaram radiação microondas para a decomposição das amostras e, posteriormente, a técnica ICP OES para a detecção dos analitos. Elementos essenciais como Ca, Fe, Na e Zn e não essenciais como As, Cd, Pb e Sn foram determinados por ICP OES após decomposição em forno de microondas (com cavidade) de aproximadamente 0,5 a 1,0 g de massa de amostra. Para tanto, foram utilizados 7 mL de ácido nítrico e 3 mL de água deionizada, o que proporcionou temperaturas de até 170°C. Quando amostras do NIST foram analisadas, os valores encontrados para a concentração dos analitos investigados, em sua maioria, apresentaram-se concordantes com as tabelas de certificação.

FOSTER et al. (1996) [24] determinaram o conteúdo de selênio disponível em leite de soja e formulações infantis à base de soja, no Reino Unido, por espectrometria de absorção atômica com geração de hidreto. Massas de amostra de 0,25 g e volumes de 1,0 mL foram colocados em tubos de decomposição de vidro juntamente com 10 mL de ácido nítrico em temperatura ambiente para decomposição *overnight*. Em seguida, foram efetuados procedimentos que utilizaram ácido perclórico e nítrico para a completa decomposição das amostras. Para o leite de soja, foram encontrados níveis de Se entre 0,011 e 0,040  $\mu\text{g g}^{-1}$  e, entre 0,023 e 0,089  $\mu\text{g g}^{-1}$ , para fórmulas infantis à base de soja. Não foram encontradas interferências de matriz e a média de recuperação encontrada foi em torno de 100,1%.

A composição química e a qualidade de proteínas em grãos de soja e subprodutos comercializados em cinco países produtores foram devidamente avaliadas por KARR-LILIENTHAL et al. (2004) [25]. O conteúdo mineral foi avaliado de acordo com o método recomendado pela AOAC, com detecção por ICP OES. A composição mineral das amostras de soja e derivados foi efetuada na Argentina, Brasil, China, Índia e Estados Unidos, de modo que os macro nutrientes avaliados como cálcio, fósforo, magnésio e sódio apresentaram valores similares dentre os países, demonstrando concordância com valores recomendados. Entretanto, os valores encontrados para os micronutrientes como alumínio,

cobre, ferro e zinco nas amostras não apresentaram uniformidade dentre os países selecionados. Provavelmente, o motivo de tal discrepância está relacionado ao conteúdo mineral presente no solo ou a questões de biodisponibilidade dos analitos.

Produtos de soja comercialmente disponíveis como leite de soja, farinha de soja, proteína texturizada e fórmulas infantis à base de soja foram avaliados por GARCIA et al. (1998) [26] e o conteúdo protéico, assim como a quantidade de alguns íons metálicos a exemplo de cálcio, cobre, ferro e zinco, foram determinados. Para a decomposição das amostras foram utilizadas metodologias analíticas dentre as sugeridas pela AOAC de modo que, para a maioria das amostras, foi utilizado o método recomendado para a farinha de soja. Para a determinação dos íons metálicos uma massa de aproximadamente 1 g de amostra foi pesada e submetida à decomposição utilizando ácido nítrico e peróxido de hidrogênio 30% (m/v) para posterior determinação dos analitos por FAAS e FAES. A concentração de cobre encontrada foi mínima para todas as amostras, ao passo que a concentração de potássio constatada foi a maior dentre os íons metálicos avaliados, com destaque para o leite de soja que apresentou os maiores teores para os íons metálicos em estudo. Os valores encontrados sugerem que a ingestão de subprodutos de soja satisfaz as necessidades diárias para os elementos: Ca, Cu, Fe, K e Zn.

FERNANDEZ e colaboradores (2002) [27] realizaram 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. O procedimento de decomposição das amostras para a determinação dos referidos elementos químicos envolveu a pesagem de aproximadamente 0,1 g das amostras e posterior adição de 20 mL de ácido nítrico concentrado e 1 mL de ácido perclórico concentrado, submetendo o sistema à chapa aquecedora, até a temperatura de 150°C, sob refluxo durante a noite. 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.

Em estudo realizado por HSEU (2004) [28], 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 quantificação por espectrometria de absorção atômica. Dentre os procedimentos avaliados, três deles foram executados em bloco digestor utilizando HNO<sub>3</sub>; HNO<sub>3</sub>/HClO<sub>4</sub> e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como estratégia para cada um dos três procedimentos, respectivamente. O volume de HNO<sub>3</sub> utilizado nos procedimentos correspondeu a 10 mL, enquanto que os volumes empregados de HClO<sub>4</sub> e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> corresponderam a 5 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 devido à recuperação obtida, custo e tempo de execução.

KEVIN et al. (2004) [29] investigaram o conteúdo de Mn em bebidas à base de soja, objetivando posterior comparação ao teor deste elemento encontrado em formulações infantis à base de soja. As amostras foram submetidas à incineração à 450°C utilizando HNO<sub>3</sub> como agente oxidante, e 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. A concentração de Mn em bebidas à base de soja encontrada correspondeu a  $16,5 \pm 8,6 \mu\text{g g}^{-1}$  para 36 amostras, valor este muito superior ao valor encontrado para a concentração de Mn em formulações infantis à base de soja que correspondeu a  $2,4 \pm 0,7 \mu\text{g g}^{-1}$ . 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 graves.

O conteúdo de Se em amostras de leite materno e formulações infantis à base de soja foi avaliado por TORRES e colaboradores (1999) [30]. As amostras foram digeridas em forno de microondas com cavidade utilizando 2 mL ou 0,3 g de amostra, utilizando 1,5 mL de HNO<sub>3</sub> e 0,25 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. 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 espectrometria de absorção atômica com geração de hidreto. A concentração encontrada para Se, em formulações infantis à base de soja, variou de 2,7 a 9,6 ng mL<sup>-1</sup> em contraste com a concentração encontrada em amostras de leite materno que correspondeu a  $11,4 \pm 3,7 \text{ ng mL}^{-1}$ . A administração de formulações infantis à base de soja na dieta de crianças de até 6 meses de idade corresponde a uma deficiência diária de cerca de 10 µg de selênio com relação ao nível recomendado.

PLESSI e colaboradores (1997) [31] determinaram Al e Zn em fórmulas infantis à base de soja por ETAAS e por FAAS, respectivamente. As amostras sólidas foram submetidas à decomposição em forno de microondas com cavidade. Aproximadamente, 0,3 g de amostra foram digeridos em 3,0 mL de HNO<sub>3</sub> 70 % (v/v). O programa de aquecimento foi implementado em um tempo total de 9 min e os digeridos foram diluídos para 25,0 mL com água ultrapura. O método foi validado com material de referência certificado NIST SRM 1549 e NIST SRM 1548 e os resultados obtidos foram concordantes ao nível de confiança de 95 %, aplicando-se o teste t -Student.

Um método para a determinação de Al em alimentos comercializados na China, dentre estes grãos de soja e molho de soja, por espectrometria de absorção atômica com

forno de grafite é descrito por WANG et al. (1991) [32]. As amostras foram digeridas mediante utilização de uma mistura de  $\text{HNO}_3$  e  $\text{HClO}_4$  (5:1) com aquecimento em chapa aquecedora. A faixa linear de calibração foi definida entre 0,24 e 250 ng. O limite de detecção encontrado para o Al correspondeu a 0,24 ng. A exatidão do método foi avaliada pela utilização de material de referência certificado, e testes de recuperação foram efetuados, de modo que a recuperação média obtida assumiu valores entre 86 e 111%. A concentração de Al encontrada em grãos de soja correspondeu a  $24,1 \mu\text{g g}^{-1}$ , de modo que o consumo diário de 500 g deste produto corresponde à ingestão diária de cerca de  $10 \mu\text{g}$  de alumínio.

## **2.2 O emprego de microssistemas para a determinação de metais**

Em função das vantagens das análises em fluxo conduzidas em sistemas miniaturizados, a busca pelo desenvolvimento e/ou aperfeiçoamento de novos sistemas assumem posição estratégica na Química Analítica. Nos parágrafos seguintes, encontra-se uma revisão de literatura sobre o uso de sistemas miniaturizados na quantificação de metais em diferentes matrizes.

Um microssistema de análise por injeção em fluxo com detecção fotométrica é descrito por FONSECA et al. (2007) [33]. Canais medindo 205-295  $\mu\text{m}$  de profundidade e 265-290  $\mu\text{m}$  de largura foram construídos empregando a técnica de fotolitografia profunda em resina à base dos oligômeros uretana e acrilato. Fibras ópticas foram acopladas nas extremidades de uma cela integrada com 5,0 mm de comprimento, a qual foi utilizada como caminho óptico, e adaptadas ao sistema no intuito de conduzir a radiação emitida por um LED com máximo de emissão em 500 nm até a cela integrada, e desta até o detector de um fotômetro "home-made". O microssistema foi configurado em linha única e foi avaliado para a determinação de cloreto em amostras de água, e Cr (VI) em amostras de água residual e cromo total em ligas metálicas. Para a determinação de cloreto foram empregadas micro-bombas, enquanto que para a determinação de cromo foi empregada uma bomba peristáltica convencional para a propulsão dos líquidos. Os resultados obtidos para todas as determinações não diferiram significativamente, ao nível de 95% de confiança, quando comparados aos métodos de referência.

KRUANETR et al. [22] implementaram um sistema miniaturizado de análise por injeção em fluxo num chip de polimetil metacrilato (PMMA). Os micro canais foram construídos por ablação a laser e selados com um molde de polidimetilsiloxano (PDMS). O micro sistema fabricado foi acoplado a um sistema óptico de detecção e posteriormente aplicado para a determinação de ferro em amostras de água. A detecção foi baseada na reação entre Fe(III) e o sal nitroso-R em tampão acetato (pH 5). O sistema em miniatura proposto consome

pequena quantidade de reagente, num fluxo de geração de descarte estimado em 2,0 mL h<sup>-1</sup>. O valor obtido para o desvio padrão relativo (RSD%) foi menor que 2% (n=11) com recuperação de 98,7 ± 0,12 (n=5). Os valores para o limite de detecção e de quantificação corresponderam a 0,021 µg mL<sup>-1</sup> e 0,081 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente, com uma frequência analítica de 40 h<sup>-1</sup>.

Em outro trabalho, AL-GAILANE et al. [34] construíram um sistema miniaturizado numa base de vidro e polidimetilsiloxano (PDMS) para aplicação na determinação de ferro em águas fluviais. Foram estudadas duas configurações no que diz respeito à propulsão dos fluidos e à reação quimioluminescente altamente sensível entre luminol e peróxido de hidrogênio, na presença de ferro. Uma fotomultiplicadora foi utilizada para a detecção da luz azul emitida em 440 nm e, para ambas as configurações, foram obtidos valores de precisão adequados, além de repetibilidade e exatidão consideráveis (limites de detecção entre 5,1 e 28 ng mL<sup>-1</sup>).

RAINELLI et al. [35] desenvolveram um sistema miniaturizado com canais em *cross-section*, profundidade de 150 µm, largura entre 180 e 360 µm e volume de injeção de 3,75 µL, o qual foi aplicado para determinação de Fe(II) e comparado com o desempenho de um sistema FIA convencional. Fibras ópticas foram usadas para detecção, e foi constatado um consumo de reagente de 10 µL min<sup>-1</sup>. A reprodutibilidade relativa obtida foi de 1,1% (n=6).

# *Capítulo 3*

---

## **Parte Experimental**

## **3.0 PARTE EXPERIMENTAL**

### **3.1 Limpeza do material**

Toda a vidraria utilizada para os experimentos foi descontaminada em banho de HNO<sub>3</sub> 10% (v/v) por, no mínimo 24 h, e, em seguida, lavadas com água deionizada e posteriormente com água ultrapura com resistividade específica de 18,2 MΩ cm<sup>-1</sup>, obtida mediante o emprego de um sistema de purificação Milli-Q<sup>®</sup> (Millipore, Bedford, MA, USA).

### **3.2 Amostras e reagentes**

#### **3.2.1 Amostras e reagentes para avaliação dos procedimentos de decomposição**

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico. Os digeridos das amostras foram obtidos utilizando os seguintes reagentes: ácido sulfúrico (Merck), ácido nítrico (Merck), peróxido de hidrogênio (Merck).

A solução multielementar contendo 50,0 mg L<sup>-1</sup> de Al, Cd, Cr, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn foi preparada por diluição adequada, em água, das soluções estoques de cada um dos elementos a 1000,0 mg L<sup>-1</sup> (todas da marca Qhemis).

A solução multielementar contendo 100,0 mg L<sup>-1</sup> de Ca, K, Mg, Na e P foi preparada por diluição em água da solução estoque de 1000,0 mg L<sup>-1</sup> de Ca (Qhemis), K (Merck), Mg (Merck), Na (Merck) e P (Merck).

Para a determinação de carbono residual foram preparadas soluções de trabalho a partir de uma solução estoque de uréia (500,0 mg L<sup>-1</sup>).

As amostras de proteína texturizada de soja foram adquiridas em supermercados locais.

#### **3.2.2 Amostras e reagentes para estudos com microssistemas**

Todos os reagentes utilizados neste estudo foram de grau analítico. Os reagentes empregados foram: Ácido ascórbico (Merck), Ácido Acético (Merck), Citrato de Sódio (Merck), Sulfato de Sódio (Merck), 1-10-fenantrolina (Merck).

A solução multielementar contendo 500,0 mg L<sup>-1</sup> de ferro (II) foi preparada pela adequada dissolução de sulfato ferroso amoniacal hexahidratado ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O) (Vetec) para o preparo das posteriores soluções de trabalho. Semelhantemente, a solução



multielementar contendo 500 mg L<sup>-1</sup> de ferro (III) foi preparada pela adequada dissolução de sulfato férrico amoniacal (FeNH<sub>4</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·12H<sub>2</sub>O) (Vetec) para o preparo das posteriores soluções de trabalho.

Foi utilizada uma resina foto-sensível à base dos oligômeros uretana e acrilato para a construção dos microsistemas, sendo esta adquirida através da Carimbo Medeiros Ltda (Macdermid, trademark Flexlight M050).

### 3.3 Instrumentação

#### 3.3.1 ICP OES

O equipamento empregado para determinação dos analitos de interesse neste trabalho é descrito a seguir:

Espectrômetro de emissão óptica com plasma de argônio indutivamente acoplado (VARIAN, Mulgrave, Austrália) simultâneo, com arranjo axial e detector do estado sólido (Figura 1). O sistema óptico do ICP OES foi calibrado com solução estoque multielementar enquanto que para o alinhamento óptico utilizou-se uma solução contendo Mn 5,0 mg L<sup>-1</sup>. As linhas espectrais foram selecionadas de acordo com a ausência de interferências espectrais e sensibilidade adequada para a determinação de elementos em baixas e altas concentrações, mediante estudo de linhas de emissão dos elementos a serem investigados. A Tabela 1 mostra as condições experimentais utilizadas nos experimentos.

**Tabela 1. Condições experimentais utilizadas no equipamento de ICP OES com configuração axial**

<b>Potência RF (kW)</b>	1,3
<b>Vazão do gás de nebulização (L min<sup>-1</sup>)</b>	0,70
<b>Vazão do gás auxiliar (L min<sup>-1</sup>)</b>	1,5
<b>Vazão do gás do plasma (L min<sup>-1</sup>)</b>	15
<b>Tempo de integração (s)</b>	1,0
<b>Tempo de estabilização (min)</b>	15
<b>Tempo de leitura (min)</b>	1
<b>Replicatas</b>	3
<b>Nebulizador</b>	<b>Concêntrico</b>
<b>Câmara de Nebulização</b>	<b>Ciclônica</b>

Linhas Espectrais (nm)	Al	(II)	C	(I)	Ca	(II)
	396,152		193,024		396,847	
	Cd	(II)	Co	(II)	Cu	(I)
	226,502		238,892		327,398	
	Cr	(II)	Fe	(II)	K	(I)
	267,716		238,203		766,468	
	Mg	(II)	Mn	(I)	Na	(I)
	280,267		257,611		589,592	
	Ni	(II)	P	(I)	Pb	(II)
	231,604		177,434		220,354	
	Zn	(I)	Y <sup>(a)</sup>	(II)		
	213,858		371,029			

<sup>(a)</sup> elemento utilizado com padrão interno (1,0 mg L<sup>-1</sup>) em todas as análises no ICP OES.

(I) linha de emissão atômica

(II) linha de emissão iônica



Figura 1. ICP OES (Vista Pro, Varian) e tocha na configuração axial

### 3.3.2 Equipamento para decomposição por via seca

Um forno mufla Quimis modelo Q318S, microprocessado com rampa e patamar (Figura 2) foi utilizado para a decomposição de amostras de proteína texturizada de soja por incineração, fazendo o uso de cadinhos de porcelana como recipiente de amostra para a utilização no forno.



**Figura 2. Forno Mufla Q318S**

### **3.3.3 Equipamentos para a decomposição de amostras por aquecimento condutivo**

Os equipamentos empregados para a decomposição de amostras de proteína texturizada de soja por aquecimento condutivo foram: chapa aquecedora Quimis modelo Q313A (Figura 3), fazendo uso de erlenmeyers como recipiente de amostra e bloco digestor Quimis TE-040/25 com controlador de temperatura analógico e capacidade para 40 microtubos em borossilicato, com dimensões de 25 x 250 mm (Figura 4).



**Figura 3. Chapa Aquecedora Q313A**



**Figura 4. Bloco digestor TE-040/25**

### **3.3.4 Equipamento para decomposição de amostras por radiação microondas**

Um forno de microondas com radiação focalizada (Figura 5), com duas cavidades e operando à pressão atmosférica (STAR 2, CEM, Matthews, N.C., EUA) foi empregado para decomposição de amostras de proteína texturizada de soja. Como recipiente para a amostra foram utilizados tubos de quartzo adequados, devidamente acoplados a condensadores também de quartzo, promovendo o refluxo dos vapores ácidos durante a decomposição.



**Figura 5. Forno de microondas com radiação focalizada STAR 2, CEM, Matthews, N.C., EUA**

### 3.3.5 Microssistemas

Uma fotoexpositora comercial (Fotolight-MD2-A4, Carimbos Medeiros Ltda, Brasil) contendo dois conjuntos de quatro lâmpadas de mercúrio (black light F15W T12 Sylvania) foi empregada para a exposição da resina à radiação UV (Figura 6), visando a construção do microssistema para determinação de ferro, de acordo com o procedimento descrito na Figura 8.

O desenho da fotomáscara, o qual define a configuração em fluxo do microssistema, construído mediante uso do software AutoCad (2002), foi devidamente impresso na resolução de 1200 dpi em transparência adequada, utilizando uma impressora à laser (HP LaserJet 1300). Na etapa de revelação do substrato foi utilizado um banho ultrasônico (Branson model 2210).

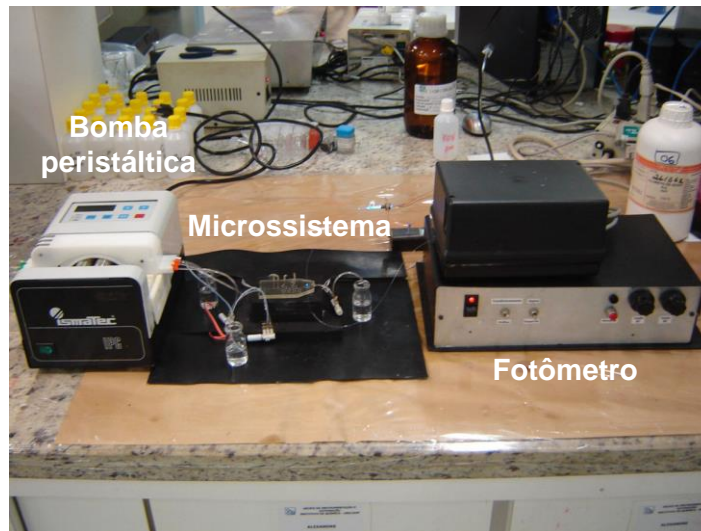
Os reagentes foram propulsionados para o microssistema através de uma bomba peristáltica (Ismatec model ISM 931). O software utilizado para a aquisição dos dados, através de uma interface paralela PCI-9111DG/HR (Adlink Tech. Inc.), foi escrito em Microsoft Visual Basic 5.0.

A detecção do ferro foi obtida mediante detector (fotodiodo RS 308-067) de um fotômetro “home-made”.

A figura 7 ilustra a fotografia de funcionamento do microssistema, considerando a propulsão dos fluidos por bomba peristáltica e detecção com fotômetro “home-made”.



Figura 6. Fotoexpositora utilizada para a exposição do substrato à radiação UV



**Figura 7. Fotografia de funcionamento do sistema miniaturizado para análise por injeção em fluxo**

### **3.4 Construção do microsistema para determinação de ferro**

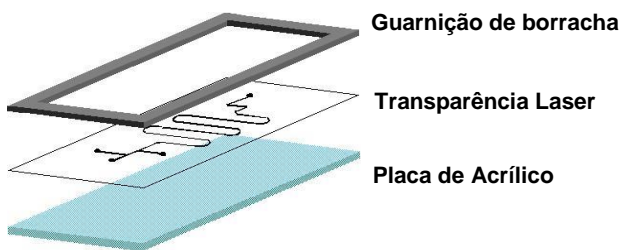
O microsistema para aplicação em análise por injeção em fluxo foi construído empregando-se a técnica de fotolitografia profunda no ultravioleta sobre a resina polimérica foto-sensível baseada nos oligômeros uretana e acrilato (UA) [36]. O processo fotolitográfico de construção descrito por Fonseca et al. [33] foi empregado para o desenvolvimento do microsistema empregado neste trabalho para a determinação de ferro em amostras de proteína texturizada de soja (Fig. 8a).

De acordo com o procedimento descrito, inicialmente, a resina foto-sensível foi espalhada sobre um molde de acrílico contendo a fotomáscara construída em transparência laser (Fig. 8b), a qual contém a configuração de fluxo para o microsistema, definindo a espessura de 2,0 mm para cada camada construída. Uma outra placa de acrílico foi disposta sobre a anterior (Fig. 8c) e a utilização de grampos adequados promoveu a vedação entre as placas.

Na seqüência, a resina foto-sensível foi submetida à radiação ultravioleta em duas etapas. A etapa inicial (Fig. 8d) consistiu na incidência de radiação UV sobre o lado onde não existe a sombra da máscara no polímero. A exposição nesta etapa foi realizada por 75 s ( $360 \text{ mJ cm}^{-2}$ ), sendo esta necessária para a criação do fundo dos canais. A segunda etapa (Fig. 8e) consistiu na exposição do conjunto à radiação UV por 85 s ( $410 \text{ mJ cm}^{-2}$ ) para que a configuração disposta na máscara fosse impressa na resina. Após esta etapa, o conjunto foi imerso numa solução aquosa comercial de detergente (5%, v/v) e submetido à sonicação em banho ultrasônico por 10 min. para a remoção da região não polimerizada da resina. A

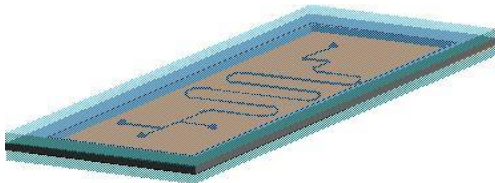
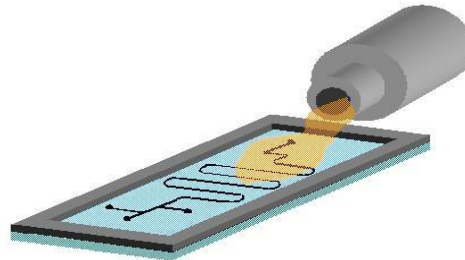
próxima etapa consistiu na construção de uma cobertura superior para a formação dos canais e selagem do sistema, cobertura esta construída de acordo com o procedimento anteriormente descrito, à exceção que, desta vez, não se utilizou uma máscara em transparência. A exposição à radiação UV durou 135 s (dose de  $650 \text{ mJ cm}^{-2}$ ). Na seqüência, a camada superior foi colocada em contato com a camada contendo os canais para que, após a exposição à radiação UV por 20 min ( $5,8 \text{ J cm}^{-2}$ ) sob fluxo contínuo de nitrogênio, a selagem entre as camadas ocorresse de maneira irreversível.

O acesso ao interior do microssistema pelos canais foi obtido com a utilização de agulhas de seringa hipodérmica (305111 – BD™), com diâmetro de 0,45 mm. Fibras ópticas plásticas com  $250 \mu\text{m}$  de diâmetro (Toray, UK) foram acopladas nas extremidades de uma cela integrada com 5,0 mm de comprimento, a qual foi utilizada como caminho óptico, e adaptadas ao sistema no intuito de conduzir a radiação emitida por um LED com máximo de emissão em 500 nm até a cela integrada e desta até o detector (fotodiodo RS 308-067) de um fotômetro “home-made” [36].



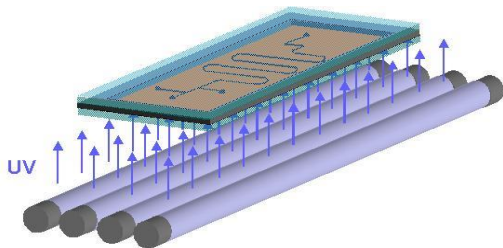
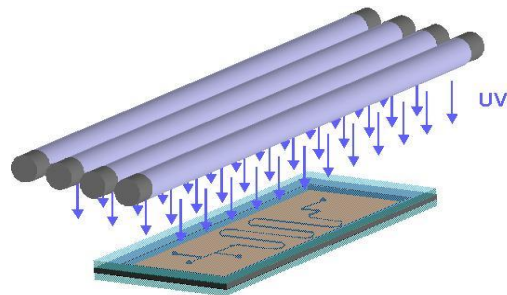
A) Para receber a resina, uma base é construída unindo-se uma guarnição de borracha, uma transparência contendo o "layout" do sistema e uma placa de acrílico.

B) A resina é espalhada sobre a base e as bolhas, quando presentes, são eliminadas com o auxílio de uma agulha.



C) Outra placa de acrílico é colocada sobre a base contendo a resina, e o excesso de monômero é eliminado com ajuda de um algodão umedecido em álcool.

D) A exposição à radiação UV é realizada inicialmente por cima, de modo que a transparência não faça sombras sobre o polímero.



E) Em seguida, expõe-se o conjunto pelo lado oposto, de modo que os canais possam ser gravados.

Figura 8. Procedimento detalhado da construção do microssistema utilizando a resina foto-sensível à base dos oligômeros uretana e acrilato. (A) esquema do molde e da transparência a Laser, (B) deposição da resina foto-sensível sobre o molde, (C) fechamento do conjunto, (D) exposição durante 75 s, (E) exposição durante 85 s



### 3.5 Estudo de linhas de emissão e avaliação da utilização de padrão interno nas medidas por ICP OES

A seleção das linhas espectrais foi efetuada de forma a se obter a sensibilidade adequada e ausência de interferências espectrais visando a determinação dos elementos por ICP OES. A referida técnica possui como uma das principais características a possibilidade de determinação multielementar, devido à sua ampla faixa dinâmica linear de concentração. Limitações associadas a esta técnica podem ser descritas como os limites de detecção obtidos para elementos traço e a possibilidade de interferências espectrais [37]. Alguns procedimentos podem ser aplicados visando à melhoria da exatidão do ICP OES como a utilização de padrão interno e externo nas medições.

No presente trabalho foi efetuado o estudo das linhas de emissão para os analitos Ca, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, P e Zn. A solução de trabalho utilizada foi preparada em meio ácido, contendo os analitos a serem avaliados na faixa de concentração linear: 0; 1; 2,5; 5,0; 7,5; 10; 15 e 25 ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) para Ca, K, Mg, Na e P e na faixa linear de concentração: 0; 0,1; 0,25; 0,5; 0,8; 1; 1,5; 2, 3 e 5 ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) para Cr, Cu, Fe, Mn, Ni e Zn. As linhas espectrais estudadas de cada analito são evidenciadas na Tabela 2.

**Tabela 2. Linhas de Emissão Estudadas para cada Elemento**

Elementos	Linhas de Emissão (nm)	Elementos	Linhas de Emissão (nm)
<b>Ca</b>	317,933 (II); 393,366 (II); 396,847 (II); 422,673 (I)	<b>Mn</b>	257,610 (II); 259,372 (II); 260,568 (II); 279,482 (I); 293,931 (II); 294,921 (II)
<b>Cr</b>	205,560 (II); 206,158 (II); 267,716 (II); 283,563 (II); 276,653 (II); 205,560 (II)	<b>Na</b>	330,237 (I); 588,995 (I); 589,602 (I)
<b>Cu</b>	213,598 (II); 222,778 (I); 223,009 (I); 224,700 (II); 324,754 (I); 327,395 (I)	<b>Ni</b>	216,555 (II); 221,648 (II); 222,486 (II); 227,021 (II); 230,299 (II); 231,604 (II)
<b>Fe</b>	234,350 (II); 238,204 (II); 239,563 (II); 259,940 (II); 260,709 (II); 261,382 (II)	<b>P</b>	177,434 (I); 213,618 (I); 214,914 (I); 253,561 (I)
<b>K</b>	404,414 (I); 766,468 (I); 769,897 (I)	<b>Zn</b>	202,548 (II); 206,200 (II); 213,857 (I)
<b>Mg</b>	202,582 (I); 279,553 (II); 280,270 (II); 285,213 (I)		

(I) linha de emissão atômica

(II) linha de emissão iônica

Um padrão interno é uma espécie de referência, química ou fisicamente similar ao analito, que é adicionada a amostras, padrões e brancos. O sinal de resposta, então, não é aquele considerado para o analito, mas a razão entre o sinal do analito e o da espécie de referência [16].

A utilização de padrão interno em ICP OES possui como principal objetivo a correção de erros instrumentais, erros relacionados à própria execução do experimento e aos efeitos promovidos pela matriz. A padronização interna possui como princípio a comparação de um sinal (is) analítico com um sinal (is) de referência fornecido por um elemento adequadamente selecionado descrito como o padrão interno. Quando este procedimento é utilizado, supõe-se que o padrão interno, bem como o analito, sofrem influências similares da matriz da amostra e que ambos são alterados igualmente pelas modificações nas condições instrumentais ou operacionais [38,16,39]. O elemento ítrio (Y) foi utilizado como padrão interno nas medidas efetuadas.

Uma solução estoque 100 mg L<sup>-1</sup> de Y foi preparada a partir de uma solução de 1000 mg L<sup>-1</sup> de Y (Merck) para a execução dos experimentos. Uma alíquota da solução estoque foi adicionada nas amostras previamente digeridas e também nas soluções de calibração, de modo que a concentração de ítrio resultante nestes correspondesse a 1 mg L<sup>-1</sup>.

### **3.6 Avaliação do Efeito de Matriz nas medidas por ICP OES**

O estudo do efeito de matriz foi efetuado após a otimização dos procedimentos de decomposição estudados, de forma a avaliar a influência da solução final dos digeridos sobre a intensidade de emissão dos analitos. Para a execução deste estudo foram construídas curvas analíticas de calibração nos meios: ácido (HNO<sub>3</sub> ou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) diluído, branco digerido e o digerido de proteína texturizada de soja utilizando os procedimentos de decomposição em chapa aquecedora (PC), bloco digestor (PB) e forno de microondas com radiação focalizada (PF):

1. Ácido diluído: a curva analítica de calibração (0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0 µg mL<sup>-1</sup>) foi preparada tomando-se alíquotas da solução estoque 50 µg mL<sup>-1</sup> de Cr, Cu, Fe, Mn, Ni e Zn e o volume foi completado com água Milli-Q® para 5,0 mL em frasco de polipropileno;
2. Branco digerido: a curva analítica de calibração (0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0 µg mL<sup>-1</sup>) foi preparada tomando-se alíquotas da solução estoque 50 µg mL<sup>-1</sup> de Cr, Cu, Fe, Mn, Ni e Zn e o volume foi completado com a solução resultante do branco digerido até 5,0 mL em frasco de polipropileno;
3. Proteína Texturizada de Soja digerida: a curva analítica de calibração (0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0 µg mL<sup>-1</sup>) foi preparada tomando-se alíquotas da solução estoque 50 µg mL<sup>-1</sup> de Cr,

Cu, Fe, Mn, Ni e Zn e o volume foi completado com as soluções resultantes do diferentes tipos de proteína digeridos até 5,0 mL em frasco de polipropileno.

Os coeficientes angulares das curvas analíticas construídas nos diferentes meios foram comparados, utilizando o teste t-pareado para 95% de confiança.

### **3.7 Procedimentos experimentais para decomposição das amostras de proteína texturizada de soja**

São relatados a seguir os quatro procedimentos utilizados para decomposição das amostras de proteína texturizada de soja, antes da quantificação por ICP OES axial. Os procedimentos de decomposição ácida foram realizados em forno mufla, em placa com aquecimento condutivo, em bloco digestor e em forno de microondas com radiação focalizada.

#### **3.7.1 Procedimento de decomposição por via seca.**

O procedimento de incineração das amostras de proteína texturizada de soja foi realizado de acordo com o método oficial de referência (AOAC) 999.11, recomendado para amostras de alimentos. As amostras foram devidamente pesadas (~1,5 g) em cadinhos de porcelana e posteriormente submetidas à incineração em forno mufla. A mufla foi ajustada para atingir a temperatura de 450°C numa taxa de 50°C/h, permanecendo nesta temperatura durante aproximadamente 12 horas. As cinzas brancas obtidas foram solubilizadas em HCl 6 mol L<sup>-1</sup> numa chapa aquecedora até evaporação. Os resíduos foram dissolvidos em 5 mL de HNO<sub>3</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup>, deixando-os em contato com o ácido por 2 horas para posterior ajuste de volume com o mesmo ácido até 20 mL em tubos de polipropileno.

#### **3.7.2 Otimização do procedimento de decomposição em placa com aquecimento condutivo.**

As amostras de proteína texturizada de soja foram submetidas ao mesmo programa de decomposição em chapa aquecedora independentes de sua granulometria. Após decomposição, os analitos foram determinados por ICP OES com visão axial.

Na realização de testes iniciais, o procedimento utilizado foi: pesagem de 500,0 mg de amostra, transferência de 5,0 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado para o erlenmyer e aquecimento gradual até a temperatura de 150° C, em placa de aquecimento. A mistura foi mantida em aquecimento durante 40 min. Então, foram adicionadas alíquotas de 1,0 mL por minuto de

peróxido de hidrogênio 30% (v/v) até constatação da decomposição total das amostras. Após este estágio, a solução permaneceu em aquecimento por mais 10 minutos até redução de volume (~ 5 mL). O volume total de peróxido adicionado correspondeu a 5 mL. Os digeridos ácidos foram filtrados em papel de filtro quantitativo de filtração rápida e levados para medida no ICP OES com visão axial, nas condições experimentais descritas na Tabela 1. Após a decomposição, as soluções dos digeridos foram diluídas para 15,0 mL com água Milli-Q<sup>®</sup> e armazenadas em frascos de polipropileno.

### 3.7.3 Otimização do procedimento de decomposição em bloco digestor.

Foi utilizado o mesmo procedimento descrito no item 3.7.2, adotando-se, agora, o aquecimento em bloco digestor.

### 3.7.4 Otimização do procedimento de decomposição em forno de microondas com radiação focalizada.

Foram pesados 500,0 mg da amostra no frasco reacional de quartzo. Este frasco foi colocado em uma das duas cavidades do forno e o programa de aquecimento efetuado é descrito da Tabela 3. Antes de iniciar o aquecimento, adicionaram-se 1,0 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e 5,0 mL de HNO<sub>3</sub> concentrados sobre as amostras. Os digeridos foram transferidos para tubos de polipropileno, completando o volume para 15 mL com água Milli-Q<sup>®</sup>.

**Tabela 3. Programa de aquecimento para decomposição de amostras de proteína texturizada de soja em forno de microondas focalizadas**

Estágio	Rampa de Aquecimento (min.)	Temperatura (°C)	Patamar (min.)	Reagente	Alíquota
1	3	110	0	---	---
2	4	180	3	---	---
3	0	180	10	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (8 ml)	1 ml

### 3.8 Determinação da acidez final dos digeridos

Para a determinação da acidez final dos digeridos, uma alíquota de 100 µL foi tomada e titulada com uma solução de NaOH 0,09972 mol L<sup>-1</sup>, usando solução de fenolftaleína

(1,0% m/v em etanol) como indicador. Os padrões da curva analítica de calibração foram preparados com a mesma concentração ácida dos digeridos.

### **3.9 Determinação do carbono residual**

Muitos procedimentos de decomposição por via úmida são empregados para a dissolução de amostras de alimentos, sejam eles baseados no aquecimento térmico ou radiação microondas. A eficiência de decomposição associada a estes procedimentos está relacionada com o tempo requerido para a decomposição e o quanto esta foi completa [40]. No entanto, devido à elevada estabilidade de alguns compostos orgânicos presentes nas amostras ou ainda, formados durante a decomposição, a oxidação incompleta destes é comumente constatada [41]. A determinação do teor de carbono residual, portanto, é um importante parâmetro para se avaliar a eficácia do procedimento utilizado para a decomposição da amostra. O teor de carbono residual (RCC, do inglês Residual Carbon Content) corresponde à fração do carbono original remanescente após a decomposição da amostra e subsequente pré-concentração da solução por evaporação [42]. Este teor de carbono pode ser investigado através de análise elementar, de modo que a técnica de espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado é largamente utilizada para este fim [41,43,44].

No presente estudo, a determinação do RCC presente nos digeridos foi determinada por ICP OES, utilizando a linha de emissão do carbono 193.091 nm.

### **3.10 Características analíticas do método**

As características analíticas dos métodos propostos foram avaliadas através dos limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ). Para a determinação do LOD e do LOQ, foram realizados 10 ensaios, ou seja, dez soluções correspondentes ao branco foram submetidas ao processo de decomposição e os sinais (intensidade de emissão) foram medidos por ICP OES.

### **3.11 Material de Referência Certificado**

No mercado não são encontrados materiais de referência certificados de proteína texturizada de soja ou similar e, portanto, o material de referência certificado do NIST (Gaithersburg, Maryland, USA) de espinafre 1570a foi utilizado para a avaliação da exatidão dos procedimentos de decomposição propostos.

### 3.12 Aplicação Analítica

Após a otimização das condições experimentais, quatro amostras de proteína texturizada de soja disponíveis comercialmente, em granulometrias diferentes (Figura 9), foram submetidas aos procedimentos de decomposição. As características das amostras, encontradas nos rótulos das embalagens, estão descritas a seguir. Para a amostra 1, tipo fino, quantidade de carboidratos ( $200 \text{ mg g}^{-1}$ ), proteínas ( $500 \text{ mg g}^{-1}$ ), isoflavonas ( $2,8 \text{ mg g}^{-1}$ ), Ca ( $3,0 \text{ mg g}^{-1}$ ) e Fe ( $90 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ ). Para as amostras 2 (natural médio), 3 (médio) e 4 (grande), quantidade de carboidratos ( $200 \text{ mg g}^{-1}$ ), proteínas ( $500 \text{ mg g}^{-1}$ ) e isoflavonas ( $2,8 \text{ mg g}^{-1}$ ).



Figura 9. Amostras de proteína texturizada de soja submetidas à decomposição mediante procedimentos sugeridos

# *Capítulo 4*

---

## **APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS**

## 4.0 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

A seguir estão apresentados e discutidos os resultados obtidos para a otimização dos procedimentos de decomposição das amostras de proteína texturizada de soja, visando determinação de elementos essenciais e não essenciais por ICP OES.

### 4.1 Estudo de linhas de emissão dos analitos

As linhas de emissão de cada analito foram estudadas (Tabela 2) e foram construídas curvas de calibração em ácido nítrico 2,5 mol L<sup>-1</sup> e sulfúrico 1 mol L<sup>-1</sup> para avaliação da sensibilidade, de forma a selecionar adequadamente o comprimento de onda a ser utilizado na determinação dos elementos de interesse pela técnica ICP OES. As curvas analíticas de calibração nos diferentes meios estão mostradas nas Figuras 10 e 11 (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 mol L<sup>-1</sup>) e nas Figura 12 e 13 (HNO<sub>3</sub> 2,5 mol L<sup>-1</sup>).

Como se pode constatar, os coeficientes angulares obtidos para as curvas analíticas preparadas em meio nítrico e sulfúrico, para cada linha de emissão dos analitos estudados, diferiram entre si sendo que, para a maioria dos elementos, os valores obtidos em meio sulfúrico foram inferiores àqueles para o meio nítrico, provavelmente em decorrência da maior viscosidade associada a este ácido. Considerando soluções ácidas, algumas propriedades físicas são diferentes em comparação a soluções aquosas. Alterações na viscosidade e tensão superficial promovem alterações na aspiração e nebulização das soluções, enquanto que propriedades como densidade e volatilidade afetam o transporte do aerossol através da câmara de nebulização. Estes resultados estão concordantes com dados da literatura [45,46]. Os coeficientes de determinação obtidos para as linhas investigadas foram maiores que 0,9991. As linhas selecionadas para os elementos Ca, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, P e Zn, estão mostradas na Tabela 1.



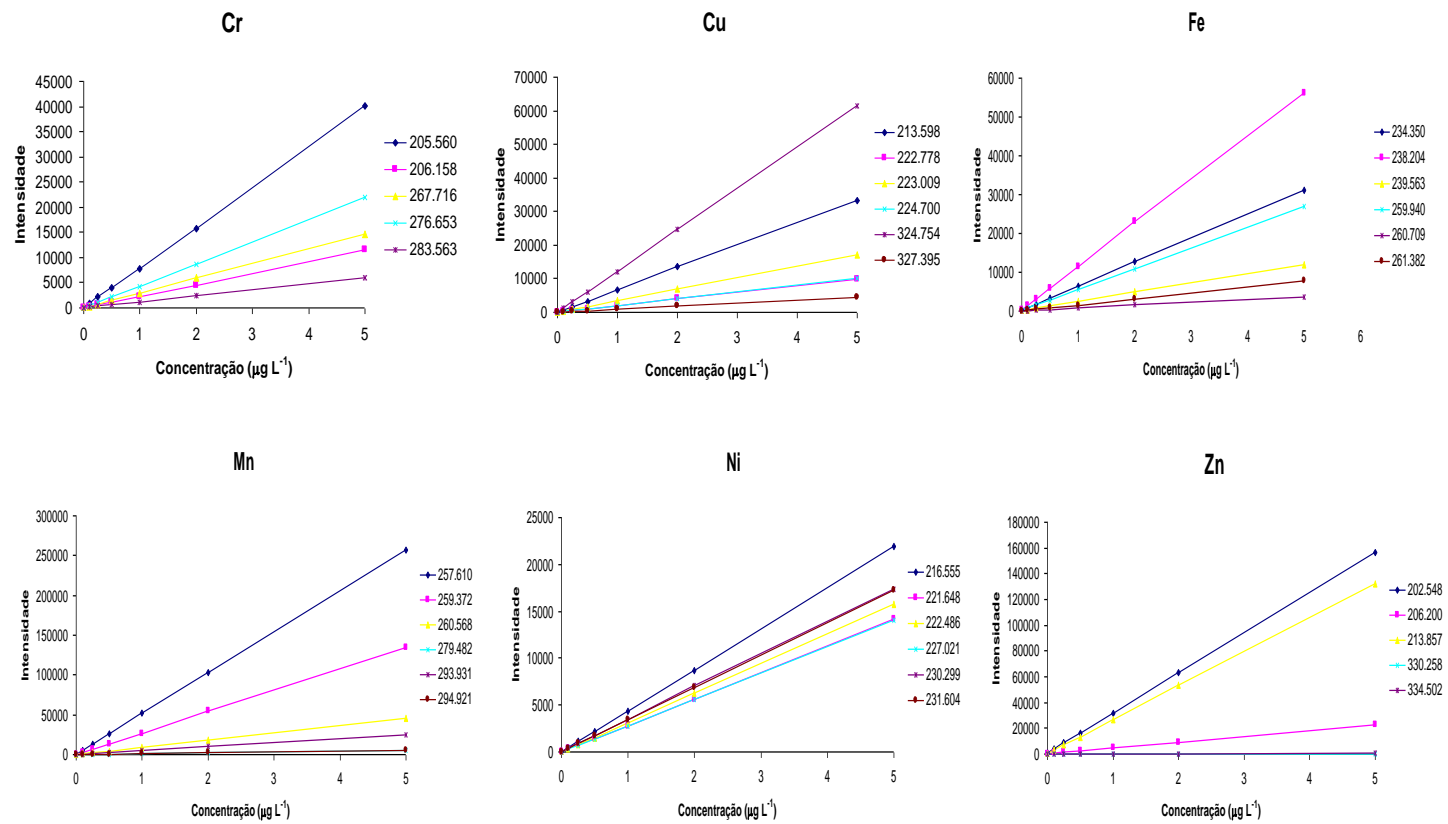


Figura 10. Curvas de calibração construídas em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  para as intensidades das linhas espectrais para os analitos Cr, Cu, Fe, Mn, Ni e Zn

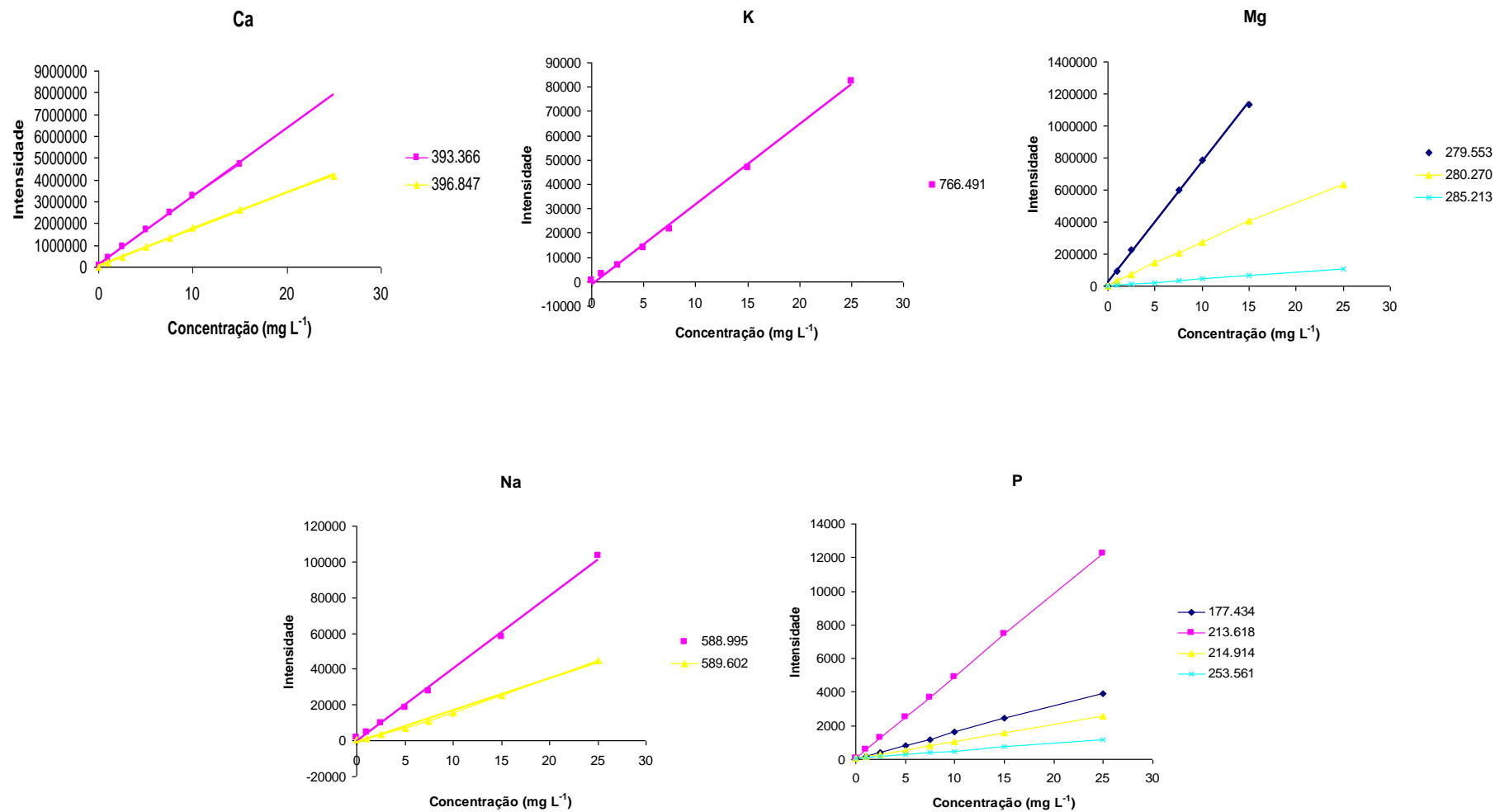


Figura 11. Curvas de calibração construídas em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para as intensidades das linhas espectrais para os analitos Ca, K, Mg, Na e P

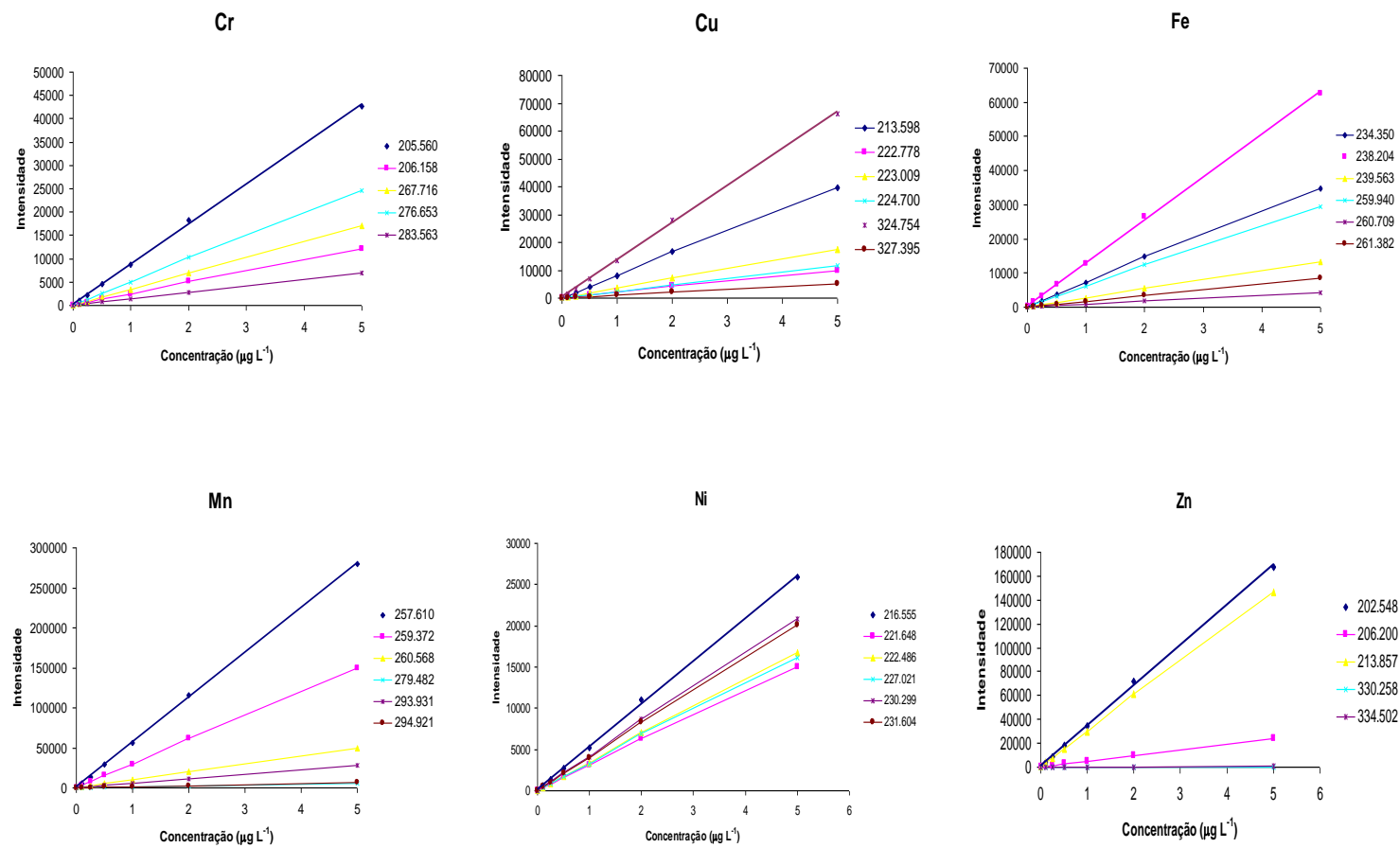


Figura 12. Curvas de calibração construídas em HNO<sub>3</sub> para as intensidades das linhas espectrais para os elementos Cr, Cu, Fe, Mn, Ni e Zn

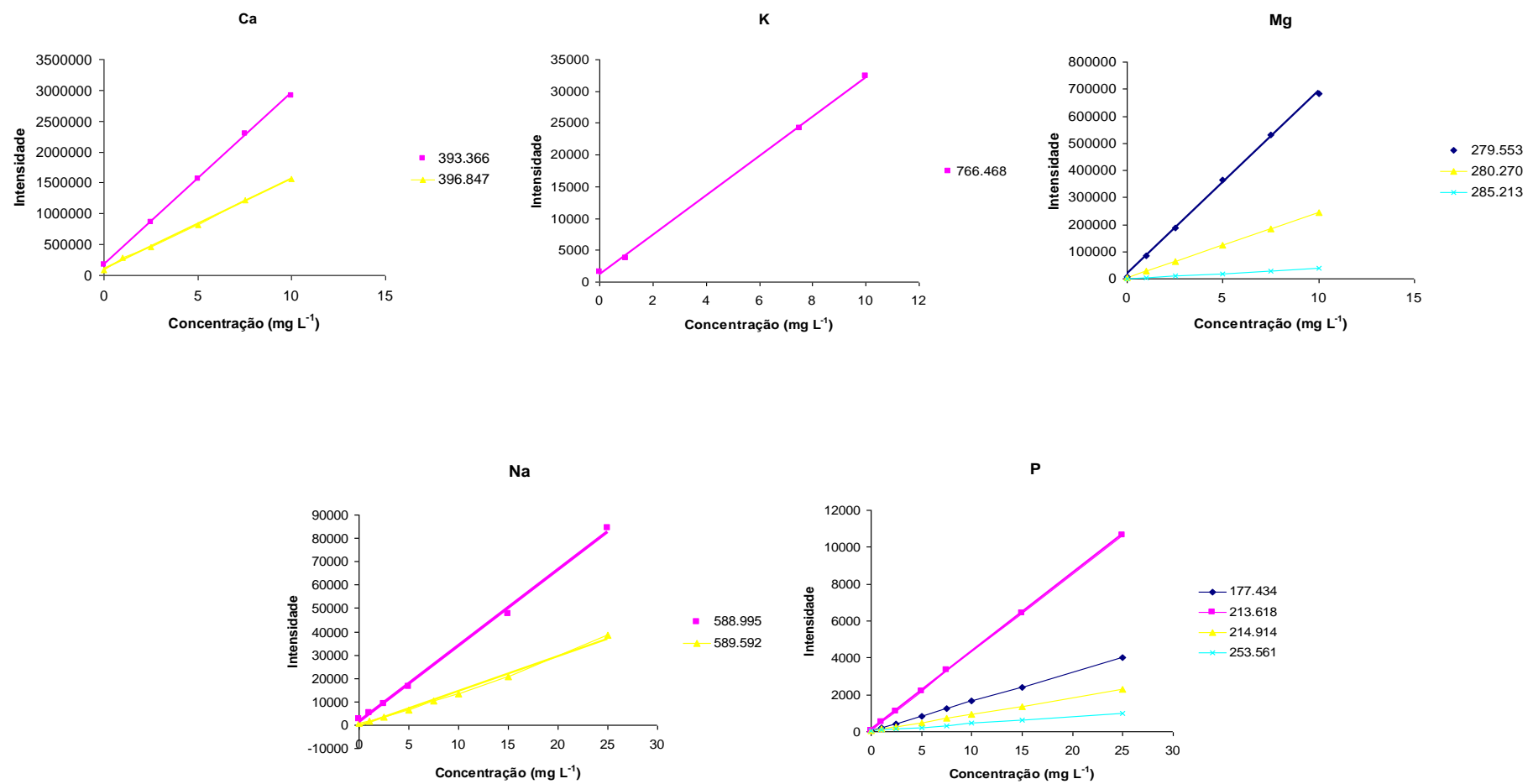


Figura 13. Curvas de calibração construídas em HNO<sub>3</sub> para as intensidades das linhas espectrais para os analitos Ca, K, Mg, Na e P

## 4.2 Sistemas por aquecimento condutivo

Os procedimentos de decomposição ácida para amostras de alimentos requerem a utilização de ácidos com características oxidantes ou, ainda, a combinação destes com outros reagentes que definam um potencial oxidante eficiente. Muitos procedimentos são descritos, contudo, quatro combinações de reagentes são mais comumente utilizadas: ( $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$ ); ( $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ ); ( $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ ); ( $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ ), sob diferentes proporções [47]. Estes procedimentos utilizando ácidos ou mistura destes podem ser conduzidos em sistema aberto utilizando chapa aquecedora ou bloco digestor, como também em sistemas fechados sob alta pressão com aquecimento térmico ou por microondas [48].

Os procedimentos de decomposição ácida são frequentemente utilizados devido às suas simplicidades características. São métodos muito versáteis e de execução relativamente rápida, de modo que as condições do processo de decomposição e a massa de amostra utilizada são parâmetros que podem ser alterados sem maiores dificuldades. A principal desvantagem associada a estes métodos está relacionada à formação de compostos pouco solúveis e a incompleta decomposição de matéria orgânica, o que define a necessidade de utilização de ácidos oxidantes como  $\text{HNO}_3$  e/ou  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , essencialmente quando são avaliadas amostras de alimentos com elevado teor de gorduras e carboidratos, e quando o objetivo é a completa decomposição da amostra [49].

Os procedimentos analíticos utilizados para a decomposição de amostras devem envolver a menor manipulação possível das mesmas, minimizando a possibilidade de contaminação durante a etapa de preparo. Similarmente, é necessário que a técnica analítica empregada na detecção dos elementos de interesse apresente parâmetros analíticos adequados como sensibilidade, baixos valores de limites de detecção, e ampla faixa dinâmica linear [50,51]. O emprego da técnica ICP OES oferece vantagens como análise multielementar simultânea, precisão e sensibilidade elevadas, rapidez e ampla faixa dinâmica linear, atendendo, portanto, aos requerimentos previamente considerados [52,53,54].

Mediante consideração dos aspectos relacionados à decomposição de amostras por aquecimento condutivo, anteriormente citados, são evidenciados, em seqüência, os resultados obtidos para as concentrações dos analitos estudados após procedimento de decomposição das amostras em chapa aquecedora e bloco digestor (Sistema Condutivo) e forno de microondas com radiação focalizada.

## 4.2.1 Validação dos procedimentos no sistema condutivo

### 4.2.1.1 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 [55]. O efeito de matriz foi avaliado a partir dos coeficientes angulares obtidos através das curvas analíticas preparadas em meio ácido diluído, comparados com aqueles obtidos para as curvas preparadas com as soluções digeridas das amostras e da solução branco para chapa aquecedora (PC) e bloco digestor (PB). Os resultados estão mostrados na Tabela 4 e nas Figuras 14 e 15.

**Tabela 4. Inclinações das curvas analíticas para Cr, Cu, Fe, Mn, Ni e Zn para o efeito de matriz com ICP OES nos meios C1 (meio ácido diluído), C2 (meio do branco submetido à decomposição em chapa aquecedora), C3 (proteína texturizada de soja submetida à decomposição em chapa aquecedora), B2 (meio do branco submetido à decomposição em bloco digestor) e B3 (proteína texturizada de soja submetida à decomposição em bloco digestor)**

Elementos	Meios Investigados				
	C1	C2	C3	B2	B3
<b>Cr</b>	3395	3338	3046	3228	2938
<b>Cu</b>	1000	978	919	988	902
<b>Fe</b>	12539	12305	11374	12568	11179
<b>Mn</b>	56109	55017	48654	55601	46795
<b>Ni</b>	4012	3844	3580	3934	3418
<b>Zn</b>	29355	28307	26027	28134	28141

Para os elementos investigados, as inclinações das curvas analíticas construídas empregando PC em meio ácido diluído (C1), branco submetido aos procedimentos de decomposição (C2 para PC e B2 para PB) e proteína texturizada de soja digerida (C3 para PC e B3 para PB) não diferem significativamente, para um nível de confiança de 95% [16]. Para os elementos Ca, K, Mg, Na e P não foi estudado o efeito de matriz, em virtude da diluição realizada para a determinação destes analitos. Estes resultados sugerem que o

efeito de matriz não é significativo para as medidas em ICP OES, nas condições operacionais selecionadas para este trabalho. Deste modo, é possível construir as curvas analíticas de calibração em meio de HNO<sub>3</sub> diluído para a determinação.

#### **4.2.1.2 Precisão**

A precisão foi estimada através da repetibilidade, pela avaliação do desvio padrão relativo (RSD) do método referente a cada procedimento de decomposição utilizado para as amostras de proteína de soja, para seis determinações. Para PC, foram obtidos valores de RSD inferiores a 5%, para os macro elementos, enquanto que os valores obtidos para os micro elementos foram inferiores a 5% para Cu, Fe e Mn e inferiores a 13% para Cr, Ni e Zn respectivamente. Para PB, os valores de RSD referente aos macro elementos foram inferiores a 5%, com exceção para o Na (21%), enquanto que os valores obtidos para os micro elementos e elementos traço foram inferiores a 7% para Cu, Fe, Mn e Zn e apresentando os valores de 27 e 13% para Cr e Ni respectivamente. Estes valores elevados para Cr e Ni podem ser creditados ao fato das concentrações determinadas destes elementos estarem próximas ao LOQ. Os resultados obtidos para RSD associado aos procedimentos PC e PB indicaram valores relativamente baixos e não diferindo significativamente para ambos os procedimentos.

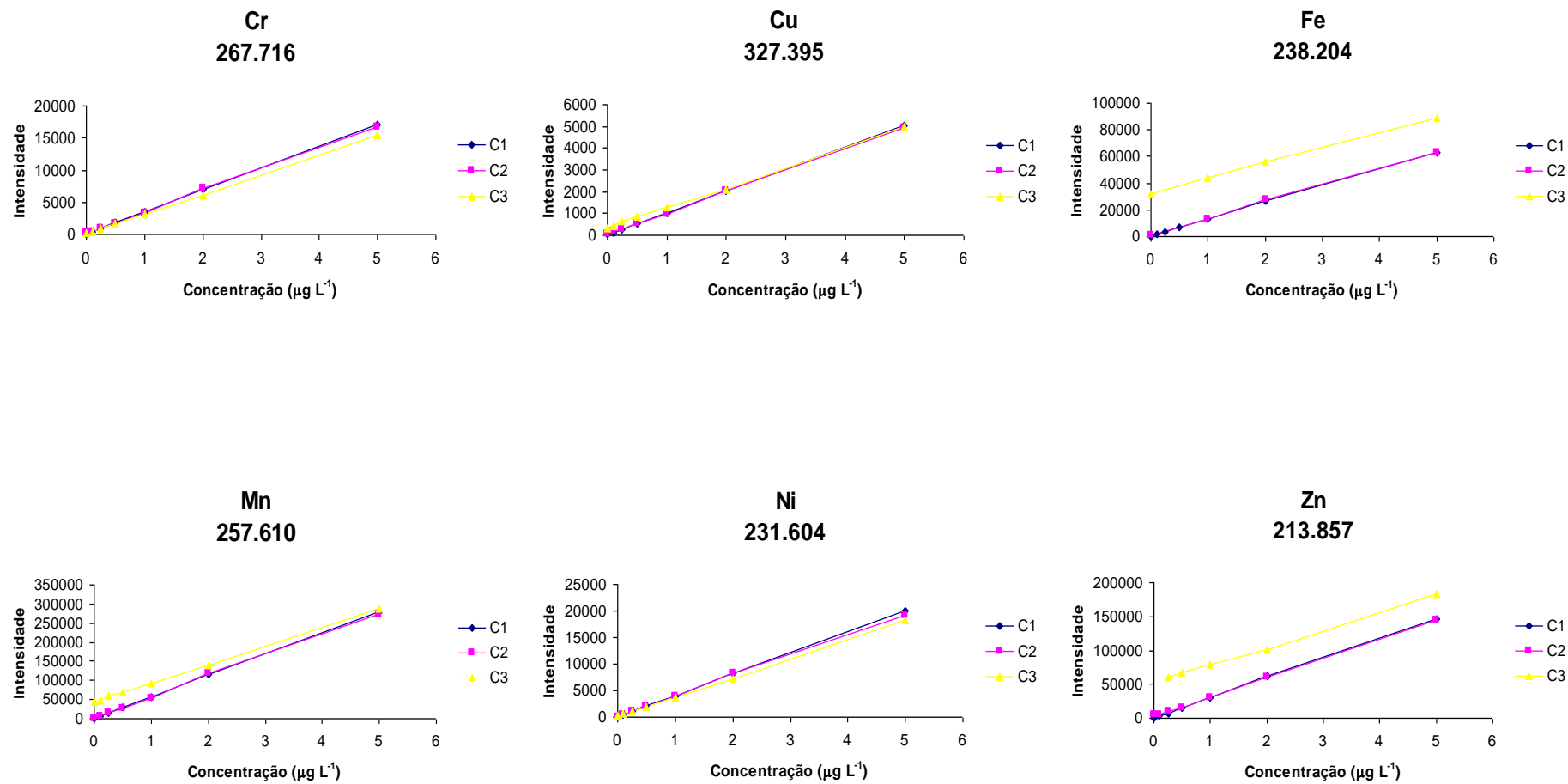


Figura 14. Curvas analíticas de calibração para avaliação do efeito de matriz para os elementos Cr, Cu, Fe, Mn, Ni e Zn para os diferentes meios considerando o procedimento de decomposição em chapa aquecedora



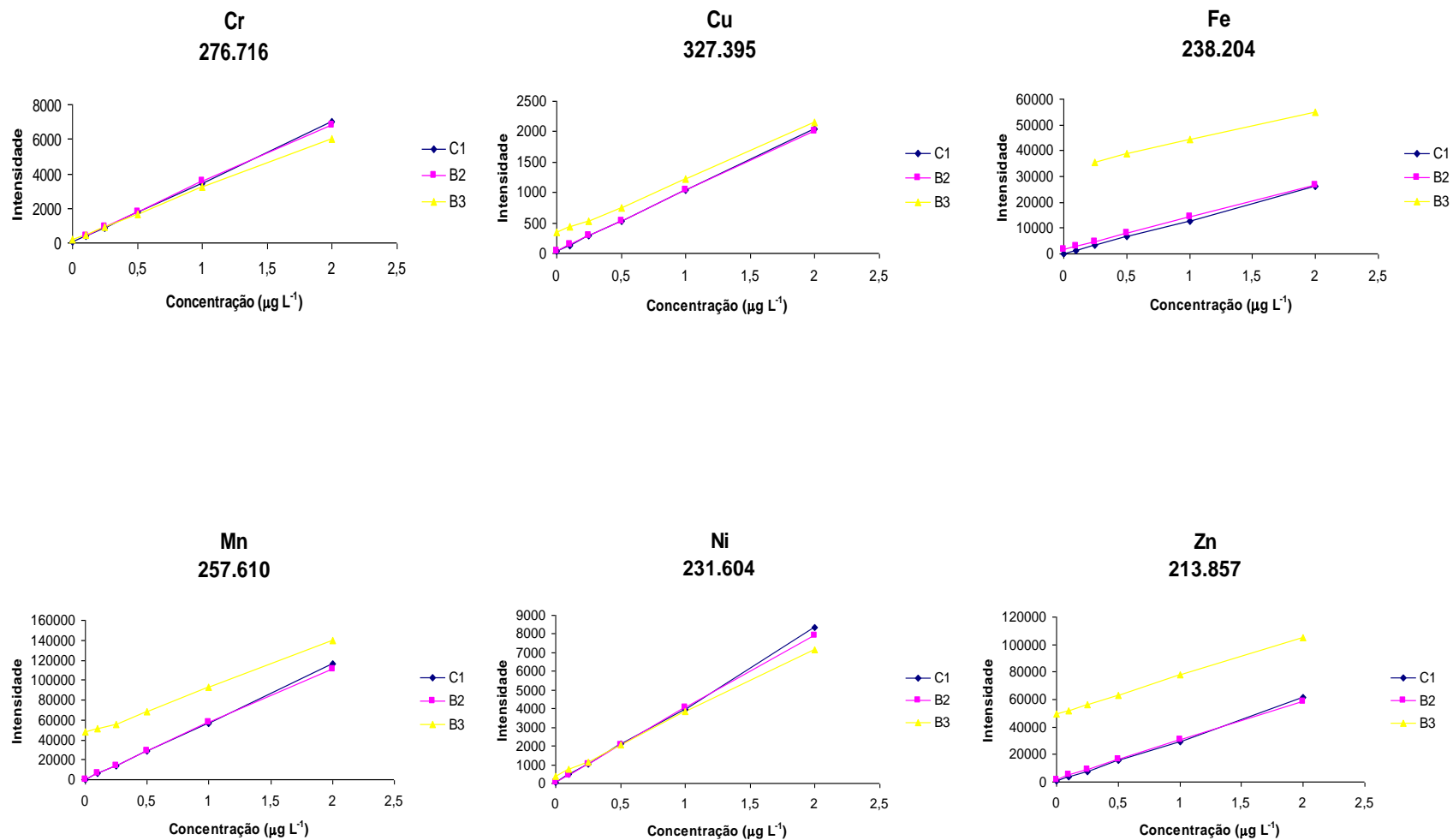


Figura 15. Curvas analíticas de calibração para avaliação do efeito de matriz para os elementos Cr, Cu, Fe, Mn, Ni e Zn para os diferentes meios considerando o procedimento de decomposição em bloco digestor

#### 4.2.1.3 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. O cálculo do limite de detecção pode ser efetuado como descrito abaixo [56]:

$$\text{LOD} = 3s / S$$

Onde:

**s** = desvio padrão correspondente às intensidades de sinal de 10 brancos

**S** = coeficiente angular da curva analítica de calibração

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. O cálculo do limite de quantificação pode ser efetuado como descrito a seguir [56]:

$$\text{LOQ} = 10s / S$$

Onde:

**s** = desvio padrão correspondente às intensidades de sinal de 10 brancos

**S** = coeficiente angular da curva analítica de calibração

Os limites de detecção obtidos para os macro elementos utilizando o procedimento PC foram, em mg L<sup>-1</sup>: Ca (0,48), K (0,062), Mg (0,083), Na (0,18), P (0,10), e para os micro elementos, em µg L<sup>-1</sup>: Al (0,46), Cd (0,10), Co (0,14), Cr (0,20), Cu (0,62), Fe (0,059), Mn (0,019), Ni (0,32), Pb (0,40), Zn (0,059). Para o PB os valores encontrados, em mg L<sup>-1</sup>, para os macro elementos foram: Ca (0,34), K (0,12), Mg (0,018), Na (0,23), P (0,21) e para os micro elementos, em µg L<sup>-1</sup>: Al (0,12), Cd (0,03), Co (0,023), Cr (0,11), Cu (0,42), Fe (0,053), Mn (0,0052), Ni (0,12), Pb (0,36), Zn (0,046).

Os valores obtidos para os limites de quantificação para PC e PB, são descritos na Tabela 5.

**Tabela 5. Limites de Quantificação obtidos para decomposição ácida em chapa aquecedora e bloco digestor**

<b>Elementos</b>	<b>Chapa Aquecedora</b>	<b>Bloco Digestor</b>
LOQ em mg L <sup>-1</sup>		
<b>Ca</b>	1,59	1,13
<b>K</b>	0,21	0,39
<b>Mg</b>	0,28	0,061
<b>Na</b>	0,6	0,72
<b>P</b>	0,34	4,99
LOQ em µg L <sup>-1</sup>		
<b>Al</b>	1,53	0,41
<b>Cd</b>	0,34	0,10
<b>Co</b>	0,47	0,075
<b>Cr</b>	0,66	0,37
<b>Cu</b>	2,08	1,40
<b>Fe</b>	0,20	0,18
<b>Mn</b>	0,062	0,017
<b>Ni</b>	1,06	0,39
<b>Pb</b>	1,32	1,19
<b>Zn</b>	0,20	0,15

Avaliando os limites de detecção e quantificação obtidos, para os dois procedimentos é permitido inferir que os menores valores de LOD e LOQ foram obtidos quando empregada decomposição em bloco digestor, para maioria dos elementos, o que pode ser explicado por vantagens associadas a este procedimento, a exemplo de um aquecimento mais uniforme e melhor controle da temperatura.

#### **4.2.1.4 Exatidão**

Para a avaliação da exatidão dos procedimentos em placa aquecedora e bloco digestor utilizou-se material de referência certificado de espinafre NIST 1570a em virtude da ausência de material certificado para proteína de soja. As amostras do CRM foram submetidas aos procedimentos de decomposição em chapa aquecedora e bloco digestor e os resultados obtidos são evidenciados na Tabela 6. Para os elementos Cd, Cu, Mn, Ni e Zn não foi encontrada diferença significativa entre os valores certificados e aqueles obtidos para os procedimentos de decomposição sugeridos após aplicação do t-teste pareado, ao

nível de 95% de confiança. Os elementos Ca, P e Mg foram também estudados, entretanto, os valores obtidos e certificados não foram concordantes ao nível de 95% de confiança.

**Tabela 6. Comparação dos teores (n = 3) de macro, micro e elementos traço obtidos por decomposição em placa aquecedora e bloco digestor para o material de referência NIST 1570a**

Elemento	Chapa Aquecedora	Bloco digestor	Valores certificados
Concentração, mg g <sup>-1</sup>			
<b>Ca</b>	2,077 ± 0,061	1,697 ± 0,043	1,527 ± 0,041
<b>P</b>	1,137 ± 0,035	0,776 ± 0,009	0,518 ± 0,011
<b>Mg</b>	1,65	1,11	0,89
Concentração, µg g <sup>-1</sup>			
<b>Cd</b>	2,41 ± 0,14	2,56 ± 0,08	2,89 ± 0,07
<b>Cu</b>	13,3 ± 1,7	12,5 ± 1,2	12,2 ± 0,6
<b>Mn</b>	70,4 ± 3,8	75,0 ± 2,4	75,9 ± 1,9
<b>Ni</b>	2,36 ± 0,2	2,28 ± 0,4	2,14 ± 0,1
<b>Zn</b>	83 ± 5	82 ± 5	82 ± 3

#### 4.2.2 Aplicação do procedimento em placa aquecedora

A decomposição de amostras por via úmida sugere o aquecimento da amostra na presença de ácidos minerais concentrados com elevado potencial oxidante, seja individualmente ou em misturas. A decomposição de amostras mediante via úmida é largamente empregada para a determinação de metais e dentre os não-metais podem ser citados nitrogênio, fósforo e enxofre em diversas amostras. A principal vantagem deste tipo de decomposição está relacionada ao uso de menores temperaturas o que define a redução do risco de perdas de elementos-traço [57,58]. A chapa aquecedora tem sido utilizada em métodos de decomposição de amostras para a quantificação de analitos para diversos tipos de amostras, considerando as vantagens de baixo custo e ser possível a utilização de maiores massas de amostras. Os resultados obtidos para as concentrações dos analitos determinados na amostra de proteína texturizada de soja são evidenciados nas tabelas 7 e 8. Foi possível a quantificação dos elementos Ca, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Ni, P e Zn por ICP OES. As concentrações de Al, Cd, Co e Pb encontraram-se abaixo dos valores de LOQ calculados para este método.

A acidez residual dos digeridos obtidos para este método correspondeu a 2,5 mol L<sup>-1</sup>. A eficiência de decomposição para este procedimento foi estimada pela determinação do teor de carbono residual (%) [41] e o valor obtido correspondeu a 8,4%.

#### **4.2.3 Aplicação do procedimento em bloco digestor**

Nos procedimentos de decomposição de amostras por via úmida, o aquecimento térmico pode ser também realizado por um bloco digestor. A decomposição em bloco digestor pode levar de 3 a 12 horas a depender da matriz, apresentando alta frequência analítica (40 – 100 amostras /decomposição), sendo que em muitos casos a utilização de peróxido de hidrogênio é necessária, em adição aos ácidos oxidantes empregados no procedimento, objetivando a aceleração da decomposição de amostras orgânicas. As concentrações obtidas para este procedimento são evidenciadas nas Tabelas 9 e 10. Foi possível a quantificação de Ca, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Ni, P e Zn por ICP OES. As concentrações de Al, Cd, Co e Pb encontraram-se abaixo do LOQ calculado para este método. A acidez residual dos digeridos obtidos para este procedimento correspondeu a 2,5 mol L<sup>-1</sup>. A eficiência de decomposição para este procedimento foi estimada pela determinação do teor de carbono residual (%) [41] e o valor obtido correspondeu a 2,7%.

Avaliando-se os procedimentos de decomposição via úmida empregando aquecimento condutivo, utilizados neste trabalho, é possível constatar que para a decomposição de 500 mg de amostras de proteína texturizada de soja mediante utilização de chapa aquecedora e bloco digestor, foram obtidos resultados mais satisfatórios quando utilizado bloco digestor em comparação à chapa aquecedora, quando avaliadas as figuras de mérito LOD e LOQ, bem como o teor de carbono residual, o qual avalia a eficácia dos procedimentos de decomposição de amostras. O procedimento demonstrou características interessantes como simplicidade, baixo custo, precisão e exatidão.

De modo geral, a composição mineral determinada para as amostras de proteína texturizada de soja com diferentes granulometrias foi similar. As pequenas diferenças constatadas podem ser creditadas a composição da matéria prima utilizada para a produção deste derivado, ao processamento ou a heterogeneidade das amostras.

**Tabela 7. Teor médio (mg g<sup>-1</sup>) ± desvio padrão (n = 3) de Ca, K, Mg, Na e P quantificados por ICP OES em amostras de proteína texturizada de soja para decomposição em chapa aquecedora**

Amostras	Ca	K	Mg	Na	P
1	2,45 ± 0,10	17,73 ± 0,78	3,10 ± 0,11	0,53 ± 0,05	6,99 ± 0,22
2	2,02 ± 0,13	15,88 ± 0,69	2,68 ± 0,15	0,55 ± 0,06	6,49 ± 0,25
3	2,26 ± 0,12	17,43 ± 0,99	3,00 ± 0,17	0,59 ± 0,05	7,57 ± 0,55
4	1,82 ± 0,24	14,29 ± 1,60	2,42 ± 0,29	0,33 ± 0,06	6,02 ± 0,64

**Tabela 8. Teor médio (µg g<sup>-1</sup>) ± desvio padrão (n = 3) de Cr, Cu, Fe, Mn, Ni e Zn quantificados por ICP OES em amostras de proteína texturizada de soja para decomposição em chapa aquecedora**

Amostras	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Zn
1	0,47 ± 0,06	6,64 ± 0,04	86,60 ± 0,55	24,84 ± 1,10	1,01 ± 0,11	33,83 ± 4,82
2	0,83 ± 0,05	8,10 ± 0,28	78,67 ± 9,94	24,03 ± 0,69	1,59 ± 0,21	30,52 ± 3,99
3	1,03 ± 0,12	6,52 ± 0,13	77,49 ± 4,71	22,29 ± 1,26	1,20 ± 0,07	37,91 ± 4,31
4	0,76 ± 0,17	4,58 ± 0,64	53,14 ± 0,99	16,53 ± 1,41	0,75 ± 0,07	14,40 ± 2,22

**Tabela 9. Teor médio (mg g<sup>-1</sup>) ± desvio padrão (n = 3) de Ca, K, Mg, Na e P quantificados por ICP OES em amostras de proteína texturizada de soja para decomposição em bloco digestor**

Amostras	Ca	K	Mg	Na	P
1	2,06 ± 0,11	18,79 ± 1,03	2,53 ± 0,14	1,27 ± 0,28	5,51 ± 0,34
2	2,27 ± 0,07	21,40 ± 0,21	2,90 ± 0,02	<LOQ	6,40 ± 0,04
3	2,58 ± 0,24	23,39 ± 2,15	3,17 ± 0,29	<LOQ	7,04 ± 0,75
4	2,13 ± 0,07	20,08 ± 0,81	2,68 ± 0,10	0,30 ± 0,07	6,05 ± 0,27

**Tabela 10. Teor médio (µg g<sup>-1</sup>) ± desvio padrão (n = 3) de Cr, Cu, Fe, Mn, Ni e Zn quantificados por ICP OES em amostras de proteína texturizada de soja para decomposição em bloco digestor**

Amostras	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Zn
1	0,19 ± 0,06	6,19 ± 0,35	68,71 ± 2,44	20,61 ± 0,36	0,75 ± 0,10	52,36 ± 1,26
2	<LOQ	10,18 ± 0,56	90,56 ± 6,12	27,23 ± 0,84	1,75 ± 0,09	43,39 ± 1,43
3	<LOQ	8,55 ± 1,07	85,18 ± 7,55	25,99 ± 2,66	1,48 ± 0,28	53,84 ± 0,85
4	0,31 ± 0,07	6,90 ± 0,35	71,48 ± 0,56	21,76 ± 0,97	1,03 ± 0,19	41,97 ± 1,49

### 4.3 Sistemas assistidos por radiação microondas

#### 4.3.1 Validação do procedimento de decomposição por forno de microondas focalizadas

##### 4.3.1.1 Efeito de matriz

O efeito de matriz para o procedimento de decomposição utilizando forno de microondas com radiação focalizada (PF) foi avaliado de forma similar, a partir dos coeficientes angulares obtidos através das curvas analíticas preparadas em meio de ácido sulfúrico diluído (F1), comparados com aqueles obtidos para as curvas analíticas preparadas com a solução contendo os reagentes submetidos ao procedimento de decomposição (F2) e com as soluções digeridas das amostras de proteína texturizada de soja (F3). Os resultados obtidos estão mostrados na Tabela 11 e Figura 16.

**Tabela 11. Inclinações das curvas analíticas para Cr, Cu, Fe, Mn, Ni e Zn para o estudado efeito de matriz com ICP OES nos meios F1 (meio ácido diluído), C2 (meio do branco submetido à decomposição em chapa aquecedora), C3 (proteína texturizada de soja submetida à decomposição em chapa aquecedora)**

Elementos	Meios Investigados		
	F1	F2	F3
<b>Cr</b>	2926	2987	2433
<b>Cu</b>	909	934	1004
<b>Fe</b>	11500	11409	9333
<b>Mn</b>	51455	51890	47984
<b>Ni</b>	3451	3413	3162
<b>Zn</b>	26382	26010	23837

Após análise dos resultados, aplicando-se o teste t pareado, concluiu-se que F1 e F2, F2 e F3 e F1 e F3 não diferem significativamente ao nível de 95% de confiança. Deste modo, é possível construir as curvas analíticas de calibração em meio de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> diluído. Para os elementos Ca, K, Mg, Na e P não foi estudado o efeito de matriz, em virtude da diluição realizada para a determinação destes analitos.



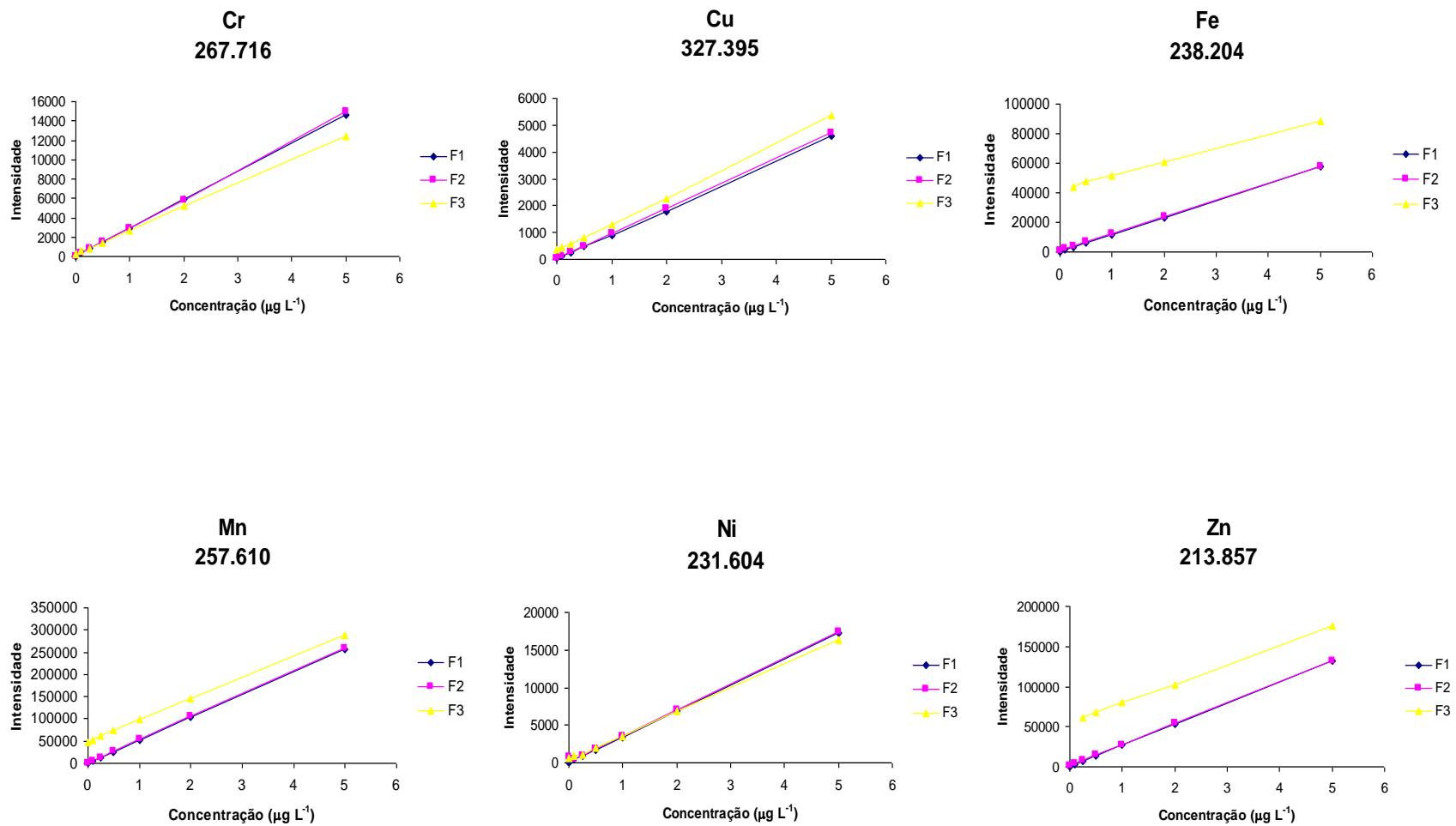


Figura 16. Curvas analíticas de calibração para avaliação do efeito de matriz para os elementos Cr, Cu, Fe, Mn, Ni e Zn para os diferentes meios considerando o procedimento de decomposição em forno de microondas com radiação focalizada

#### 4.3.1.2 Precisão

A precisão foi estimada pela avaliação do desvio padrão relativo (RSD) do método referente ao procedimento de decomposição utilizando forno de microondas com radiação focalizada, para seis determinações. Os valores de RSD referente aos macro elementos foram inferiores a 5%, enquanto que os valores obtidos para os micro elementos foram inferiores a 7% para Cu, Fe, Mn e Zn, exceto para Cr (13%) e Ni (16%). Os resultados obtidos para o RSD associado ao procedimento de decomposição utilizando radiação microondas como fonte de aquecimento indicaram valores relativamente baixos para os analitos investigados.

#### 4.3.1.3 Limites de Detecção e Quantificação

Os valores obtidos para os limites de detecção dos macro elementos foram, em mg L<sup>-1</sup>: Ca (0,26), K (0,048), Mg (0,0063), Na (0,25), P (1,18) e, para os micro elementos, em µg L<sup>-1</sup>: Al (0,17), Cd (0,037), Co (0,067), Cr (0,014), Cu (0,30), Fe (0,039), Mn (0,0050), Ni (0,23), Pb (0,99), Zn (0,039). Os valores para os limites de quantificação obtidos referente aos macro e micro elementos são descritos na Tabela 12.

**Tabela 12. Limites de quantificação obtidos para decomposição ácida em forno de microondas com radiação focalizada**

Elementos	Limite de Quantificação
<b>LOQ em mg L<sup>-1</sup></b>	
Ca	0,86
K	0,16
Mg	0,021
Na	0,83
P	3,95
<b>LOQ em µg L<sup>-1</sup></b>	
Al	0,55
Cd	0,12
Co	0,22
Cr	0,048
Cu	0,99
Fe	0,13
Mn	0,017
Ni	0,76
Pb	3,31
Zn	0,13

#### 4.3.1.4 Exatidão

Para a avaliação da exatidão do procedimento empregando forno de microondas com radiação focalizada utilizou-se também o material de referência certificado NIST 1570a. Para os elementos Cd, Cu, Mn, Ni e Zn não foi encontrada diferença significativa entre os valores certificados e aqueles obtidos para os procedimentos de decomposição sugeridos após aplicação do t-teste pareado, ao nível de 95% de confiança (Tabela 13). Os elementos Ca, P e Mg foram também estudados, entretanto, os valores obtidos e certificados não foram concordantes ao nível de 95% de confiança.

**Tabela 13. Teores (n = 3) de macro, micro e elementos traço obtidos por decomposição em forno de microondas com radiação focalizada para o material de referência NIST 1570a**

Elemento	Forno de Microondas Focalizadas	Valores Certificados
Concentração, mg g <sup>-1</sup>		
<b>Ca</b>	1,697 ± 0,042	1,527 ± 0,041
<b>P</b>	0,776 ± 0,009	0,518 ± 0,011
<b>Mg</b>	1,11	0,89
Concentração, µg g <sup>-1</sup>		
<b>Cd</b>	2,56 ± 0,08	2,89 ± 0,07
<b>Cu</b>	11,8 ± 0,7	12,2 ± 0,6
<b>Mn</b>	70,8 ± 1,3	75,9 ± 1,9
<b>Ni</b>	2,29 ± 0,3	2,14 ± 0,1
<b>Zn</b>	84 ± 3	82 ± 3

#### 4.3.2 Padrão interno

A necessidade de utilização do elemento ítrio como padrão interno (PI) foi avaliada para este procedimento, considerando o uso de ácido sulfúrico no procedimento de decomposição, o qual pode promover problemas associados à eficiência de nebulização e transporte. A comparação entre a concentração dos analitos na presença ou não do PI é ilustrada nas Figuras 17, 18, 19 e 20. Para as amostras 1 e 2, a diferença foi significativa para as concentrações de Cr, na amostra 4 para os elementos Cu e Fe, nas amostras 3 e 4 para Mn, na amostra 4 para Ni e nas amostras 1 e 4 para o Zn, ao nível de 95% de confiança.

Considerando os macro elementos estudados, é possível constatar que ao nível de 95% de confiança, a diferença foi significativa para o Ca na amostra 3, para o K nas amostras 2 e 3, para o Mg na amostra 3, para o Na na amostra 2 e para o P nas amostras 1,

2 e 3. A partir destes resultados, pode-se concluir que é necessária a utilização de padrão interno para a quantificação destes analitos nas referidas amostras por ICP OES, após decomposição em forno de microondas com radiação focalizada.

#### **4.3.3 Aplicação do procedimento em forno de microondas com radiação focalizada**

O aquecimento de um material por radiação microondas se dá devido à interação da onda eletromagnética com o dipolo elétrico da molécula de água e íons em solução. O aquecimento por microondas é seletivo e dependerá, principalmente, da constante dielétrica e da frequência de relaxação do material [57]. Em laboratórios de análise química são frequentemente utilizados equipamentos que promovem o aquecimento mediante emprego de radiação microondas para a etapa de preparo de amostras, como por exemplo, os fornos de microondas com radiação focalizada e com cavidade. As vantagens associadas à utilização de fornos de microondas para a decomposição de amostras estão relacionadas à menor possibilidade de ocorrência de contaminação, menor geração de resíduos, menores tempos de execução e a não existência de perda de elementos voláteis como As, Hg e Se. Especificamente, o forno de microondas com radiação focalizada trabalha sob pressão atmosférica, havendo o controle de adição dos reagentes e amostras, tornando possível a automação e execução de múltiplos procedimentos simultaneamente.

As concentrações dos macro e micro elementos quantificados por ICP OES, após decomposição ácida em forno de microondas com radiação focalizada são evidenciadas nas Tabelas 14 e 15. Foi possível a quantificação de Ca, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, P e Zn por ICP OES. As concentrações de Al, Cd, Co e Pb encontraram-se abaixo do LOQ calculado para este método.

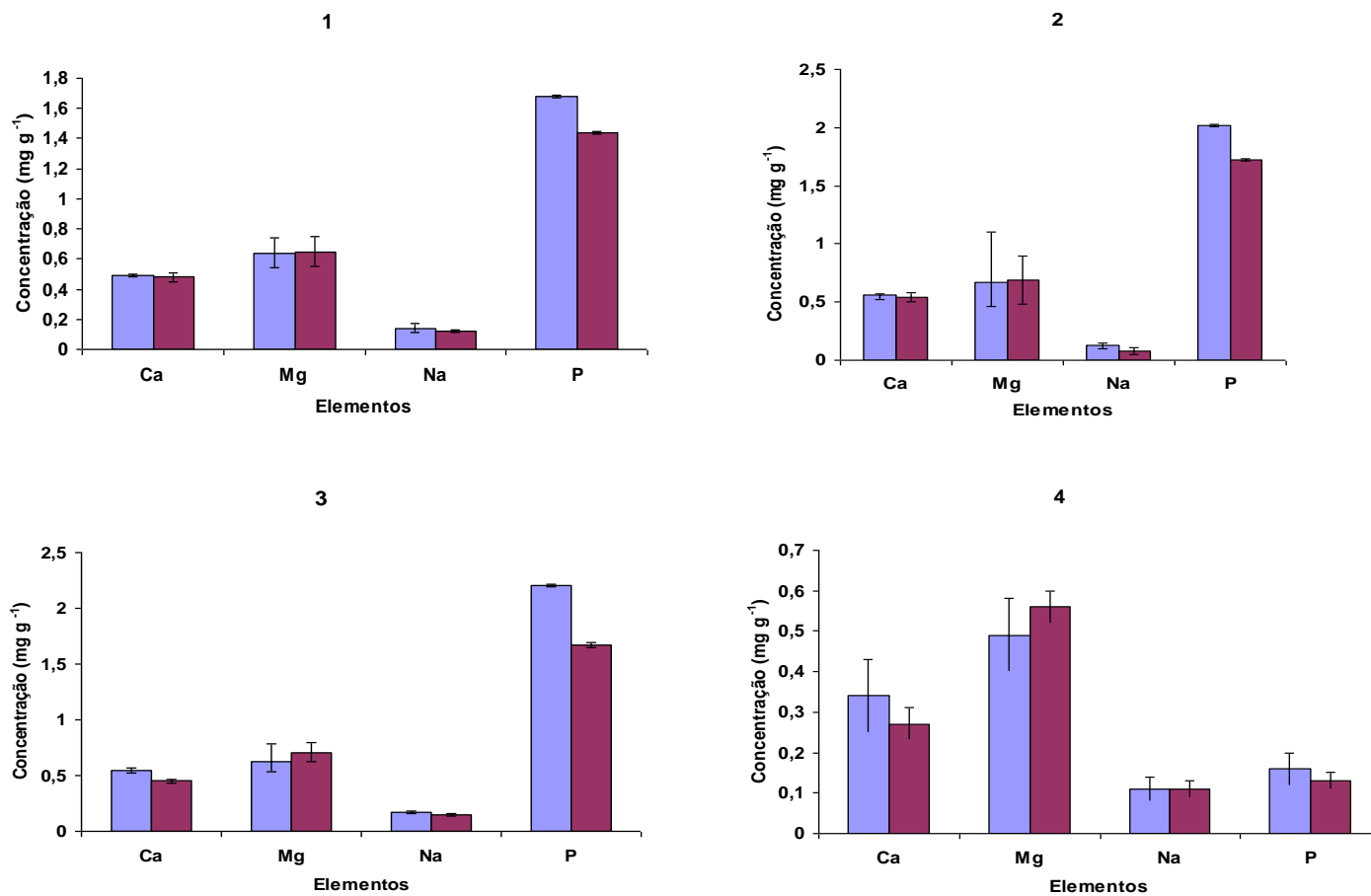


Figura 17. Concentrações (mg g<sup>-1</sup>) dos macro elementos Ca, Mg, Na e P quando na ausência (■) e presença (■) de padrão interno para as amostras 1, 2, 3 e 4

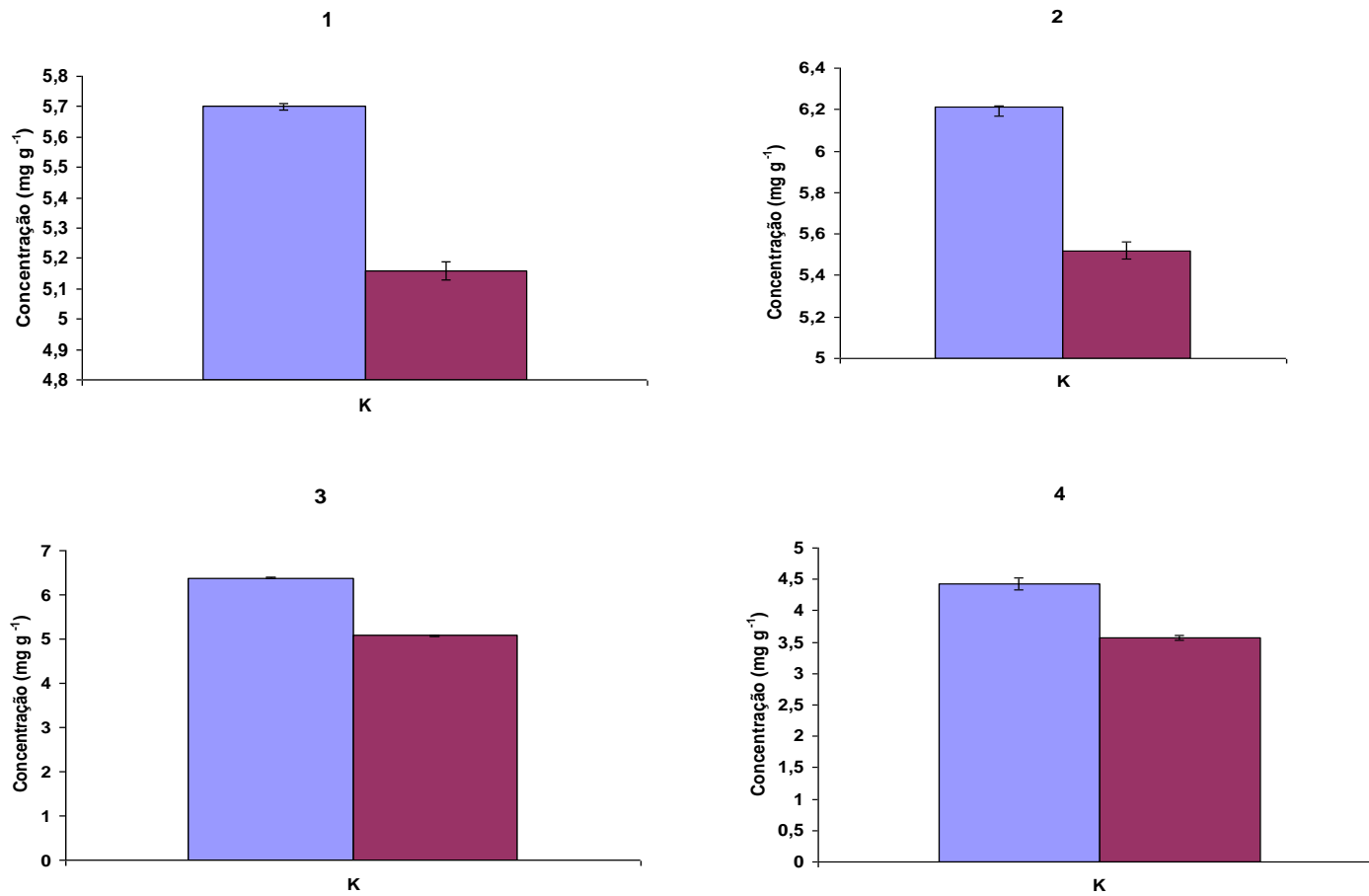


Figura 18. Concentração (mg g<sup>-1</sup>) do macro elemento K quando na ausência (■) e presença (■) de padrão interno para as amostras 1, 2, 3 e 4

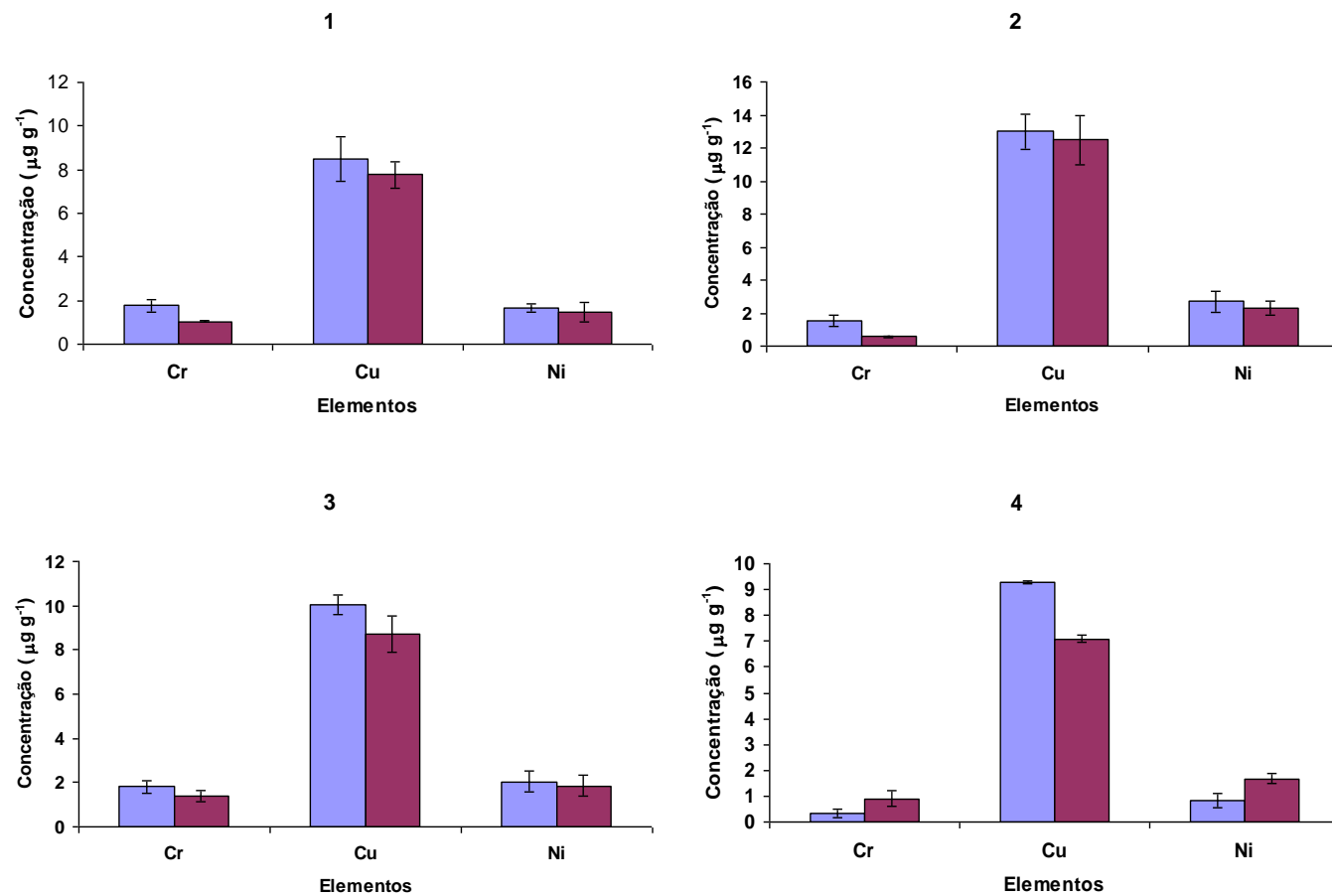


Figura 19. Concentrações ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) dos micro elementos Cr, Cu e Ni quando na ausência (■) e presença (■) de padrão interno para as amostras 1, 2, 3 e 4

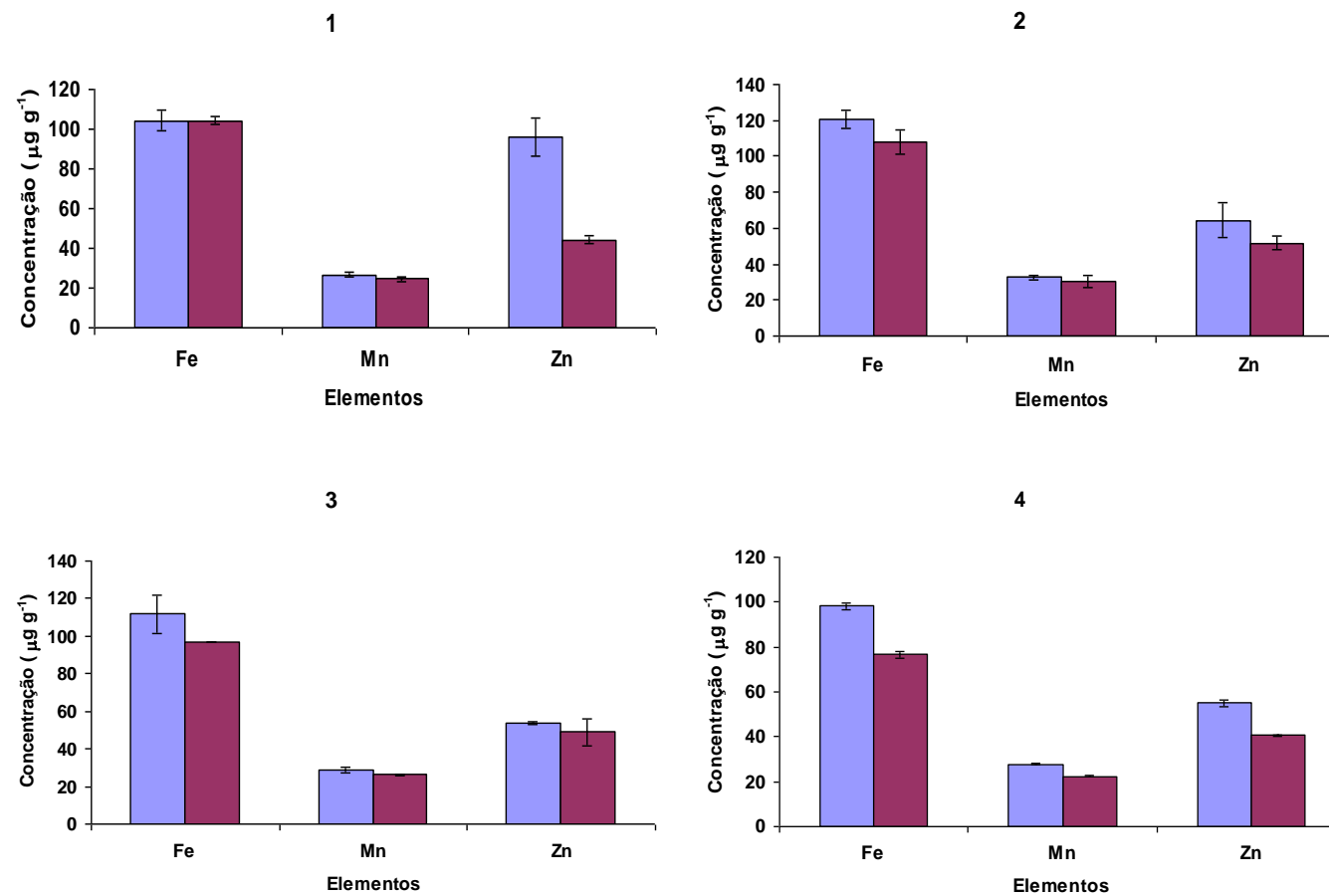


Figura 20. Concentrações ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) dos micro elementos Fe, Mn e Zn quando na ausência (■) e presença (■) de padrão interno para as amostras 1, 2, 3 e 4



**Tabela 14. Teor médio (mg g<sup>-1</sup>) ± desvio padrão (n = 3) de Ca, K, Mg, Na e P por ICP OES em amostras de proteína texturizada de soja para decomposição em forno de microondas com radiação focalizada**

Amostras	Ca	K	Mg	Na	P
1	0,48 ± 0,03	5,16 ± 0,26	0,64 ± 0,03	0,12 ± 0,01	1,44 ± 0,10
2	0,54 ± 0,04	5,52 ± 0,21	0,67 ± 0,02	0,079 ± 0,011	1,72 ± 0,06
3	0,45 ± 0,02	5,04 ± 0,09	0,62 ± 0,01	0,15 ± 0,02	1,67 ± 0,02
4	0,27 ± 0,04	3,57 ± 0,63	0,49 ± 0,09	0,11 ± 0,02	0,13 ± 0,02

**Tabela 15. Teor médio (µg g<sup>-1</sup>) ± desvio padrão (n = 3) de Cr, Cu, Fe, Mn, Ni e Zn por ICP OES em amostras de proteína texturizada de soja para decomposição em forno de microondas com radiação focalizada**

Amostras	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Zn
1	1,76 ± 0,28	7,78 ± 0,60	104,30 ± 1,99	24,46 ± 0,91	1,64 ± 0,19	44,11 ± 2,05
2	1,52 ± 0,34	12,47 ± 1,46	107,88 ± 6,93	30,47 ± 3,39	2,70 ± 0,65	51,65 ± 3,80
3	1,82 ± 0,28	8,71 ± 0,80	96,75 ± 0,14	26,30 ± 0,43	2,05 ± 0,48	49,98 ± 2,10
4	0,34 ± 0,16	7,09 ± 0,15	76,51 ± 1,50	22,42 ± 0,35	0,67 ± 0,19	40,7 ± 0,29

Avaliando o procedimento de decomposição via úmida empregando aquecimento por microondas, é possível constatar que para a decomposição de 500 mg de amostras de proteína texturizada de soja mediante utilização de forno de microondas com radiação focalizada, foram obtidos resultados para Cr, Cu, Fe, Mn, Ni e Zn comparáveis aos obtidos nas decomposições em chapa aquecedora e bloco digestor. Quanto às figuras de mérito, foram obtidos menores valores para LOD e LOQ, bem como o teor de carbono residual. O procedimento demonstrou ser simples, e características como precisão e exatidão foram obtidas quando aplicado material de referência certificado.

A acidez residual dos digeridos obtidos para este método correspondeu a 1,0 mol L<sup>-1</sup>. A eficiência de decomposição para este procedimento foi estimada pela determinação do teor de carbono residual (%) [41], e o valor obtido correspondeu a 0,084%.

#### **4.4 Aplicação do procedimento de decomposição por via seca**

A decomposição de amostras por via seca assistida por forno mufla é um dos procedimentos mais simples para a decomposição de amostras orgânicas e biológicas. Limitações associadas a este procedimento podem ser descritas como: perda parcial ou completa de elementos que podem ser convertidos em uma forma volátil; longo tempo de execução e alto risco de contaminação. No entanto, existem algumas vantagens relacionadas à utilização deste procedimento para a decomposição de amostras, tais como possibilidade de utilização de maior massa de amostra e simplicidade de execução, o que define seu emprego como procedimento referência na determinação da exatidão de outros procedimentos de preparo de amostras [57]. No presente trabalho, o procedimento de incineração das amostras de proteína texturizada de soja (PR) foi realizado de acordo com o método oficial de referência (AOAC) 999.11 [59], e as concentrações de Cr, Cu, Fe, Mn, Ni e Zn foram determinadas para os quatro diferentes tipos de amostra, visando posterior comparação com os valores obtidos para os procedimentos de decomposição propostos (Tabela 17).

Considerando o procedimento de incineração como referência, é possível constatar que os resultados obtidos foram mais concordantes quando comparado aos procedimentos em chapa aquecedora e bloco digestor, essencialmente para as amostras 2 e 4. Para a amostra 1, os resultados foram concordantes apenas com o procedimento em chapa aquecedora, enquanto que para a amostra 3 não foram obtidos resultados concordantes, ao nível de 95% de confiança. Estes resultados podem ser creditados a possível contaminação, a perdas durante o procedimento e/ou as diferentes granulometrias entre as amostras.

#### **4.5 Comparação entre os três procedimentos de decomposição estudados.**

Não existem informações sobre a composição mineral das amostras coletadas, o que define a importância da investigação acerca dos nutrientes, de forma a estabelecer um perfil preliminar, dos quatro tipos de proteína texturizada de soja investigados no presente estudo.

As Tabelas 16 e 17 se referem à comparação entre as concentrações dos analitos estudados para os 3 procedimentos analíticos de decomposição investigados. Para os macro elementos não foi constatada diferença significativa entre PC e PB. A tendência negativa observada nos resultados obtidos para Ca e Mg nas decomposições das amostras utilizando PF, pode ser justificada pela provável formação de sulfatos pouco solúveis, ou ainda por problemas associados ao equipamento empregado para a digestão.

No que diz respeito aos micro elementos avaliados, comparando os resultados obtidos quando se utilizou PB e PF, não foi encontrada diferença significativa, ao nível de 95% de confiança.

De forma a fazer uma avaliação comparativa sobre a composição mineral das amostras de proteína texturizada de soja investigadas neste trabalho, foi selecionado o procedimento PB, e os resultados estão mostrados nas Figuras 21 e 22. É possível concluir que as concentrações de Ca, Mg e P, são similares para todas as amostras.

Para os elementos Cu, Fe, Mn e Ni foram encontradas maiores concentrações na amostra 2, enquanto que o teor de Zn encontrado na amostra 1 foi o maior.

Tabela 16. Teor médio (mg g<sup>-1</sup>) ± desvio padrão (n = 3) de Ca, K, Mg, Na e P por ICP OES em amostras de proteína texturizada de soja para diferentes procedimentos de decomposição

Amostras	Procedimento	Ca	K	Mg	Na	P
1	Chapa	2,45 ± 0,1	17,73 ± 0,78	3,10 ± 0,11	0,53 ± 0,05	6,99 ± 0,22
	Bloco	2,06 ± 0,11	18,79 ± 1,03	2,53 ± 0,14	1,27 ± 0,28	5,51 ± 0,34
	Microondas	0,48±0,03	5,16±0,26	0,64±0,03	0,12±0,01	1,44±0,10
2	Chapa	2,02 ± 0,13	15,88 ± 0,69	2,68 ± 0,15	0,55 ± 0,06	6,49 ± 0,25
	Bloco	2,27 ± 0,07	21,40 ± 0,21	2,90 ± 0,02	0,07 ± 0,11	6,40 ± 0,04
	Microondas	0,54±0,04	5,52±0,21	0,67±0,02	0,079±0,011	1,72±0,06
3	Chapa	2,26 ± 0,12	17,43 ± 0,99	3,00 ± 0,17	0,59 ± 0,05	7,57 ± 0,55
	Bloco	2,58 ± 0,24	23,39 ± 2,15	3,17 ± 0,29	0,08 ± 0,12	7,04 ± 0,75
	Microondas	0,45±0,02	5,04±0,09	0,62±0,01	0,15±0,02	1,67±0,02
4	Chapa	1,82 ± 0,24	14,29 ± 1,60	2,42 ± 0,29	0,33 ± 0,06	6,02 ± 0,64
	Bloco	2,13 ± 0,07	20,08 ± 0,81	2,68 ± 0,10	0,30 ± 0,07	6,05 ± 0,27
	Microondas	0,27±0,04	3,57±0,63	0,49±0,09	0,11±0,02	0,13±0,02

Tabela 17. Teor médio ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )  $\pm$  desvio padrão (n = 3) de Cr, Cu, Fe, Mn, Ni e Zn por ICP OES em amostras de proteína texturizada de soja para diferentes procedimentos de decomposição

Amostras	Procedimento	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Zn
1	<b>Incineração</b>	0,49 $\pm$ 0,07	7,31 $\pm$ 0,06	88,67 $\pm$ 7,11	24,74 $\pm$ 1,73	1,09 $\pm$ 0,10	44,11 $\pm$ 1,05
	<b>Chapa</b>	0,47 $\pm$ 0,06	6,64 $\pm$ 0,04	86,60 $\pm$ 0,55	24,84 $\pm$ 1,10	1,01 $\pm$ 0,11	33,83 $\pm$ 4,82
	<b>Bloco</b>	0,19 $\pm$ 0,06	6,19 $\pm$ 0,35	68,71 $\pm$ 2,44	20,61 $\pm$ 0,36	0,75 $\pm$ 0,1	52,36 $\pm$ 1,26
	<b>Focalizadas</b>	1,76 $\pm$ 0,28	7,78 $\pm$ 0,60	104,30 $\pm$ 0,99	24,46 $\pm$ 0,91	1,64 $\pm$ 0,19	44,11 $\pm$ 2,05
2	<b>Incineração</b>	0,17 $\pm$ 0,05	10,38 $\pm$ 1,13	92,75 $\pm$ 1,11	24,63 $\pm$ 1,89	1,06 $\pm$ 0,09	47,70 $\pm$ 1,80
	<b>Chapa</b>	0,83 $\pm$ 0,05	8,10 $\pm$ 0,28	78,67 $\pm$ 9,94	24,03 $\pm$ 0,69	1,59 $\pm$ 0,21	30,52 $\pm$ 3,99
	<b>Bloco</b>	< LOQ	10,18 $\pm$ 0,56	90,56 $\pm$ 6,12	27,23 $\pm$ 0,84	1,75 $\pm$ 0,09	43,39 $\pm$ 1,43
	<b>Focalizadas</b>	1,52 $\pm$ 0,34	12,47 $\pm$ 1,46	107,88 $\pm$ 6,93	30,47 $\pm$ 3,39	2,70 $\pm$ 0,65	51,65 $\pm$ 3,80
3	<b>Incineração</b>	0,45 $\pm$ 0,09	7,35 $\pm$ 0,13	70,42 $\pm$ 8,94	19,97 $\pm$ 0,43	0,55 $\pm$ 0,05	43,32 $\pm$ 0,35
	<b>Chapa</b>	1,03 $\pm$ 0,12	6,52 $\pm$ 0,13	77,49 $\pm$ 4,71	22,29 $\pm$ 1,26	1,20 $\pm$ 0,07	37,91 $\pm$ 4,31
	<b>Bloco</b>	< LOQ	8,55 $\pm$ 1,07	85,18 $\pm$ 7,55	25,99 $\pm$ 2,66	1,48 $\pm$ 0,28	53,84 $\pm$ 0,85
	<b>MW</b>	1,82 $\pm$ 0,28	8,71 $\pm$ 0,8	96,75 $\pm$ 0,14	26,30 $\pm$ 0,43	2,05 $\pm$ 0,48	49,98 $\pm$ 2,10
4	<b>Incineração</b>	0,37 $\pm$ 0,11	7,60 $\pm$ 0,30	79,14 $\pm$ 1,63	22,10 $\pm$ 0,67	0,49 $\pm$ 0,04	47,02 $\pm$ 1,62
	<b>Chapa</b>	0,76 $\pm$ 0,17	4,58 $\pm$ 0,64	53,14 $\pm$ 0,99	16,53 $\pm$ 1,41	0,75 $\pm$ 0,07	14,40 $\pm$ 2,22
	<b>Bloco</b>	0,31 $\pm$ 0,07	6,90 $\pm$ 0,35	71,48 $\pm$ 0,56	21,76 $\pm$ 0,97	1,03 $\pm$ 0,19	41,97 $\pm$ 1,49
	<b>Focalizadas</b>	0,34 $\pm$ 0,16	7,09 $\pm$ 0,15	76,51 $\pm$ 1,5	22,42 $\pm$ 0,35	0,67 $\pm$ 0,19	40,7 $\pm$ 0,29

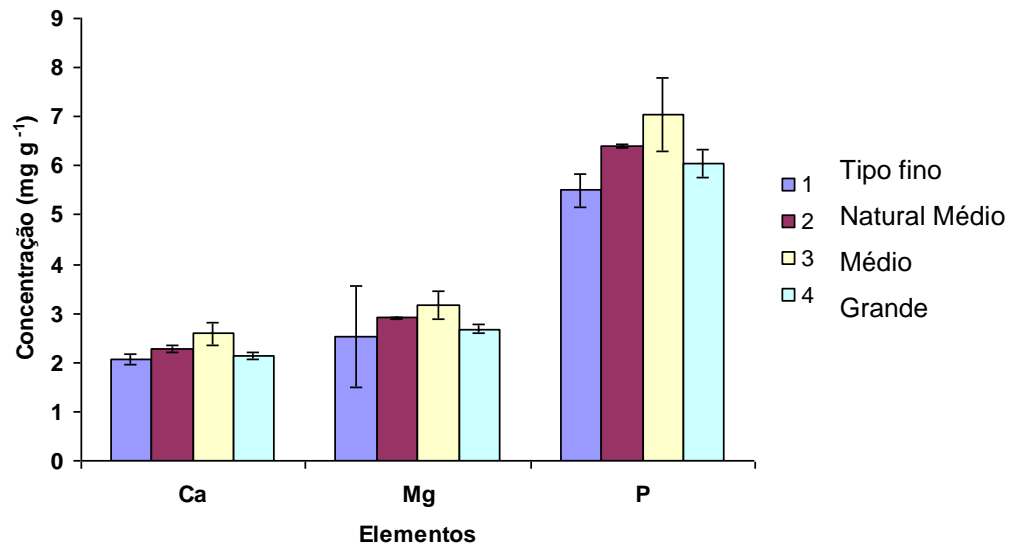


Figura 21. Concentrações de Ca, Mg e P para as amostras de proteína texturizada de soja em diferentes granulometrias considerando a decomposição em bloco digestor (PB)

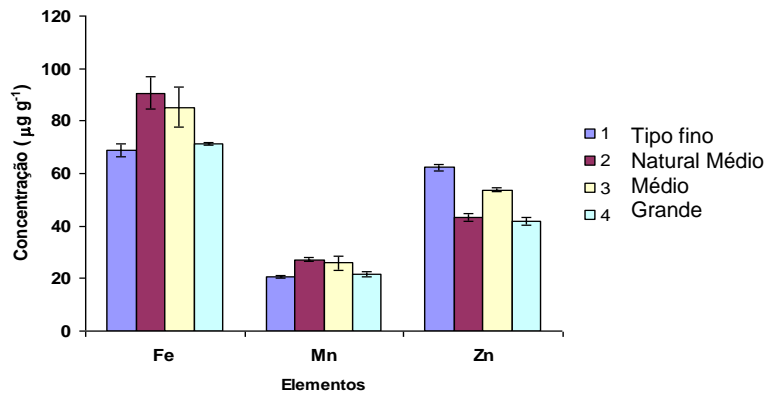
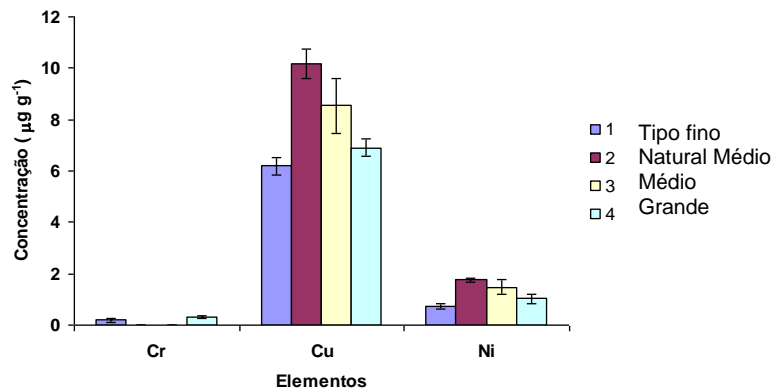


Figura 22. Concentrações de Cr, Cu, Fe, Mn, Ni e Zn para as amostras de proteína texturizada de soja em diferentes granulometrias considerando a decomposição em bloco digestor (PB)

## **4.6 Resultados para a determinação de ferro em amostras de proteína texturizada de soja empregando microssistemas**

Com o objetivo de determinar a concentração de ferro em amostras de proteína texturizada de soja, considerando a notável importância deste elemento como contribuição ao desenvolvimento do corpo humano, sendo o mesmo essencial na síntese da hemoglobina e fundamental como ativador metálico para inúmeras enzimas, foram construídos sistemas miniaturizados para utilização em análise por injeção em fluxo com diferentes configurações, no que se refere ao “*layout*” do sistema, de acordo com a corrente tendência de miniaturização dos métodos analíticos visando compacticidade para todo o sistema, portabilidade e uma significativa redução no consumo de reagentes o que define redução no custo e nos resíduos químicos descartados. As amostras foram digeridas utilizando PF, pela constatação do menor valor para acidez residual associado a este procedimento, conforme programa descrito no item **3.7.4**. As amostras e as soluções de referência, bem como os reagentes utilizados no estudo, foram inseridos no microssistema mediante injeção hidrodinâmica sob um fluxo contínuo de  $50 \mu\text{L min}^{-1}$ , usando uma bomba peristáltica. As medidas de absorvância foram obtidas através de um LED com máximo de emissão definido em 500 nm.

### **4.6.1 Ensaios preliminares**

De acordo com o procedimento descrito na Figura 8, um microssistema com canais de  $303 \mu\text{m}$  de largura e  $271 \mu\text{m}$  de profundidade foi devidamente construído para a realização dos primeiros estudos objetivando a quantificação de ferro nas referidas amostras. Após a construção do microssistema, um elastômero não absorvente na região visível do espectro eletromagnético foi então obtido [60]. As agulhas e as fibras ópticas foram adaptadas ao microssistema e as conexões foram então testadas mediante injeção de fluxo contínuo de água numa vazão de  $3,0 \text{ mL min}^{-1}$ . Nenhum vazamento foi constatado após 30 minutos de fluxo contínuo (Figura 23).

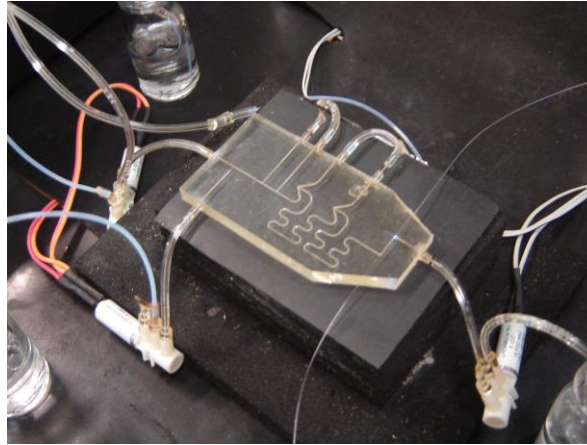


Figura 23. Adaptação das agulhas e fibras ópticas para o devido funcionamento do microssistema

O microssistema proposto, mostrado nas Figuras 24 e 25, com dimensões de 5 cm x 2 cm x 0,4 cm, mantém características imprescindíveis para um sistema FIA como alça de amostragem (**L.A.**), canal de reação (**C.R.**) e cela de fluxo (0,5 cm de caminho óptico). As operações básicas de um sistema de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica convencional podem, portanto, ser realizadas. Um volume de 7,0  $\mu\text{L}$  foi calculado para todo o sistema e um volume de 0,6  $\mu\text{L}$  foi definido para o *loop* de amostragem (**ab**), de acordo com as dimensões dos canais.

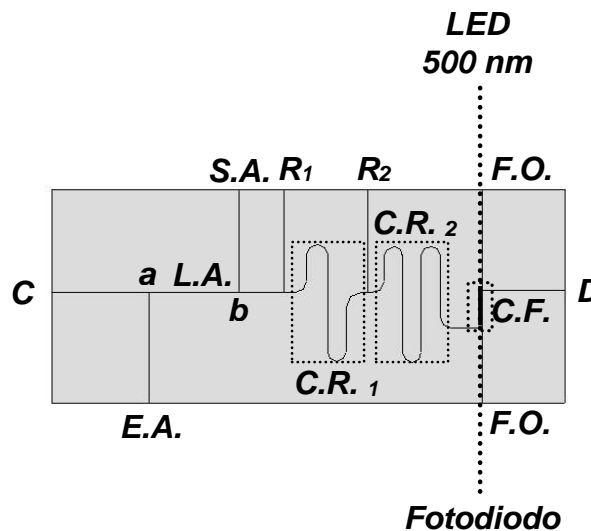
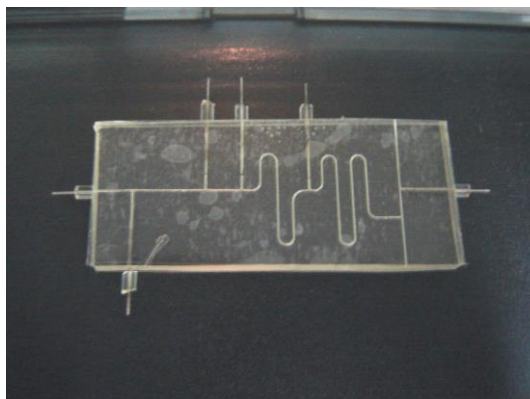


Figura 24. Microssistema proposto para determinação de ferro em derivados de soja. C, carregador; E.A., Entrada de Amostra; S.A., Saída de Amostra; L.A., *Loop* de Amostragem ( $ab = 0,6 \mu\text{L}$ ); R<sub>1</sub>, Canal para inserção de Reagente; R<sub>2</sub>, Canal para inserção de Reagente; C.R.<sub>1</sub>, Canal de reação (4 cm); C.R.<sub>2</sub>, Canal de reação (6 cm); F.O., Fibra Óptica; C.F., Cela de Fluxo (0,5 cm); D, Descarte

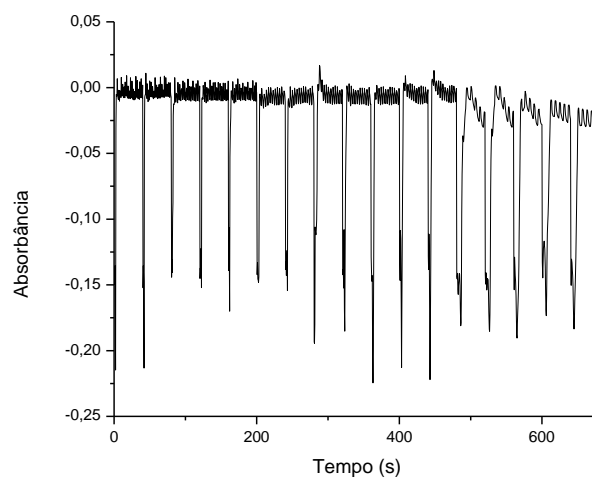




**Figura 25. Microsistema para determinação de ferro em digeridos de proteína texturizada de soja**

Este microsistema foi construído admitindo a utilização de confluências para a determinação de ferro, fundamentado no método tradicional empregado para este fim, baseado na complexação do referido analito com 1-10 fenantrolina. Nos primeiros testes efetuados, foi utilizado ácido sulfúrico na concentração de  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  como carregador (**C**), ácido ascórbico na concentração de 1% (m/v) em **R**<sub>1</sub>, e 1-10 fenantrolina 0,3% (m/v) em tampão citrato de sódio 10% (m/v) em **R**<sub>2</sub>. Inicialmente, a amostra carregada pelo  $\text{H}_2\text{SO}_4$  se mistura por confluência em **C.R.**<sub>1</sub> com o ácido ascórbico injetado em **R**<sub>1</sub> para que a redução do  $\text{Fe}^{3+}$  para  $\text{Fe}^{2+}$  presente na amostra ocorra. O ácido ascórbico foi escolhido como redutor, preferencialmente ao cloreto de hidroxilamina, em virtude do seu maior poder redutor, quando empregado em soluções muito ácidas ( $\text{pH} < 1$ ) [20]. Por conseguinte, a complexação entre o  $\text{Fe}^{2+}$  e a 1-10 fenantrolina em pH adequado (2 – 9) ocorre em **C.R.**<sub>2</sub> para posterior detecção fotométrica.

Uma solução de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{Fe}^{3+}$  em  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  foi então injetada em **E.A.** para primeira avaliação. Os primeiros resultados obtidos indicam a existência de sinais espúrios causados pelo efeito Schlieren (Figura 26). Em sistemas de análise por injeção em fluxo, a amostra é transportada por uma solução carregadora até o detector. Um gradiente de concentração é formado quando a amostra é dispersa durante este transporte. Em sistemas FIA, a formação de intensos gradientes de concentração promove a formação de índices de refração na zona de amostra. Os índices de refração são formados em diferentes interfaces promovendo a focalização do feixe de radiação em direção ao detector ou ainda o espalhamento da radiação, o que define a formação de picos distorcidos ou invertidos [61,62]. No intuito de atingir a supressão deste efeito, foram testadas diferentes concentrações dos reagentes  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , ácido ascórbico, citrato de sódio e 1-10 fenantrolina nas respectivas faixas de concentração:  $0,05 - 1 \text{ mol L}^{-1}$ ;  $0,1 - 1 \%$  (m/v);  $1 - 10 \%$  (m/v) e  $0,01 - 0,3 \%$  (m/v).



**Figura 26. Gráfico de Absorbância x Tempo para a injeção de 10 mg L<sup>-1</sup> de Fe<sup>3+</sup>**

Foram injetadas soluções de Fe<sup>2+</sup> e Fe<sup>3+</sup> em meio ácido (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), sob diferentes concentrações, variando entre os valores de 1 e 10 mg L<sup>-1</sup>. Entretanto, não foram obtidos resultados satisfatórios, conseqüentemente o problema relacionado ao efeito Schlieren não foi resolvido.

#### **4.6.2 Construção de um novo microsistema alterando a configuração**

De acordo com o procedimento descrito na Figura 8, um novo microsistema com canais de 303 µm de largura e 271 µm de profundidade foi devidamente construído. Sua configuração está mostrada nas Figuras 27 e 28.

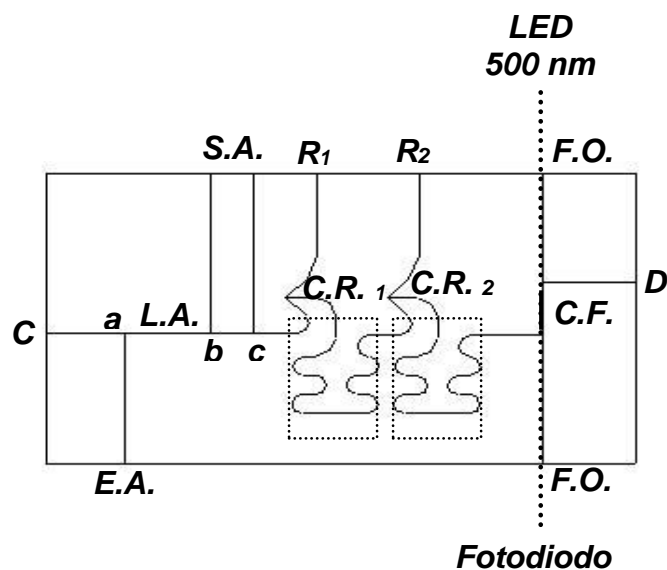


Figura 27. Novo microsistema proposto para determinação de ferro em derivados de soja. C, carregador; E.A., Entrada de Amostra; S.A., Saída de Amostra (dois canais possíveis); L.A., Loop de Amostragem ( $ab = 0,6 \mu\text{L}$ ,  $ac = 1,0 \mu\text{L}$ ); R<sub>1</sub>, Canal para inserção de Reagente; R<sub>2</sub>, Canal para inserção de Reagente; C.R.<sub>1</sub>, Canal de reação (7 cm); C.R.<sub>2</sub>, Canal de reação (7 cm); F.O., Fibra Óptica; C.F., Cella de Fluxo (0,5 cm); D, Descarte

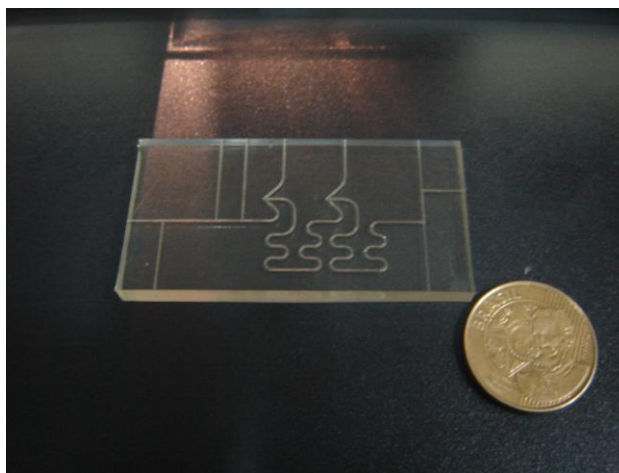


Figura 28. Novo microsistema proposto para determinação de ferro

Após a adaptação das agulhas e das fibras ópticas, os primeiros testes foram realizados para o novo microsistema, com dimensões de 5 cm x 2 cm x 0,4 cm. Um volume de 9,0  $\mu\text{L}$  foi calculado para todo o sistema e volumes de 0,6 e 1,0  $\mu\text{L}$  foram definidos para

os *loops* de amostragem **ab** e **ac**, respectivamente, de acordo com as dimensões dos canais.

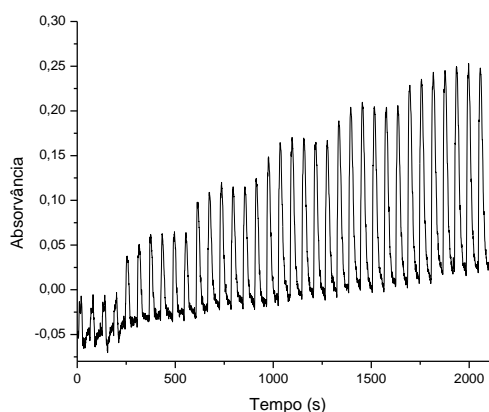
Os primeiros ensaios efetuados neste microssistema foram desenvolvidos utilizando ácido sulfúrico na concentração de  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  como carregador (**C**), ácido ascórbico na concentração de 0,2% (m/v) em **R<sub>1</sub>** e 1-10 fenantrolina a 0,02% (m/v) em tampão citrato de sódio 0,3% (m/v) em **R<sub>2</sub>**. A amostra carregada pelo  $\text{H}_2\text{SO}_4$  mistura-se, por confluência em **C.R.<sub>1</sub>**, com o ácido ascórbico injetado em **R<sub>1</sub>** para que a redução do  $\text{Fe}^{3+}$  para  $\text{Fe}^{2+}$  presente na amostra ocorra. Por conseguinte, a complexação entre o  $\text{Fe}^{2+}$  e a 1-10 fenantrolina ocorre em **C.R.<sub>2</sub>** para posterior detecção fotométrica.

Soluções de  $\text{Fe}^{3+}$  em meio ácido ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) ( $0,01 - 1 \text{ mol L}^{-1}$ ) nas concentrações de 1 a  $10 \text{ mg L}^{-1}$  foram injetadas em **E.A.** para os estudos subseqüentes. Foram avaliadas duas alças de amostragem (**ab** e **ac**) passíveis de injeção das soluções de ferro. As concentrações dos reagentes  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , ácido ascórbico, citrato de sódio e 1-10 fenantrolina foram avaliadas nas respectivas faixas de concentração:  $0,05 - 1 \text{ mol L}^{-1}$ ;  $0,1 - 2 \%$  (m/v);  $0,3 - 3 \%$  (m/v) e  $0,01 - 0,05 \%$  (m/v).

Os resultados obtidos, utilizando esta configuração e as concentrações dos reagentes já descritas, evidenciaram a existência do efeito Schilieren ainda pronunciado, não sendo constatada, também, diferença significativa entre os resultados obtidos para a injeção da solução do branco e das soluções de  $\text{Fe}^{3+}$ . Portanto, foi necessária a alteração na configuração definida para a injeção dos reagentes no microssistema.

Avaliou-se o efeito da utilização de ácido ascórbico como carregador (**C**) e da injeção de 1-10 fenantrolina tamponada em citrato de sódio, no canal **R<sub>1</sub>**. Desse modo, a redução de  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  e a complexação deste último com a 1-10 fenantrolina em pH adequado ocorre quase que simultaneamente nos canais de reação **C.R.<sub>1</sub>** e **C.R.<sub>2</sub>** (14 cm no total). O *loop* de amostragem utilizado preferencialmente foi o **ac** ( $1,0 \mu\text{L}$ ). Com um maior volume de amostra e maior canal de reação, espera-se uma mistura mais efetiva, promovendo a supressão do efeito Schilieren e melhorando a resolução dos sinais obtidos, o que torna possível a quantificação de ferro pelo método proposto.

Uma curva analítica para soluções padrão de  $\text{Fe}^{3+}$  foi construída, nas concentrações de 1 a  $5 \text{ mg L}^{-1}$ , em meio de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , ácido ascórbico 0,2% (m/v) e 1-10 fenantrolina 0,02% (m/v), em citrato de sódio 0,3% (m/v). A curva analítica apresentou boa relação linear ( $r = 0,9997$ ) como pode ser observado na Figura 29.



**Figura 29. Diagrama obtido para a curva analítica de calibração para  $\text{Fe}^{3+}$  (1 a 5  $\text{mg L}^{-1}$ )**

A acidez residual dos digeridos (obtidos após decomposição das amostras de proteína texturizada de soja utilizando PF) apresentou valores de cerca de  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ , o que torna inviável a utilização da configuração utilizada até então para a quantificação de ferro. Para tanto, foi também avaliada a utilização de sulfato de sódio objetivando o ajuste dos gradientes de concentração formados na zona da amostra atenuando, conseqüentemente, o efeito Schlieren, responsável pela diminuição da sensibilidade analítica. Em outra etapa experimental, o digerido da amostra foi injetado diretamente no microsistema (acidez de  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ ), sem a diluição prévia da mesma. Constatou-se a necessidade de otimização das concentrações dos reagentes.

Utilizando ácido ascórbico como carregador (**C**) e promovendo a injeção de 1-10 fenantrolina tamponada em ácido acético/acetato de sódio ( $\text{HAc}/\text{Ac}^-$ ) no canal **R<sub>1</sub>** e mantendo o canal **R<sub>2</sub>** inativo, foram realizados novos testes no intuito de quantificar ferro nos digeridos de proteína texturizada de soja. Assim, a redução de  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  e a complexação deste último com a 1-10 fenantrolina em pH adequado ocorrem novamente nos canais de reação **C.R.<sub>1</sub>** e **C.R.<sub>2</sub>** (14 cm no total) fazendo uso preferencial do *loop* de amostragem **ac** ( $1,0 \mu\text{L}$ ). Em virtude do maior tamanho deste *loop*, a probabilidade do surgimento do efeito Schlieren é menor.

As concentrações dos reagentes ácido ascórbico, tampão  $\text{HAc}/\text{Ac}^-$  e 1-10 fenantrolina foram avaliadas nas respectivas faixas de concentração: 0,1 – 1%; 0,1 – 5  $\text{mol L}^{-1}$ ; 0,05 – 0,1 % (m/v), considerando a injeção de soluções de  $\text{Fe}^{3+}$  nas concentrações de 1–10  $\text{mg L}^{-1}$  em meio ácido ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ : 0,05 – 1  $\text{mol L}^{-1}$ ).

A avaliação das concentrações dos reagentes objetivando injeção dos digeridos das amostras de proteína texturizada de soja na concentração ácida de  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  não demonstrou, até então, resultados satisfatórios no que diz respeito, essencialmente, à

redução dos sinais espúrios causados pelo efeito Schlieren e à boa resolução dos sinais obtidos.

#### 4.6.3 Construção de um novo microsistema alterando as dimensões

Por conseguinte, idealizou-se a construção de um novo microsistema com canais maiores em largura e profundidade no intuito de obter uma mistura mais efetiva entre a amostra e os reagentes, melhorando, desse modo, a resolução dos sinais obtidos. De acordo com o procedimento descrito na Figura 8, um novo microsistema com canais de 529  $\mu\text{m}$  de largura e 505  $\mu\text{m}$  de profundidade foi devidamente construído. O “*layout*” deste novo microsistema é o mesmo anteriormente descrito. Após a adaptação das agulhas e das fibras ópticas, os primeiros testes foram realizados para o novo microsistema com dimensões de 5 cm x 2 cm x 0,4 cm. Um volume de 25,0  $\mu\text{L}$  foi calculado para todo o sistema e volumes de 1,6  $\mu\text{L}$  e 2,4  $\mu\text{L}$  foram definidos para os *loops* de amostragem **ab** e **ac** respectivamente, de acordo com as dimensões dos canais.

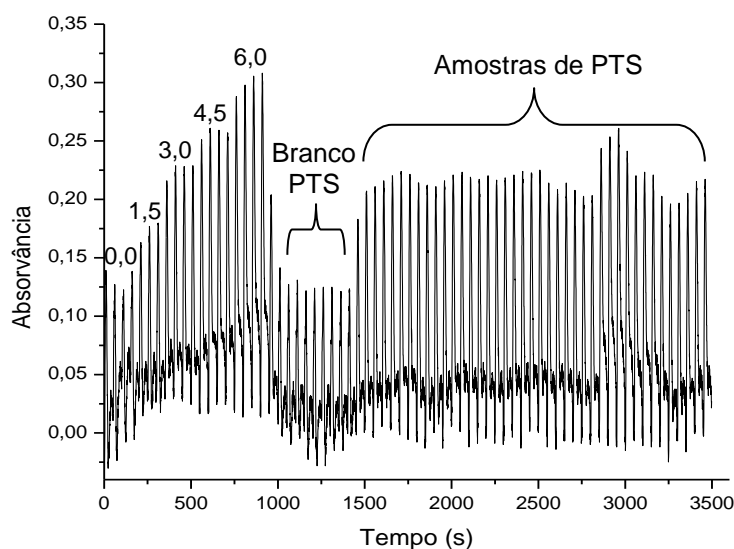
##### 4.6.3.1 Estudos com configuração em linha única

Os estudos prosseguiram com testes similares aos efetuados anteriormente para o microsistema com canais de 303  $\mu\text{m}$  de largura e 271  $\mu\text{m}$  de profundidade (Figura 27). Entretanto, os primeiros resultados satisfatórios foram obtidos quando utilizada configuração em linha única. Nesta ocasião, foi utilizado ácido ascórbico 0,1% (m/v) como carregador (**C**), e a injeção de 1-10 fenantrolina 0,1% (m/v) em tampão HAc/Ac<sup>-</sup> na concentração de 1,0 mol L<sup>-1</sup> foi também efetuada em **C**, mantendo inativos os canais **R<sub>1</sub>** e **R<sub>2</sub>**. A configuração deste sistema foi, portanto, definida como em linha única de modo que a redução do ferro e a complexação deste com a 1-10 fenantrolina ocorrem ao longo dos canais de reação **C.R.<sub>1</sub>** e **C.R.<sub>2</sub>** (14 cm no total). O *loop* de amostragem utilizado foi o **ab**, por promover sinais com menor ruído e pela constatação de maior diferença entre o sinal do branco e o correspondente a concentrações reduzidas de Fe<sup>2+</sup>.

As soluções analíticas de calibração de Fe<sup>3+</sup> foram preparadas em meio ácido (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,0 mol L<sup>-1</sup>) e injetadas no microsistema em **E.A.** na configuração descrita previamente para obtenção dos sinais analíticos. Posteriormente, os digeridos foram injetados sem diluição prévia, na concentração ácida de 1,0 mol L<sup>-1</sup>. O fiograma obtido na determinação espectrofotométrica de ferro em proteína texturizada de soja utilizando linha única é mostrado na Figura 30. Nota-se que o aspecto do fiograma obtido é similar àqueles obtidos por um sistema FIA convencional. A precisão das medidas foi avaliada de acordo

com os sinais obtidos para as injeções das amostras numa avaliação média, apresentando valor de 3,26% (RSD%).

O uso de uma vazão de  $50 \mu\text{L min}^{-1}$  promoveu uma frequência analítica de 36 injeções  $\text{h}^{-1}$ . Este valor, no entanto, é inferior aos valores convencionalmente obtidos por sistemas FIA convencionais ( $120 \text{ h}^{-1}$ ) [20]. Contudo, esta desvantagem aparente é minimizada quando avaliada a quantidade de resíduo produzida pelo sistema, cerca de 24 mL de solução para o correspondente a 8 horas de trabalho.



**Figura 30. Diagrama obtido na determinação de ferro ( $n=3$ ) em amostras de proteína texturizada de soja utilizando configuração em linha única**

A Química Verde é definida como sendo a utilização da química como agente de prevenção da poluição, seja esta ao ser humano, como também ao meio ambiente. Uma grande variedade de métodos analíticos promove a geração de grandes quantidades de resíduos, definindo causa de impacto ambiental. Os parâmetros mais importantes a serem avaliados nas considerações sobre a Química Verde são a toxicidade e a quantidade gerada de resíduos [63,64].

A Figura 30 evidencia o diagrama obtido na análise das amostras de proteína texturizada de soja. Nele são ilustrados também os sinais obtidos quando injetadas as soluções de calibração de ferro ( $0,0 - 6,0 \text{ mg L}^{-1}$ ), para posterior construção da curva analítica, que demonstrou boa correlação linear ( $r = 0,9988$ ). Os limites de detecção e de quantificação foram de  $0,56$  e  $1,87 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente.

A tabela 18 lista os resultados obtidos utilizando o microssistema FIA, bem como os resultados obtidos mediante o emprego da técnica de espectrometria de emissão óptica por plasma indutivamente acoplado para a determinação de ferro nas amostras de proteína de soja. Ao nível de 95% de confiança, não foram constatadas diferenças significativas, exceto para a amostra 4.

**Tabela 18. Determinação de Fe<sup>2+</sup> em amostras de proteína texturizada de soja (n=3), utilizando configuração em linha única**

Amostra	ICP OES ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	$\mu\text{FIA}$ ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
1	104,30 $\pm$ 1,99	117,30 $\pm$ 6,30
2	107,88 $\pm$ 6,93	127,16 $\pm$ 3,57
3	96,75 $\pm$ 0,14	119,44 $\pm$ 8,07
4	76,51 $\pm$ 1,50	111,82 $\pm$ 1,35

#### 4.6.3.2 Estudos admitindo configuração em confluência.

Conforme descrição em parágrafos anteriores, a utilização de sulfato de sódio como atenuador do efeito Schlieren, fenômeno causado pela formação de intensos gradientes de índice de refração, foi avaliada mediante estudos realizados no microssistema construído com canais de 529  $\mu\text{m}$  de largura e 505  $\mu\text{m}$  de profundidade.

A adição de um soluto inerte, com o objetivo de adequar o índice de refração do reagente àquele das amostras tem sido amplamente utilizada para a redução do efeito Schlieren em sistemas de análise por injeção em fluxo [62]. A utilização de soluções carregadoras com características físico-químicas similares à das amostras e a utilização de confluência para introdução de reagentes [65] têm se mostrado eficaz na tentativa de redução do efeito Schlieren pela prevenção de formação de gradientes de índice de refração.

Nos estudos subseqüentes, foi utilizado o sulfato de sódio como sal inerte, e a configuração do sistema foi definida em confluência. Ácido ascórbico foi utilizado como carregador (**C**), injetado juntamente com ácido acético e sulfato de sódio. A 1-10 fenantrolina foi injetada em **R**<sub>1</sub> juntamente com ácido acético e sulfato de sódio. O canal **R**<sub>2</sub> permaneceu inativo, de modo que a complexação do Fe<sup>2+</sup> com a 1-10 fenantrolina ocorre ao longo dos canais de reação **C.R.**<sub>1</sub> e **C.R.**<sub>2</sub>. A alça de amostragem utilizada foi a **ab**, por esta proporcionar sinais com menor ruído e pela constatação de maior diferença entre o sinal do branco e o correspondente a concentrações reduzidas de Fe<sup>2+</sup>. As soluções de calibração,



assim como os digeridos das amostras, foram injetadas em **E.A.** em adição a acetato de sódio na proporção de 1:1 e água na proporção de 1:2.

A utilização de ácido acético, acetato de sódio e sulfato de sódio foi implementada objetivando o equilíbrio entre as espécies iônicas presentes no sistema, minimizando o efeito Schlieren, bem como a implementação de tampão para a adequação do pH para a formação do complexo estável entre o ferro (II) e a 1-10 fenantrolina. As concentrações dos reagentes: ácido ascórbico, ácido acético, 1-10 fenantrolina, sulfato de sódio e acetato de sódio foram avaliadas nas respectivas faixas de concentração: 0,1 – 1 % (m/v), 0,5 – 2 mol L<sup>-1</sup>, 0,05 – 0,3 % (m/v), 0,5 – 2 mol L<sup>-1</sup>, 0,5 – 2 mol L<sup>-1</sup>. As concentrações definidas para tais reagentes corresponderam a 0,1 % (m/v), 1 mol L<sup>-1</sup>, 0,1 % (m/v), 0,5 mol L<sup>-1</sup>, 2 mol L<sup>-1</sup>, respectivamente.

A precisão das medidas foi avaliada de acordo com os sinais obtidos para as injeções das amostras numa avaliação média, apresentando valor de 4,8% (RSD%).

O uso de uma vazão de 50 µL min<sup>-1</sup> promoveu uma frequência analítica de 33 injeções h<sup>-1</sup>. A quantidade de resíduo gerada correspondeu a 48 mL para um equivalente a 8 horas de trabalho. A pequena quantidade gerada de resíduos denota a notável adequação dos sistemas µ-FIA aos princípios da Química Verde.

A curva analítica mostrou boa correlação linear ( $r = 0,9995$ ), ao passo que limites de detecção e quantificação na ordem de 0,077 e 0,26 mg L<sup>-1</sup> foram respectivamente obtidos.

A Tabela 19 lista os resultados obtidos utilizando o microsistema FIA e resultados obtidos quando utilizada a técnica de espectrometria de emissão óptica para a determinação de ferro nas amostras de proteína de soja, não sendo constatadas diferenças significativas ao nível de 95% de confiança.

**Tabela 19. Determinação de Fe<sup>2+</sup> em amostras de proteína texturizada de soja (n=3), utilizando configuração em confluência**

Amostra	ICP OES (µg g <sup>-1</sup> )	µFIA (µg g <sup>-1</sup> )
1	104,30 ± 1,99	102,00 ± 1,87
2	107,88 ± 6,93	118,17 ± 8,68
3	96,75 ± 0,14	98,19 ± 1,88
4	76,51 ± 1,50	73,84 ± 3,07

Os resultados obtidos assumindo as configurações em linha única e confluência caracterizam a eficiência destes microsistemas utilizados para a determinação do teor de ferro em digeridos de proteína texturizada de soja, de acordo com os objetivos do trabalho.

# *Capítulo 5*

---

CONSIDERAÇÕES

FINAIS

## 5.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objetivo principal deste trabalho consistiu no desenvolvimento de metodologias analíticas para a determinação de macro e micro elementos em amostras de proteína texturizada de soja. Três procedimentos baseados no princípio de aquecimento condutivo e por radiação microondas foram otimizados objetivando a decomposição das amostras de proteína texturizada de soja, e uma avaliação comparativa entre estes procedimentos é evidenciada na Tabela 20.

**Tabela 20. Comparação entre os procedimentos em chapa aquecedora (PC), bloco digestor (PB) e forno de microondas com radiação focalizada (PF)**

<b>Parâmetros</b>	<b>PC</b>	<b>PB</b>	<b>PF</b>
Massa de Amostra (mg)	500	500	500
Volume de HNO <sub>3</sub> (mL)	5,0	5,0	5,0
Volume de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (mL)	--	--	1,0
Volume de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mL)	5,0	5,0	8
Volume Total de Reagentes (mL)	10,0	10,0	14,0
Tempo de Decomposição (min)	70	60	20
Tempo Total de Análise (min)	190	240	50
RCC (%)	8,4	2,7	0,084
Acidez Residual (mol L <sup>-1</sup> )	2,5	2,5	1,0

Os procedimentos propostos se mostraram simples, não requerendo grande quantidade de ácidos e amostras para a execução. O procedimento em bloco digestor apresentou vantagens como menor volume de reagentes, o que define a menor geração de resíduos, e maior frequência analítica em comparação aos procedimentos PC e PF, e desvantagens como maior teor de carbono residual e maior acidez final dos digeridos, quando comparado à PF embora os resultados obtidos sejam concordantes mediante aplicação de testes estatísticos para este último.

Estudos para avaliação dos efeitos de matriz foram executados no intuito de se constatar a possível influência da solução final, obtida após procedimento de decomposição, sobre a intensidade do sinal dos analitos avaliados, de modo que as inclinações obtidas para as curvas analíticas de calibração construídas nos diferentes meios não apresentaram diferenças significativas, o que define a possibilidade de determinação dos elementos de interesse utilizando curvas analíticas preparadas em meio do ácido diluído.

A adição de padrão interno nos digeridos obtidos mediante utilização de ácido sulfúrico é indispensável, visto que a ausência deste pode influenciar positiva ou negativamente a intensidade do sinal dos analitos. Testes estatísticos foram aplicados e indicaram diferença significativa para a intensidade do sinal de alguns analitos nas amostras de proteína texturizada de soja.

A determinação de elementos como Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P e Zn constitui importante fonte de informação nutricional considerando a relevância destes nutrientes quando associados a dieta alimentar. Estes elementos são imprescindíveis nas reações metabólicas, desempenhando funções vitais em nosso corpo como manutenção do equilíbrio de fluidos, controle da contração muscular, condução do oxigênio para a musculatura e regulação do metabolismo energético [66]. A proteína texturizada de soja é um alimento que apresenta elevado teor protéico como também de alguns elementos a exemplo de Ca, Fe e Zn, destacando a importância do consumo deste subproduto da soja, tem sido administrada em substituição à carne bovina sem constatação de perdas nutricionais e preservando o teor de fibras.

A utilização de sistemas miniaturizados de análise por injeção em fluxo na determinação de  $Fe^{2+}$  foi avaliada segundo seu desempenho, mediante aplicação de duas configurações de fluxo distintas. A primeira configuração admitiu a injeção de todos os reagentes e amostra à solução carregadora (sistema de linha única). Na segunda proposta, a solução tamponada do complexante foi adicionada por confluência ao fluxo carregador contendo a amostra. As duas configurações propostas apresentaram resultados satisfatórios para a quantificação de ferro(II) em PTS com boa sensibilidade e exatidão, quando devidamente comparados àqueles obtidos pela técnica de ICP OES.

Um sistema confiável, com reprodutibilidade adequada para determinação de ferro(II) pelo método baseado na complexação do analito com 1-10 fenantrolina aplicando detecção espectrofotométrica, foi construído e sua aplicação promove redução significativa do consumo de reagentes e da geração de resíduos. Em consequência, o impacto sobre o meio ambiente é consideravelmente diminuído, considerando ambas as configurações de fluxo propostas.

O método proposto pode ser aplicado em outras matrizes, desde que sejam consideradas as condições estabelecidas, o que pode ser concretizado para outros derivados de soja em trabalhos subseqüentes.

Como trabalhos futuros, pretende-se estabelecer o perfil da composição mineral de outras amostras de produtos derivados da soja, bem como avaliar o teor de ácidos graxos e isoflavonóides em amostras de soja e derivados sejam estes cultivares transgênicos ou não, distribuídos comercialmente em Salvador e Região Metropolitana.

## 5.1 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- [1] MELLON, F.; SELF, R.; STARTIN, J.R., Mass Spectrometry of Natural Substances in Food, **Food Analysis Monographs - Royal Society of Chemistry**, 1ª Edição, 2000.
- [2] A Soja no Brasil. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/producaosoja/SojanoBrasil.htm>. Acesso em 06 de Outubro de 2006.
- [3] DEWICK, PM. **Medicinal Natural Products: a Biosynthetic Approach**. 2nd ed. John Wiley & Sons, Inc.: Chichester -England (2002), 507 p.
- [4] Soja, A importância da soja. Disponível em: <http://www.drashirleydecampos.com.br/noticias/20378>. Acesso em 06 de Outubro de 2006.
- [5] Centro de inteligência da soja. Disponível em: <http://www.cisoja.com.br/index.php?p=histórico>. Acesso em 07 de Outubro de 2006.
- [6] Safra brasileira de soja 2007 - Agrosoft Brasil. Disponível em: <http://www.agrosoft.org.br/pdf.php/?node=25993>. Acesso em 10 de Março de 2007.
- [7] A Soja no Brasil Central – Expansão Agrícola. Disponível em: [http://www.riosvivos.org.br/canal.php?canal=133&mat\\_id=1188](http://www.riosvivos.org.br/canal.php?canal=133&mat_id=1188). Acesso em 10 e Março de 2007.
- [8] Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Disponível em: [http://www1.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia\\_visualiza.php?id\\_noticia=1096&id\\_pagina=1](http://www1.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1096&id_pagina=1). Acesso em 11 de Março de 2007.
- [9] IBGE - Produção Agrícola Municipal - Cereais, Leguminosas e Oleaginosas - 2002 – 2006. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia\\_impressao.php?id\\_noticia=931](http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_impressao.php?id_noticia=931). Acesso em 11 de Março de 2007.
- [10] CASSINI, A. S.; MARCZAK, L. D. F; NORENA, C.P.Z. Water adsorption isotherms of texturized soy protein, **Journal of Food Engineering**, n. 77, p. 194-199, 2006.

---

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

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

[13] 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, **Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas**, v. 27, n. 3, p. 492-497, 2007.

[14] COELHO, N. M. M. **Digestão em microondas - 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.

[15] HOENIG, M.; KERSABIEC, A.; Sample preparation steps for analysis by atomic spectroscopy methods: present status, **Spectrochimica Acta Part B**, v. 51, p. 1297-1307, 1996.

[16] 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, 2006.

[17] MIYAZAWA, M. e PAVAN, M. A., Determinação Simultânea de Alumínio por Potenciometria e Ferro por Espectrometria em Sistema FIA, **Química Nova**, v. 15, n. 3, 1992.

[18] RAINELLI, A., STRATZ, R., SCHWEIZER, K. e HAUSER, P. C., Miniature Flow-Injection Analysis Manifold Created by Micromilling, **Talanta**, v. 61, p. 659-665, 2003.

[19] MORTATTI, J., KRUG, F. J., PESSENDA, I. C. R., ZAGATTO, E. A. G. e JORGENSEN, S. S., Determination of Iron in Natural Waters and Plant Material with 1,10-phenanthroline by Flow Injection Analysis, **Analyst**, v.107, p. 659-663, 1982.

- 
- [20] LIMA, J. L. F. C., DELEURE-MATOS, C.; VAZ, M. C. V. F. Automation of Iron and Copper Determination in Milks Using Fia Systems and Colourimetric Detection, **Food Chemistry**, v. 62, n. 1, p. 117-121, 1998.
- [21] MIRANDA, C. E. S., CARRILHO, E., GERVASIO, A. P.; GINÉ, M. F. Sistemas Interfaceados de Análise por Injeção em Fluxo e Eletroforese Capilar (fia - ce): Desafios, Aplicações e Perspectivas, **Química Nova**, v. 25, n. 3, 2002.
- [22] KRUANETR, S.; LIAWRUANGRATH, S.; YOUNGVISES, N. A simple and green analytical method for determination of iron based on micro flow analysis, **Talanta**, v. 73, p. 46–53, 2007.
- [23] 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.
- [24] L. H. FOSTER, L. H.; SUMAR, S. Selenium concentrations in soya based milks and infant formulae available in the United Kingdom, *Food Chemistry*, v. 56, n. 1, pp. 93-98, 1996.
- [25] 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, *J. Agric. Food Chem*, v. 52, p. 6193-6199, 2004.
- [26] GARCIA, C.; MARINA, L.; LABORDAB, F.; TERRE, M. Chemical characterization of Products commercial soybean, *Food Chemistry*, v. 62, n. 3, p. 325-331, 1998.
- [27] 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.
- [28] HSEU, Z. Evaluating heavy metal contents in nine composts using four digestion methods, **Bioresource Technology**, v. 95, p. 53–59, 2004.



- 
- [29] 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.
- [30] 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.
- [31] 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.
- [32] WANG, Y.; LU, C.; XIAO, Z.; WANG, G. Determination of Aluminum in Foods by Stabilized Temperature Platform Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry, **J. Agric. Food Chem.**, v. 39, p. 724-726, 1991.
- [33] FONSECA, A., RAIMUNDO Jr, I. M., ROHWEDDER J. J. R. e FERREIRA, L. O. S., Construction and Evaluation of a Flow-injection Micro-Analyser Based on Urethane-acrylate Resin, **Anal. Chim. Acta**, v. 603, p. 159-166, 2007.
- [34] AL-GAILANI, B. R. M., GREENWAY, G. M.; MACCREEDY, T., A Miniaturized Flow-Injection Analysis ( $\mu$ FIA) System with On-line Chemiluminescence Detection for the Determination of Iron in Estuarine Water, **Intern. J. Environ. Anal. Chem.**, v. 87, n. 9, p. 637-646, 2007.
- [35] RAINELLI, A., STRATZ, R., SCHWEIZER, K.; HAUSER, P. C., Miniature Flow-Injection Analysis Manifold Created by Micromilling, **Talanta**, v. 61, p. 659-665, 2003.
- [36] FERNANDES, J. C. B.; FERREIRA, L. O. S. J., Manufacturing of Miniature Fluidic Modules for Lab-on-a-Chip using UA Photoresin from Flexographic Platemaking Process, **Braz. Chem. Soc.**, v. 17, p. 643-647, 2006.
- [37] KUCHARKOWSKI, R.; JANKOVA, D.; HERRMANN, E.; JOHN, A., Contributions to accuracy improvement of simultaneous ICP atomic emission spectrometry using multi-line measurements of analyte and internal standard elements : Applications for the analysis of permalloy, **Fresenius' journal of analytical chemistry**, v. 361, n. 6-7, 1998.

---

[38] FERNANDES, K. G.; MORAES, M. de; NETO, J. A. G.; NÓBREGA, J. A.; OLIVEIRA, P. V., Padronização Interna em Espectrometria de Absorção Atômica, **Química Nova**, v. 26, p. 249-252, 2003.

[39] HARRIS, D.C. - "**Análise Química Quantitativa**"- 5a. ed., (Riehl, C.A.S. e Guarino, A.W.S, trads.), Rio de Janeiro, LTC-W.H.Freeman, 1999.

[40] 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**, n. 7, p. 845, 1992.

[41] 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, n. 2, p. 269-275, 2001.

[42] WÜRFELS, M., JACKWERTH, E., STOEPLER, M., Residues from biological materials after pressure decomposition with nitric acid: Part 1. Carbon conversion during sample decomposition, **Analytica Chimica Acta**, v. 226, p.1-16, 1989.

[43] CARRILHO, E. V., NOGUEIRA, A. A., NÓBREGA, J. A., SOUZA, G. B., CRUZ, G. M., An attempt to correlate fat and protein content of biological samples with residual carbon after microwave-assisted digestion, **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 371, n. 4, p. 536-540, 2001.

[44] COSTA, L. M., SILVA, F. V., GOUVEIA, S. T., NOGUEIRA A. R. A., NÓBREGA, J. A., Focused microwave-assisted acid digestion of oils: an evaluation of the residual carbon content, **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 56, n. 10, p. 1981-1985, 2001.

[45] TODOLI, J. L.; MERMET, J. M. Acid interferences in atomic spectrometry: analyte signal effects and subsequent reduction, **Spectrochimica Acta Part B**, v. 54, p. 895-929, 1999.

---

[46] PAREDES, E.; MAESTRE, S. E.; TODOLÍ, J. L. Use of stirred tanks for studying matrix effects caused by inorganic acids, easily ionized elements and organic solvents in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry, **Spectrochimica Acta Part B**, v. 61, p. 326–339, 2006.

[47] JESUS, M.; ANZANO, U.; GONZALEZ, P. Determination of iron and copper in peanuts by flame atomic absorption spectrometry using acid digestion, **Microchemical Journal**, v. 64, p.141-145, 2000.

[48] KORN, M. G. A.; MORTE, E. S. B.; SANTOS, D. C. M. B.; CASTRO, J. T.; BARBOSA, J. T. P.; TEIXEIRA, A. P.; FERNANDES, A. P.; WELZ, B.; SANTOS, W. P. C.; SANTOS, E. B. G. N.; KORN, M., Sample preparation for the determination of metals in food samples using spectroanalytical methods – A review, **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 43, p. 67–92, 2008.

[49] MOMEN, A. A.; ZACHARIADIS, G. A.; ANTHEMIDIS, A. N.; JOHN A. STRATIS, J. A. Investigation of four digestion procedures for multi-element determination of toxic and nutrient elements in legumes by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry, **Analytica Chimica Acta**, v. 565, p. 81–88, 2006.

[50] SAPKOTA, A.; KRACHLER, M.; SCHOLZ, C.; CHEBURKIN, A. K.; SHOTYK, W. Analytical procedures for the determination of selected major (Al, Ca, Fe, K, Mg, Na, and Ti) and trace (Li, Mn, Sr, and Zn) elements in peat and plant samples using inductively coupled plasma-optical emission spectrometry, **Analytica Chimica Acta**, v. 540, p. 247–256, 2005.

[51] MORGANO, M. A.; QUEIROZ, S. C. M.; FERREIRA, M. M. C. Determinação dos teores de minerais em sucos de frutas por espectrometria de emissão óptica em plasma indutivamente acoplado (ICP-OES), **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.19, n. 3, 1999.

[52] REZIĆ, I.; STEFFAN, I. ICP-OES determination of metals present in textile materials, **Microchemical Journal**, n. 85, p. 46–51, 2007.

[53] MORENO, I. M.; GONZÁLEZ-WELLER, D.; GUTIERREZ, V.; MARINO, M.; CAMEÁN, A. M.; GONZÁLEZ, G.; HARDISSON, A. Determination of Al, Ba, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Sr and Zn in red wine samples by inductively coupled plasma optical emission spectroscopy:

---

Evaluation of preliminary sample treatments, **Microchemical Journal**, n. 88, p. 56–61, 2008.

[54] KREJCOVA, A.; KAHOUN, D.; ERNOHORSKY, T.; POUZAR, M. Determination of macro and trace element in multivitamins preparations by inductively coupled plasma optical emission spectrometry with slurry sample introduction, **Food Chemistry**, v. 98, p. 171–178, 2006.

[55] 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, 2001.

[56] MONTASER, A.; GOLIGHTLY, D. W. **Inductively Coupled Plasma in Analytical Atomic Spectrometry**, Second Edition. New York :VCH Publishers, 1996.

[57] KRUG, F. J. **Métodos de Decomposição de Amostras**. São Carlos – SP, 2006.

[58] OLIVEIRA, E. Sample Preparation for Atomic Spectroscopy: Evolution and Future Trends, **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 14, n. 2, p. 174-182, 2003.

[59] AOAC Official Method 999.11, Determination of Lead, Cadmium, Copper, Iron and Zinc in Foods, Atomic Absorption Spectrometry after Dry Ashing, First Action, 1999.

[60] FERNANDES, J.C.B., FERREIRA, L.O.S., Manufacturing of Miniature Fluidic Modules for Lab-on-a-chip Using UA Photoresin from Flexographic Platemaking Process, **J. Braz. Chem. Soc**, v. 17, p. 643, 2006.

[61] ROCHA, F.R.P. e NÓBREGA, J.A., Efeito Schlieren em Sistemas de Análise por Injeção em Fluxo, **Química Nova**, v.19, n.6, 1996.

[62] DIAS, A.C.B.; BORGES, E.P.; ZAGATTO, E.A.G.; WORSFOLD, P.J. A critical examination of the components of the Schlieren effect in flow analysis, **Talanta**, v. 68, p. 1076–1082, 2006.

---

[63] TEIXEIRA, L.S.G.; ROCHA, F.R.P. A green analytical procedure for sensitive and selective determination of iron in water samples by flow-injection solid-phase spectrophotometry, **Talanta**, v. 71, p. 1507–1511, 2007.

[64] ANASTAS, P.T.; BREEN, J.J. Design for the environment and Green Chemistry: the heart and soul of industrial Ecology, **J. Cleaner Prod.**, v. 5, n. 1-2, p. 97-102, 1997.

[65] ZAGATTO, E. A. G.; REIS, B. F.; MARTINELLI, M.; KRUG, F. J.; BERGAMIN, F. H.; GINÉ, M. F. Confluent streams in flow injection analysis, **Anal. Chim. Acta**, n. 198, p. 153, 1987.

[66] Sais Minerais na Saúde. Disponível em <http://www.copacabanarunners.net/mineral.html>. Acesso em 02 de Junho de 2008.