



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA E FÍSICO-QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

VICTOR MARQUES CAMPOS

**ESTUDO DA POTENCIALIDADE DO USO DA RADIAÇÃO INFRAVERMELHA NA
EXTRAÇÃO DE ELEMENTOS INORGÂNICOS EM AMOSTRAS DERIVADAS DE
SOJA**

FORTALEZA

2016

VICTOR MARQUES CAMPOS

ESTUDO DA POTENCIALIDADE DO USO DA RADIAÇÃO INFRAVERMELHA NA
EXTRAÇÃO DE ELEMENTOS INORGÂNICOS EM AMOSTRAS DERIVADAS DE
SOJA

Tese ou Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Química. Área de concentração: Química Analítica

Orientadora: Profa. Dra. Gisele Simone Lopes.

Coorientadora: Profa. Dra. Wladiana Oliveira Matos.

FORTALEZA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C218e Campos, Victor Marques.

Estudo da potencialidade do uso da radiação infravermelha na extração de elementos inorgânicos em amostras derivadas de soja / Victor Marques Campos. – 2016.
89 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2016.

Orientação: Profa. Dra. Gisele Simone Lopes.

Coorientação: Profa. Dra. Wladiana Olivera Matos.

1. radiação infravermelha, preparo de amostra, soja. I. Título.


CDD 540


Esta Dissertação foi aprovada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Química, área de concentração Química Analítica, outorgada pela Universidade Federal do Ceará, em cuja Biblioteca de Ciências e Tecnologia/UFC encontra-se à disposição dos interessados.



Victor Marques Campos


DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 15/07/2016

EXAMINADORES:


Profª. Dra. Gisele Simone Lopes
Universidade Federal do Ceará – UFC


Profª. Dra. Wladiana Oliveira Matos
Universidade Federal do Ceará – UFC


Dra. Ana Rita Araújo de Nogueira
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA


Prof. Dr. Sandro Thomaz Gouveia
Universidade Federal do Ceará – UFC

Aos meus pais, Lucimar e Luiz Carlos.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Gisele Simone Lopes pela orientação, pela amizade, pela compreensão, pelos ensinamentos, pela ética na realização de pesquisas durante todo esse tempo que estive no LEQA, e por ser essa pessoa tão maravilhosa e tão acolhedora. Muito obrigado !!!

A Profa. Dra. Wladiana Oliveira Matos, pela amizade, pelas dicas, sugestões, ideias e discussões durante o desenvolvimento do trabalho e por ser tão amável e em sempre me atender. Muito obrigado!!!

À Profa Dra. Livia Paulia da UNILAB pela amizade, por toda a ajuda, que foi essencial para o desenvolvimento desse trabalho e por ser tão criativa. Sem você a realização desse trabalho teria sido muito complicado.

Ao Prof Dr. Sandro Gouveia, pelas dicas, brincadeiras, explicações didáticas, e por diversas vezes ter nos socorrido no ICP-OES.

Ao Luan e ao Pedro, pela amizade, por todo o apoio desde início, pela ajuda em todas as análises realizadas nesse trabalho, por todas as dicas e suporte muito muito obrigado!!

À Profa Dra. Soraia, pela amizade, e todos os momentos compartilhados dentro do LEQA durante esse último ano.

Á Tamires, pela amizade, desabafos e por toda a ajuda nessa reta final.

A todos os amigos, atuais e ex-integrantes do LEQA, pelo aprendizado, pelo trabalho em grupo, e principalmente pelo nosso convívio diário que tornou o ambiente de trabalho mais prazeroso.

Aos meus grandes amigos que fiz durante esse tempo em Fortaleza, pela fantástica amizade, carinho, micaretas, viagens, baladas, vocês são essências para mim.

Aos meus amigos que deixei em Goiânia, pela compressão, por me escutarem durante todo esse tempo, vocês sempre estarão comigo aonde eu esteja.

Ao Programa de Pós-Graduação do Departamento de Físico-química e Analítica da Universidade Federal do Ceará, pela oportunidade concedida.

À Universidade Federal do Ceará pela infraestrutura e recursos na realização deste e de tantos outros trabalhos.

À CAPES pela bolsa concedida.

Obrigado a todos que de alguma forma me ajudaram na realização deste trabalho.....!

RESUMO

Há um grande interesse em novas metodologias de preparo de amostras que permitam a utilização de maiores massas de amostras aliadas à sistema rápidos e de baixo custo. Neste trabalho desenvolveu-se um procedimento de preparo de amostras com aquecimento auxiliado por radiação infravermelha (IR) proveniente de uma lâmpada de halogênio para amostras derivadas de soja (extrato hidrossolúvel de soja, proteína texturizada de soja, proteína isolada de soja e farinha de soja). A análise multielementar por espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP-OES) e espectroscopia de absorção atômica com chama (FAAS) foi realizada. A utilização de um dedo frio para o refluxo de vapores ácidos foi avaliada como uma estratégia de auxílio para a solubilização e a digestão das amostras no sistema IR proposto. As soluções obtidas nos procedimentos de digestão assistida por IR foram avaliadas de acordo com a quantidade de carbono orgânico solubilizado e a massa do resíduo remanescente da filtração. Os resultados se mostraram adequados, sendo que, valores baixos de resíduo sólido indicam que a matriz orgânica foi solubilizada. E ainda, baixo carbono solubilizado indica que a matriz orgânica foi efetivamente destruída ou pouco solubilizada dependendo da quantidade de resíduo sólido restante. O procedimento utilizando um volume de 8 ml de HNO₃ 65% (m m⁻¹) e a exposição à radiação IR durante 5 minutos e sem refluxo dos vapores ácidos permitiu a determinação com exatidão de Ca, Cu, Fe, K e Zn no material de referência certificado NIST 1568b (Farinha de arroz). Nas amostras, em mg kg⁻¹, Ca variou de 475 a 2986; Cu de 6,83 a 12,1; Fe de 21,5 a 36,9; K de 4,61 a 27,3 e Zn de 26,5 a 44,9. O sistema (IR) proposto apresenta grande potencial, é de baixo custo e de fácil implementação em laboratórios de análise de inorgânicos.

Palavras-chave: radiação infravermelha, preparo de amostra, soja.

ABSTRACT

New methods for sample preparation that allow the use of larger masses combined with fast and low cost system are of great interest. A sample preparation procedure was developed in this work with infrared assisted radiation as heating source from a halogen lamp for soy derived samples (soybean hydrosoluble extract, textured soy protein, soy protein isolate and soy flour). The efficiency of the digestion and solubilization was compared when using a reflux system of acid vapors. Multielement analysis by optical emission spectrometry with inductively coupled plasma axial view (ICP-OES) and atomic absorption spectroscopy flame (FAAS) was performed. The use of a cold finger for reflux of acidic vapors was evaluated as a strategy for solubilization and digestion of samples. In the IR system the obtained digests were evaluated according to the amount of solubilized organic carbon and the mass of residue remaining in the filtration results. The results are suitable, low solid residue values indicate that the organic matrix is solubilized. Low carbon solubilized indicates that the organic matrix was effectively destroyed or poorly solubilized depending on the amount of solid residue. Best results (values of low residues and low solubilized carbon) were obtained using longer times of exposure to infrared radiation and larger amounts of nitric acid for all samples studied in the system under reflux, starting with 1.00 g sample. The procedure using a volume of 8 mL of HNO₃ 65% (w w⁻¹) and exposure to the infrared radiation during 5 minutes allowed the accurate determination of Ca, Cu, Fe, K, Ca and Zn in certified reference material NIST 1568b (Rice Flour). Ca ranged from 475 to 2986; Cu from 6,83 to 12,1; Fe from 21,5 to 36,9; K from 4,61 to 27,3 and Zn from 26,5 to 44,9 mg Kg⁻¹ in the samples. The IR system proposed shows great potencial, low cost and it is easy implemente in laboratories of trace element analysis.

Keywords: infrared radiation, sample preparation, soybeans.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Espectro da radiação eletromagnética.....	11
Figura 2 - Esquema da lâmpada com filamento de tungstênio e o ciclo do halogênio.....	11
Figura 3 - Intensidade das onda eletromagnéticas emitidas pelas radiação infravermelha com fonte de uma lâmpada de halogênio.....	11
Figura 4 - Sistema (IR): Caixa MDF acoplada com lâmpada de halogênio utilizado.....	26
Figura 5- Esquema detalhado do dedo frio utilizado acoplado ao frasco para promover o refluxo dos vapores ácidos. Elaborado pelo autor.	28
Figura 6- Fluxograma do procedimento experimental para extração multielementar no sistema (IR).....	30
Figura 7 - Gráficos comparativos entre carbono solubilizado, em mg, nas amostras de extrato hidrossolúvel, farinha, proteína texturizada e proteína isolada de soja após os experimentos do planejamento fatorial 2^3 (Tabela 2).	35
Figura 8 - Gráficos comparativos entre massa de residuo remanescente, em mg, nas amostras de extrato hidrossolúvel, farinha, proteína texturizada e proteína isolada de soja após os experimentos do planejamento fatorial 2^3 (Tabela 2).	35
Figura 9- Gráficos de superfície de resposta para a amostra EHS (extrato hidrossolúvel de soja):desejabilidade em função do uso do dedo frio e do volume de ácido nítrico.....	48
Figura 10- Gráficos de superfície de resposta para a amostra EHS (extrato hidrossolúvel de soja): desejabilidade em função do uso do dedo frio e da variação do tempo.	49
Figura 11- Gráficos de superfície de resposta para a amostra EHS (extrato hidrossolúvel de soja): desejabilidade em função do tempo e do volume de ácido no sistema sem dedo frio.....	49
Figura 12- Gráfico de superfície de resposta para a amostra FS (farinha de soja): desejabilidade em função do uso do dedo frio e do volume de ácido nítrico.	51
Figura 13- Gráfico de superfície de resposta para a amostra FS (farinha de soja): desejabilidade em função do uso do dedo frio e da variação do tempo.....	52
Figura 14 - Gráfico de superfície de resposta para a amostra FS (farinha de soja): desejabilidade em função do tempo e do volume de ácido no sistema sem dedo frio. .	52
Figura 15- Gráficos de superfície de resposta para a amostra PTS (proteína texturizada de soja:desejabilidade em função do uso do dedo frio e do volume de ácido nítrico.	54
Figura 16 -Gráficos de superfície de resposta para a amostra PTS (proteína texturizada de	

soja: desejabilidade em função do uso do dedo frio e da variação do tempo.	54
Figura 17-Gráficos de superfície de resposta para a amostra PTS (proteína texturizada de soja: desejabilidade em função do tempo e do volume de ácido no sistema sem dedo frio.....	55
Figura 18 - Gráfico de superfície de resposta para a amostra PIS (proteína isolada de soja): desejabilidade em função do uso do dedo frio e do volume de ácido nítrico.	56
Figura 19 - Gráfico de superfície de resposta para a amostra PIS (proteína isolada de soja): desejabilidade em função do uso do dedo frio e da variação do tempo.....	57
Figura 20 - Gráfico de superfície de resposta para a amostra PIS (proteína isolada de soja): desejabilidade em função do tempo e do volume de ácido no sistema sem dedo frio. .	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Minerais no grão de soja.	15
Tabela 2 Matriz de planejamento dos experimentos.....	29
Tabela 3- Parâmetros operacionais do ICP-OES.	31
Tabela 4- Teores de proteína, óleo e umidade nas amostras de extrato hidrossolúvel de soja (EHS), farinha de soja (FS), proteína texturizada de soja (PTS) e proteína isolada de soja (PIS). Valores médios (n=3) e desvio padrão.....	32
Tabela 5- Teores de carbono residual das soluções digeridas e filtradas após aquecimento com radiação infravermelha em meio ácido nas amostras de extrato hidrossolúvel de soja (EHS), farinha de soja (FS), proteína texturizada de soja (PTS) e proteína isolada de soja (PIS). Valores médios (n=3) e desvio padrão.....	34
Tabela 6- Valores de carbono orgânico solubilizado (C solubilizado), em mg, e da massa de resíduo remanescente (Resíduo), em mg, referente ao extrato hidrossolúvel de soja submetido a aquecimento por radiação infravermelha em meio ácido. Valores médios (n=3) e desvio padrão.	40
Tabela 7- Valores de carbono orgânico solubilizado (C solubilizado), em mg, e da massa de resíduo remanescente (Resíduo), em mg, referente a farinha de soja submetido a aquecimento por radiação infravermelha em meio ácido. Valores médios (n=3) e desvio padrão.....	41
Tabela 8 - Valores de carbono orgânico solubilizado (C solubilizado), em mg, e da massa de resíduo remanescente (Resíduo), em mg, referente a proteína texturizada de soja submetido a aquecimento por radiação infravermelha em meio ácido. Valores médios (n=3) e desvio padrão.	42
Tabela 9 - Valores de carbono orgânico solubilizado (C solubilizado), em mg, e da massa de resíduo remanescente (Resíduo), em mg, referente a proteína isolada de soja submetida a aquecimento por radiação infravermelha em meio ácido. Valores das médias (n=3) e desvio padrão.....	43
Tabela 10- Concentração dos elementos Cu, Fe, Zn, Mn, K, P, Mg e Ca nas amostras de extrato hidrossolúvel de soja (EHS), farinha de soja (FS), proteína texturizada de soja (PTS) e proteína isolada de soja (PIS) submetidas aos experimentos do planejamento fatorial 2 ³ (Tabela 2). (n=3) e desvio padrão.....	46
Tabela 11- Concentrações (mg kg ⁻¹) dos elementos Cu, Fe, Zn, Mn, K, P, Mg e Ca nas	

amostras de extrato hidrossolúvel de soja (EHS), farinha de soja (FS), proteína texturizada de soja (PTS) e proteína isolada de soja (PIS) nas condições experimentais otimizadas. Valores médios (n=3) e desvio padrão.	58
Tabela 12 - Concentrações (mg kg ⁻¹) dos analitos no material de referência certificado NIST 1568b (Rice Flour) após extração no sistema (IR) empregando 8 mL de ácido nítrico e 5 minutos de aquecimento. Valores médios (n=3) e desvio padrão.	60
Tabela 13 - Estimativa dos limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) nas amostras derivadas de soja.	62
Tabela 14- Valores de CV% para amostras de extrato hidrossolúvel soja (EHS), farinha de soja (FS), proteína texturizada de soja (PTS) e proteína isolada de soja (PIS) com detecção por ICP-OES e F-AAS.	63

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	4
2.1 Objetivo geral	4
2.2 Objetivos secundários	4
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1 Preparo de amostra para análise de inorgânicos	5
3.1.1 <i>Novos procedimentos de preparo de amostras que utilizam maiores massas de amostra</i>	7
3.1.2 <i>Sistemas sob refluxo para o extração no preparo de amostras</i>	8
3.1 Radiação infravermelha	10
3.1.1 <i>Radiação infravermelha na química analítica</i>	12
3.3 Soja	14
3.3.1 <i>Farinha de soja (FS)</i>	15
3.3.2 <i>Extrato hidrossolúvel de soja (EHS)</i>	16
3.3.3 <i>Proteína texturizada de soja (PTS)</i>	16
3.3.4 <i>Proteína isolada de soja (PIS)</i>	17
3.3.5 <i>Nutrientes em soja e seus derivados</i>	17
3.4 Otimização de experimentos: Planejamento fatorial completo	22
3.4.1 <i>Gráficos de superfícies de respostas e função desejabilidade</i>	23
4 EXPERIMENTAL	25
4.1 Reagentes	25
4.2 Amostras e material de referência certificado	25
4.3 Instrumentação	25
4.4 Procedimento experimental	27
4.4.1 <i>Determinação do teor de óleo, umidade e proteína nas amostras</i>	27
4.4.2 <i>Digestão parcial da amostra empregando radiação infravermelha</i>	28
4.4.3 <i>Equipamentos utilizados para a análise multielementar</i>	30
4.4.4 <i>Tratamento dos dados</i>	31
5 RESULTADOS	32
5.1 Análise dos teores de óleo, umidade e proteína	32
5.2 Avaliação dos teste iniciais	32
5.3 Teores de carbono residual nos digeridos (% RCC)	34
5.4 Estudo da digestão parcial e da solubilização das amostras	34
5.4.1 <i>Extrato hidrossolúvel de soja (EHS)</i>	39
5.4.2 <i>Farinha de soja (FS)</i>	40
5.4.3 <i>Proteína texturizada de soja (PTS)</i>	41

5.4.4 Proteína isolada de soja (PIS)	43
5.5 Otimização do procedimento proposto para análise multielementar em amostras derivadas de soja	44
5.5.1 Extrato hidrossolúvel de soja (EHS).....	47
5.5.2 Farinha de soja (FS).....	50
5.5.3 Proteína texturizada de soja (PTS)	53
5.4.4 Proteína isolada de soja (PIS)	55
5.5.5 Condições ótimas do método proposto	58
5.6 Validação do método.....	60
5.6.1 Exatidão	60
5.6.2 Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ).....	61
5.6.3 Faixa linear de trabalho.....	62
5.6.4 Precisão	62
6 CONCLUSÃO	64
REFERÊNCIAS.....	66

1 INTRODUÇÃO

Em uma análise química, a etapa mais trabalhosa, de maior custo e na qual se cometem mais erros é a etapa de preparo e solubilização de amostra. Buscando a análise de elementos traço, essa etapa é ainda mais importante para obtenção de resultados confiáveis.

Em contrapartida, técnicas analíticas rápidas, com a possibilidade da determinação de vários elementos, sensíveis, exatas e precisas têm sido desenvolvidas. Portanto, a busca por melhorias das técnicas de preparo de amostras com procedimentos rápidos, baratos, eficientes, e o mínimo de manipulação e que sejam compatíveis com essas técnicas modernas de análise, tem sido objeto de estudo entre os pesquisadores.

A decomposição de amostras assistida por radiação micro-ondas em sistemas fechados é, atualmente, o método de preparo mais indicado. Esse processo de digestão ocorre em vasos fechados a altas temperaturas e pressão o que permite um preparo rápido sem perdas por volatilização ou contaminações, e ainda com consumo de reagentes bastante reduzido. Entretanto, a quantidade de amostra que pode ser utilizada é limitada, especificamente para amostras orgânicas, pois a quantidade de matéria orgânica presente no sistema pode causar explosões devido ao aumento da pressão interna nos vasos fechados, pelos gases gerados nas reações. Uma desvantagem deste método é quando se trabalha com amostras heterogêneas, pois quantidades pequenas de amostra podem não ser representativas. E ainda, de acordo com a técnica analítica disponível para análise, a decomposição de massas pequenas de amostra dificulta a detecção de analitos presentes em baixas concentrações (KRUG, 2008).

A utilização da radiação infravermelha como fonte de aquecimento no preparo de amostra foi proposta inicialmente por Gouveia *et al.* (2000) e apesar de relativamente recente e dos poucos estudos vinculados, se mostrou eficiente na extração de elementos traços de amostras com matriz orgânica. A utilização da radiação infravermelha como fonte de aquecimento demanda menor tempo e o custo operacional é bastante reduzido. Dantas *et al.* (2013) associaram a radiação infravermelha (como etapa de digestão parcial de amostras complexas) com a radiação micro-ondas (sistema IR-MW), conseguindo aumentar para 1,00 g a massa

de amostra digerida, uma vez que parte da matéria orgânica da amostra é oxidada com o aquecimento da mistura reacional assistida por radiação infravermelha como uma etapa de pré-digestão, ou seja, antes da decomposição completa da amostra assistida por radiação micro-ondas, possibilitando a análise e detecção de analitos presentes em baixas concentrações por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES)

No ano de 2014, o Brasil se tornou o maior produtor de soja no mundo (GLOBO, 2014). O principal uso da soja, tanto no Brasil como no resto do mundo, é como matéria-prima para as indústrias que produzem óleo, farelo e seus derivados. Com a crescente preocupação por uma alimentação saudável, a soja está na lista de preferências de um número cada vez maior de consumidores, uma vez que, é rica em proteínas, possui isoflavonas e outras substâncias capazes de atuar na prevenção de doenças crônico-degenerativas. No entanto, as propriedades do grão e sua incorporação à alimentação ainda provocam dúvidas entre os consumidores. (EMBRAPA, 2015)

A soja é considerada uma fonte de proteína completa, isto é, contém quantidades significativas de todos os aminoácidos essenciais. É também um alimento funcional que, além das suas funções nutricionais básicas, promove benefícios à saúde, reduzindo riscos de ocorrência de doenças. Sendo assim, a análise química dessa matriz em relação a sua composição elementar torna-se cada vez mais relevante. A importância da quantificação dos elementos traços e dos macro e micronutrientes na soja está relacionada com a necessidade da implementação de nutrientes essenciais na dieta, além da prevenção de quaisquer distúrbios no organismo causados pela ingestão excessiva de determinados elementos. (EMBRAPA, 2015)

Nesse contexto, foi proposto nesse trabalho o estudo de um método de preparo que utiliza a radiação infravermelha, fornecida por uma lâmpada de halogênio, na solubilização de amostras derivadas do grão de soja para análise de macro e micronutrientes por técnicas espectrométricas. Trata-se de um método de baixo custo, simples, que opera em pressão atmosférica e assim permite que massas maiores de amostra sejam utilizadas quando comparadas a outros tipos de preparo. Por ser uma fonte de energia radiante, a radiação infravermelha age diretamente na mistura reacional diminuindo também a demanda de tempo.

A eficiência de solubilização e digestão parcial das amostras, relacionadas com sua composição original, também foram investigadas com o objetivo de avaliar parâmetros tais como redução de volume de reagentes, tempo de submissão à radiação infravermelha e a influência do refluxo dos vapores gerados nessa solubilização. Dependendo da técnica de determinação empregada, esses parâmetros podem apresentar influência nos resultados analíticos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar um procedimento de preparo de amostras derivadas de soja utilizando um sistema assistido por radiação infravermelha (IR) visando a determinação dos elementos Cu, Fe, Mn, Zn, K, P, Mg e Ca por técnicas espectrométricas.

2.2 Objetivos específicos

- a) Trabalhar com decomposição de maiores massas de amostras utilizando aquecimento assistido por radiação infravermelha para a extração e solubilização das amostras de Extrato hidrossolúvel de soja (EHS), Farinha de soja (FS), Proteína texturizada de soja (PTS) e Proteína isolada de soja (PIS);
- b) Avaliar o carbono orgânico solubilizado e a massa de resíduo remanescente após as amostras serem expostas à radiação infravermelha visando estudar a decomposição parcial das amostras no sistema;
- c) Estudar um sistema de resfriamento em refluxo do tipo dedo frio;
- d) Estudar as variáveis que afetam a solubilização da amostra e a extração dos analitos;
- e) Quantificar os elementos Cu, Fe, Mn, K, P, Mg e Ca por espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) e Zn por FAAS nas amostras.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Preparo de amostra para análise de inorgânicos

Uma análise química é a aplicação de um processo ou de uma série de etapas objetivando a identificação e/ou quantificação de um ou mais analitos presentes em uma amostra. Em geral, suas principais etapas são: definição do problema; escolha do método; amostragem; pré-tratamento da amostra e separação; preparo da amostra; medida; calibração; avaliação e a ação. Experimentos que envolvem a quantificação de elementos inorgânicos normalmente necessitam de uma etapa de preparo da amostra. Porém, essa etapa apresenta um limitado desenvolvimento e pode ser considerada a etapa mais lenta em uma metodologia analítica, não acompanhando a instrumentação em análises químicas. (KRUG, 2008)

Ao escolher um método de análise de inorgânicos, devem ser observados alguns aspectos, tais como: a natureza da amostra; a faixa de concentração do elemento a ser determinado; a técnica de determinação escolhida; e a precisão e exatidão desejadas.

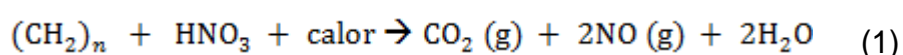
O preparo da amostra é a etapa considerada mais crítica em uma sequência analítica por ser a mais lenta e produzir a maior porcentagem de erros (KRUG, 2000). No entanto, esta etapa é frequentemente essencial quando as técnicas de espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS), espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS) e a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES), são empregadas na quantificação de macro e micro nutrientes em alimentos. Essas técnicas analíticas necessitam que as amostras sejam manipuladas e comumente transformadas em uma solução antes da determinação dos analitos de interesse.

A decomposição das amostras por via úmida consiste na decomposição de compostos orgânicos e inorgânicos em seus elementos constituintes empregando ácidos minerais e aquecimento. Os ácidos minerais atuam na decomposição da fração orgânica da matriz da amostra e apresentam poder de oxidação de moderado a forte, dependendo do ácido. Considerando-se essas informações, pode-se utilizar diferentes ácidos, isoladamente, ou, uma mistura deles, o que é uma prática bastante comum. A adição de H_2SO_4 melhora a eficiência do ácido nítrico em vaso aberto por possibilitar o uso de temperaturas mais altas, uma vez que o PE do

H₂SO₄ é maior que o do HNO₃. Já a adição de HCl melhora a eficiência da digestão quando a amostra contém compostos inorgânicos ou constitui uma substância inorgânica (minerais e ligas metálicas, por exemplo). Outra mistura bastante empregada é HNO₃ e H₂O₂ devido ao caráter oxidante do peróxido de hidrogênio (KRUG, 2008).

Quanto à reação de decomposição, esta pode ser realizada tanto em frascos abertos como em frascos fechados. Quando realizada em frascos abertos, além dos ácidos as digestões necessitam do emprego de banhos termostatizados (com ou sem agitação), chapas de aquecimento e blocos digestores. A principal vantagem da digestão em frasco aberto é a aplicação a todos os tipos de amostras. Entretanto, este procedimento exige supervisão constante do analista, consome grandes quantidades de reagentes (o que favorece a pré-concentração de impurezas), requer tempo elevado e favorece a perda de analitos voláteis. Além disso, o teor de carbono residual pode variar bastante, dependendo do tipo de ácido empregado e do tipo de amostra.

Geralmente se utiliza o ácido nítrico (HNO₃), que é um ácido forte e um agente oxidante poderoso, frequentemente empregado para a oxidação de compostos orgânicos, porém com um baixo ponto de ebulição (120 °C). A reação geral entre ácido nítrico e compostos orgânicos pode ser representada pela equação (1) química não balanceada (PERRY, 1984):



No preparo de amostras a digestão assistida por radiação micro-ondas em sistemas fechados é a alternativa mais bem estabelecida e aceita como uma alternativa rápida para preparo de amostras. As principais características deste procedimento são a aplicação a todos os tipos de amostras (exceção para ligas metálicas), apresenta elevada frequência analítica (com tempo menor que 3h), é adequada à análise de traços devido ao pequeno consumo de reagentes (reduzindo contaminações), além das perdas de analitos voláteis que é geralmente desprezível. Entretanto, em sistemas fechados operando a altas pressões há a necessidade de se limitar a massa de amostra, principalmente quando se tratam de amostras essencialmente orgânicas. (KRUG, 2008)

3.1.1 Novos procedimentos de preparo de amostras que utilizam maiores massas de amostra

A busca por novas metodologias de preparo visando o aumento da massa de amostra trabalhada mostra-se crescente. A decomposição em forno micro-ondas com radiação focalizada pode operar com até 10 g de amostra à pressão atmosférica. Porém, a manipulação de grandes massas de amostras pode gerar grandes quantidade de gás, principalmente quando se trabalha com materiais orgânicos. Nesse sistema é possível fazer um programa de adição de reagentes em qualquer momento durante a digestão, o que permite o ataque ácido sequencial. Pode ser usado em sistemas de extração para especiação e vários métodos para diferentes amostras podem ser aplicados simultaneamente devido à possibilidade do uso de um equipamento com direcionamento da radiação para cada recipiente de reação. (NOBREGA, 2002)

As principais dificuldades do micro-ondas com radiação focalizada são a distribuição de radiação entre todas as cavidades, quando eles são operados simultaneamente, e a elevada concentração ácida dos digeridos. Quando se trabalha com grandes massas de amostras normalmente é necessário o uso de grande volume de ácidos e conseqüentemente uma extensa diluição antes da medição. E ainda, para uma digestão completa é necessário usar H_2SO_4 por apresentar ponto de ebulição elevado e permitir digestões em altas temperaturas. O excesso de ácido pode ser removido, em parte, por evaporação.

Outra alternativa para diminuir a acidez final do digerido é adicionando gradualmente a amostra em um pequeno volume de ácido pré aquecido. Esta estratégia pode ser facilmente implementada usando equipamento de micro-ondas focalizado e permite a digestão de um maior volume de amostra, usando um volume menor de ácidos. Cada alíquota de amostra é parcialmente digerida antes da adição da seguinte. Os ácidos concentrados quentes podem gerar radicais reativos que podem acelerar o processo de digestão. Essa alternativa também gera brancos mais baixos e melhor sensibilidade devido a menor diluição final dos digeridos. (NOBREGA *et al.* 2002)

Outro método desenvolvido recentemente é a combustão iniciada por micro-ondas (MIC) que permite digestão de até 500 mg de amostra. O método

consiste na combustão da amostra em sistema fechado com atmosfera de oxigênio. A combustão iniciada por micro-ondas une as vantagens da digestão por via úmida com aquecimento por micro-ondas e da combustão em sistemas fechados. A etapa de ignição é feita pela radiação micro-ondas usando um reagente específico, em geral nitrato de amônio. A amostra deve estar em forma de pastilhas completamente seca e necessita de um papel de filtro umedecido com uma substância que promova a combustão. (FLORES *et al.* 2007)

Nesta mesma linha de procedimentos de preparo de amostras, a combustão induzida por radiação micro-ondas focalizada (FMIC) possibilita a digestão de até 1500 mg de amostra. Diferentemente da MIC ela é constituída de um fluxo de oxigênio durante todo o processo de digestão. Em ambos os casos, a decomposição da amostra pode ser completa e depende da complexidade da matriz. Entretanto, o equipamento comercialmente disponível apresenta alto custo, além de não ser de fácil manuseio. (FLORES *et al.* 2007)

3.1.2 Sistemas sob refluxo para o extração no preparo de amostras

Recentemente, o uso de sistemas de refluxo na preparação das amostras vem se apresentando como uma alternativa promissora aos métodos convencionais de digestão ácida. Os primeiros métodos de preparo de amostra envolvendo sistema de refluxo foram estabelecidos utilizando condensadores convencionais. Estes são altamente eficazes para a condensação da espécies voláteis, mas não são práticos, quando o número de amostras é grande.

O dedo frio é composto de um tubo de vidro em formato de dedo acoplado aos tubos comerciais de digestão durante o procedimento de mineralização ácida com aquecimento. Nesse tubo, a água é continuamente circulada com o objetivo de promover o resfriamento da parte superior do tubo digestor, o que causa, desta forma, o refluxo da solução. (PINHEIRO *et al.* 2014)

A condensação dos ácidos para dentro do tubo de digestão evita a necessidade de reposição destes reagentes durante o processo de mineralização das amostras, o que normalmente se faz necessário quando sistemas de digestão abertos são utilizados. Conseqüentemente, menos reagentes são consumidos e o risco de contaminação por estes pode ser consideravelmente diminuído, o que

justifica o uso destes sistemas de refluxo em procedimentos de preparação de amostras para determinação de elementos como Cu, Fe, Mn, Zn, dentre outros. (FERREIRA *et al.* 2014)

Porém, as soluções residuais dos processos de digestão usando o sistema de refluxo normalmente têm uma concentração elevada de ácido. Problema que pode ser resolvido através da diluição da solução final obtida no processo de digestão. Outra alternativa é preparar as soluções das curvas de calibração na mesma concentração do ácido utilizado no procedimento de preparo para evitar interferência de matriz na análise. (FERREIRA *et al.* 2014)

Nano *et al.* (2009) estabeleceram um procedimento de digestão de amostras de ostras utilizando um dedo frio acoplado ao recipiente digestor para a determinação de arsênio, cádmio, bário, cálcio, cobre, ferro, magnésio, manganês e zinco por ICP-OES. O procedimento proposto recomenda uma mistura com a composição de 21,4% de ácido clorídrico, 30,8% para o ácido nítrico e 47,8% de peróxido de hidrogênio para a digestão. Os estudos de validação evidenciaram uma boa eficiência do procedimento com recuperações entre 84% e 110% dos elementos.

Silva *et al.* (2011) utilizaram um sistema de refluxo com dedo frio para a digestão de amostras de arroz com objetivo de determinar cádmio empregando a técnica ET-AAS. A precisão foi confirmada por análise de um material de referência certificado de farinha de arroz. Ribeiro *et al.* (2012) propuseram o uso de um "dedo frio" no processo de decomposição de amostras biológicas para a determinação de mercúrio. Os experimentos foram realizados a temperaturas de: 80, 100 e 120 °C e comparados com um sistema aberto. Os autores concluíram que a utilização de baixa temperatura na digestão e um tempo relativamente curto, não é eficaz para completar a conversão de espécies orgânicas deste metal à sua forma inorgânica. Os autores observaram também que o aquecimento do tubo digestor (à temperatura de 120 °C) sem a utilização de dedo frio promove a secura da mistura reacional no tubo. Quando o sistema dedo frio é usado, este fato não ocorre. Eles também avaliaram a eficiência do processo de digestão com a determinação de carbono orgânico total e a acidez residual durante a mineralização de três amostras biológicas, empregando o sistema aberto e o sistema com dedo frio. Para o carbono orgânico total, os resultados foram 15,4% para o sistema aberto e 20,8%, utilizando o sistema de dedo frio. Os resultados para acidez residual demonstraram uma

redução de 18% para o sistema aberto em comparação com o sistema de dedo frio. Estes resultados confirmaram que o vapores ácidos não é totalmente perdido durante a digestão utilizando o dedo frio.

3.2 Radiação infravermelha

A radiação infravermelha são ondas de comprimento de 1 milímetro até 700 nanômetros, e, portanto, não visíveis para o olho humano. Trata-se de uma radiação não ionizante que possui energia da ordem de 0,0012 a 1,5580 eV, a qual não é suficiente para o rompimento de ligações químicas, mas provoca aumento dos movimentos vibracionais e rotacionais das moléculas. No espectro de luz, está localizado depois da luz vermelha, daí surgiu seu nome (Figura 1). Apesar de não poder ser vista, a radiação infravermelha pode ser notada no corpo em forma de calor: terminações nervosas, chamadas termo receptores, conseguem captar essa radiação. (KERNAD, 2015; SKOOG, 1998)

As fontes de radiação infravermelha são constituídas por um sólido inerte que é aquecido eletricamente a uma temperatura compreendida entre 1500 e 2200 K (SKOOG, 1998). As lâmpadas halógenas (Figura 2) oferecem uma grande quantidade de energia visível e infravermelha a partir de um filamento de tungstênio. O filamento de tungstênio é incluso em um bulbo de quartzo preenchido com um gás, junto com uma quantidade controlada de halogênio (iodo ou bromo). Na temperatura de operação algum tungstênio evapora e migra para as áreas mais frias da parede do bulbo, onde antes de poder se depositar, ele se combina com o halogênio para formar um haleto de tungstênio. Este haleto circula até chegar próximo do filamento, onde o haleto se dissocia e deposita o tungstênio de volta no filamento (Figura 2). Como a parede do bulbo permanece limpa o tamanho do bulbo pode ser reduzido consideravelmente pelo uso do quartzo, o qual pode suportar as altas temperaturas da parede do bulbo. Este ciclo continua ao longo da vida operacional da lâmpada. As lâmpadas halógenas apresentam emissão de radiação com cerca de 90% da energia na faixa do infravermelho.

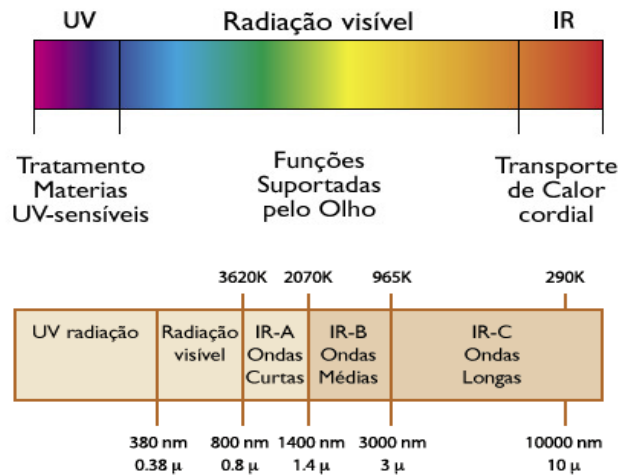


Figura 1- Espectro da radiação eletromagnética.

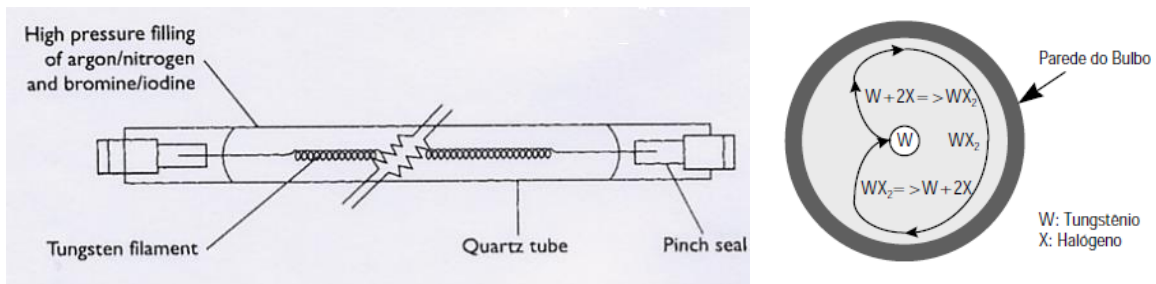


Figura 2 - Esquema da lâmpada com filamento de tungstênio e o ciclo do halogênio.

Em geral lâmpadas que emitem radiação infravermelha têm um amplo espectro (Figura 3), mas a maior parte da radiação que produzem é de ondas curtas. Para a maioria das aplicações de aquecimento industrial, esta é a região que apresenta a mais alta eficiência de aquecimento.

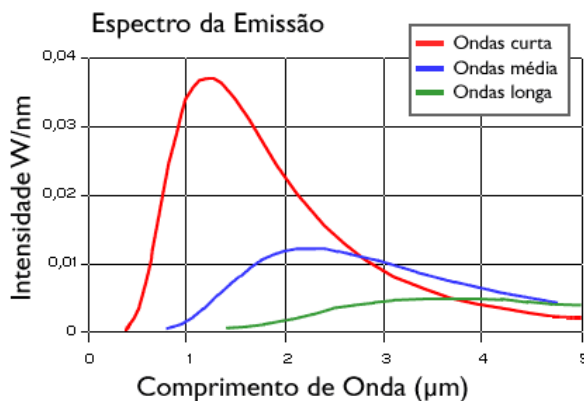


Figura 3 - Intensidade das onda eletromagnéticas emitidas pelas radiação infravermelha com fonte de uma lâmpada de halogênio.

3.2.1 Radiação infravermelha na química analítica

Na química analítica a radiação infravermelha é amplamente empregada no processo de secagem de amostras sólidas (SKOOG, 1998). As amostras são submetidas a aquecimento aplicando-se temperaturas relativamente amenas para evitar a degradação térmica da amostra e/ou riscos de perda de analito por volatilização.

A radiação infravermelha também é aplicada em processos de purificação de ácidos usados para análises de analitos em baixas concentrações. Kuehner *et al.* (1972) propuseram um processo de purificação de ácido por destilação abaixo do ponto de ebulição (*sub-boiling distillation*). No procedimento, o ácido é aquecido através da radiação infravermelha proveniente de uma resistência elétrica devidamente protegida por um invólucro de quartzo. A superfície do reagente líquido é vaporizada sem entrar em ebulição e o vapor é condensado em um dedo frio, em geral feito de quartzo de alta pureza, e o reagente puro é coletado.

A radiação infravermelha também é utilizada para dessolvatação de aerossol em análises por ICP OES e ICP MS. Os sistemas de dessolvatação reduzem a quantidade de solvente que alcança o plasma, diminuindo interferências. Em uma primeira etapa é realizado o aquecimento do aerossol em que o solvente é parcial ou totalmente evaporado das gotículas de aerossol e na segunda etapa o vapor de solvente é removido do fluxo do aerossol. (GRAAS *et al.* 1999; SCHRÖN & MÜLLER, 1997)

O aquecimento por radiação infravermelha também pode ser empregado em sistemas de decomposição por combustão. Na combustão em frasco de Schöniger utilizando a radiação infravermelha como fonte de ignição, a amostra é confinada em um envoltório de papel, o qual fica suspenso em um frasco fechado contendo um pequeno volume de uma solução absorvedora, adequada para reter os analitos. O gás contido no interior do frasco deve ser oxigênio e a ignição da amostra é realizada por meio de uma lâmpada de infravermelho com auxílio de uma lente. A amostra e o papel queimam na presença de atmosfera de oxigênio e, após resfriamento, o frasco é agitado fortemente. A análise é realizada na solução resultante. (SCHÖNIGER, 1955)

O sistema *Trace-o-Mat* desenvolvido por Knapp *et al.* (1977) utiliza a radiação infravermelha proveniente de duas lâmpadas para iniciar a ignição da

amostra. Nesse método, a amostra é peletizada com uma prensa manual em uma câmara de combustão e posicionada em um suporte de quartzo junto a uma pequena tira de papel. A câmara de combustão é conectada a uma unidade de resfriamento preenchida com nitrogênio líquido. Oxigênio é introduzido na câmara de combustão e duas lâmpadas de infravermelho promovem a ignição da amostra. Os produtos voláteis são retidos no condensador contendo nitrogênio líquido. Os elementos não voláteis são solubilizados em ácido.

No preparo de amostras poucos trabalhos foram publicados com o uso de radiação infravermelha como fonte de aquecimento. Gouveia *et al.* (2001) desenvolveram uma metodologia que utilizava a radiação infravermelha fornecida por três lâmpadas para a decomposição parcial de amostras de fígado bovino “in natura”. Os teores determinados dos elementos cobre e manganês foram comparados aos obtidos empregando decomposição assistida por forno de micro-ondas com cavidade. A exatidão do método foi verificada pela análise de material certificado de fígado bovino e folhas de macieira, sendo obtidas recuperações satisfatórias para Cu, Mn, Zn e Sr.

Em um estudo mais recente, DANTAS *et al.* (2013) utilizaram um sistema combinado que associa a radiação infravermelha com radiação micro-ondas (IR-MW) para completa decomposição de amostras orgânicas, apresentando como possibilidade a digestão de até 1,0 g de amostra de matriz alimentar complexa. Fato possibilitado por uma digestão prévia dessa amostra assistida por radiação infravermelha e em seguida, a solução pré-digerida é levada para um forno de micro-ondas no qual a decomposição da amostra se completa. O uso do mesmo frasco de quartzo em ambas etapas (pré-digestão e digestão no micro-ondas) possibilita um menor manuseio da amostra. Esse método tornou possível a utilização de maiores massas de amostras e, conseqüentemente, a determinação dos elementos Al, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P e Zn por ICP-OES com precisão e exatidão.

3.3 Soja

A soja é uma planta herbácea que se originou de espécies de plantas rasteiras que se desenvolviam no norte da China. A sua importância na dieta alimentar daquela época era ímpar, a tal ponto de serem realizados rituais nas vésperas da sementeira e colheita, pois a soja era considerada um grão sagrado. A introdução da soja em países ocidentais (França e Inglaterra) ocorreu entre os séculos XVII e XIX. No continente americano, a soja adquiriu importância a partir de 1880, essencialmente nos EUA, ainda como uma cultura forrageira e em 1940, foram plantados cerca de dois milhões de hectares desta planta. Desde 1941, a produção de grãos superou o cultivo forrageiro e iniciou um crescimento exponencial no cultivo mundial da soja, não somente nos EUA, mas também no resto do mundo (MORAIS, 1996; EMBRAPA, 2006).

A partir da década de 60, o cultivo de soja consolidava-se como uma das principais culturas do agronegócio brasileiro. Entre os anos de 1954 e 1958 o Brasil participava com apenas 0,5% da produção mundial de soja. Mas em 1976 respondia por 16% da produção mundial (MORAIS, 1996). No ano de 2014, o Brasil se tornou o maior produtor de soja no mundo (GLOBO, 2014). O principal uso da soja, tanto no Brasil como no resto do mundo, é como matéria-prima para as indústrias que produzem óleo, farelo e seus derivados.

A soja pertence à família das leguminosas e se destaca por ser rica em proteínas, lipídeos, fibras, isoflavonas, sais minerais e vitaminas do complexo B, além de ser uma fonte de proteína saudável. O consumo de soja contribui com a diminuição do colesterol e possui fito-químicos que auxiliam na redução do risco de câncer e no índice de doenças cardiovasculares. Em média, a soja possui 40% de proteínas, 20% de lipídios (óleo), 5% de minerais e 34% de carboidratos e não possui amido. (TRUCOM, 2005)

Os carboidratos da soja correspondem a polissacarídeos insolúveis e oligossacarídeos solúveis. As cinzas são ricas nos minerais ferro e zinco. Os lipídios da soja incluem de 1,0 a 3,0% de substâncias não saponificáveis e cerca de 15% de ácidos graxos saturados e 85% de insaturados. A casca é formada por quatro ou cinco camadas sobrepostas contendo células de diferentes tipos. Os cotilédones contêm a maior parte das proteínas do grão que constituem cerca de 90% do teor de

proteína da soja. As globulinas têm solubilidade mínima em torno de pH 4,5 e servem como substrato nutritivo para o crescimento do embrião. As proteínas restantes, a exemplo das proteínas estruturais e funcionais, estão localizadas no restante da semente. A casca da soja contém também 87% das fibras (MORAIS, 1996).

O grão da soja contém muitos minerais como o potássio, magnésio, fósforo, ferro, cobre, cálcio e sódio. O teor de cálcio presente nos grãos se apresenta pouco disponível para a nutrição humana, dessa forma alguns dos produtos industrializados são enriquecidos com este mineral (MORAIS, 1996).

Tabela 1- Minerais no grão de soja.

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

Fonte: (MORAIS, 1996).

A partir da soja pode-se obter 4 grupos distintos de produtos: produtos não desengordurados, produtos do óleo bruto, produtos do farelo desengordurado cru e produtos de tradição oriental. Da soja produz-se tofu (“queijo” de soja), iogurte à base de soja, “carne” de soja (proteína texturizada de soja - PTS), missô (pasta de soja), shoyu (molho de soja), concentrados e isolados proteicos, óleo refinado, farelo, farinha e leite de soja (extrato hidrossolúvel de soja - EHS). (TRUCOM, 2005)

3.3.1 Farinha de soja

Para fabricação da farinha de soja, os grãos são selecionados e limpos a seco para remover pedaços de pedra, poeira e etc. Em seguida, são lavados para retirar impurezas e recebem um tratamento térmico. Esta é a fase mais importante na produção desse tipo de farinha, pois o tratamento térmico necessário para inativar o sistema de enzimas lipoxigenase e os fatores antinutricionais, quando

inadequado, diminui o valor nutricional e/ou as qualidades funcionais do produto final. (EDMUMD, 1995)

Após a secagem dos grãos cozidos, estes são quebrados para soltarem as cascas que são retiradas por um sistema de peneiras e aspiradores, produzindo endosperma puro. Este produto é moído e classificado. A fração grossa retorna para o moinho, sendo a farinha (fração fina que deve passar numa peneira de 100 mesh) levada ao empacotamento. Vários tipos de farinha de soja integral são produzidos no mundo. As mesmas podem ser divididas em duas principais categorias: para usos gerais e para branqueamento em pães. (DEMICHELI, 2005)

A farinha de soja integral apresenta um excelente valor nutritivo, sendo importante na indústria de alimentos (por causa da sua proteína), uma grande fonte de vitaminas e minerais e uma excelente fonte de óleo rico em ácidos graxos poli saturado. (EDMUMD, 1995)

3.3.2 Extrato hidrossolúvel de soja

O extrato hidrossolúvel da soja - o "leite" de soja - é tradicionalmente obtido por maceração dos grãos, trituração com água, tratamento térmico e filtração para remover os sedimentos. Este produto que é bastante apreciado e muito consumido pelos orientais, tem apresentado aceitação limitada pelos povos do ocidente. Isto se deve ao sabor e odor indesejáveis provocados principalmente pela enzima lipoxigenase. Para cada quilo de soja o rendimento médio é de 9,3 kg de extrato hidrossolúvel com uma composição média de 3,5% de proteínas, 2,2% de gorduras e 6,5% de sólidos totais, e 1,7 kg de resíduos insolúveis com 15% de sólidos. A composição desse extrato em aminoácidos e ácidos graxos e seu valor nutricional é semelhante à da soja utilizada como matéria-prima. (EMBRAPA, 2015)

3.3.3 Proteína texturizada de soja

A proteína texturizada de soja (PTS), conhecida também com Proteína texturizada vegetal, é processada em uma máquina de extrusão. As PTSs são feitas para se assemelhar a carne bovina, carne de porco, frutos do mar, aves, tanto na estrutura quanto na aparência, quando hidratados. A PTS é feita a partir do farelo desengordurado cru obtido pela limpeza da soja, quebra, descascamento, tratamento térmico, laminação, extração do óleo com solvente e posterior

evaporação do solvente do farelo, contendo cerca de 50-54% de proteína. (JOSEPH, 2001)

A extrusão é um processo de aquecimento a elevadas temperaturas durante um curto período de tempo em que a farinha de soja passa a ser soja texturizada. Durante este processo, as estruturas quaternárias das proteínas são abertas devido a umidade e temperaturas elevadas e em seguida as proteínas polimerizam e se reorientam. Ao mesmo tempo, enzimas como a urease (o que reduz o tempo de vida útil do produto) e lipoxigenase (que produz os sabores desagradáveis devido à oxidação do óleo de soja) e o inibidor de tripsina (que reduz a digestibilidade da proteína) são destruídas. Este processo melhora o valor biológico e modifica as propriedades funcionais do produto. No entanto, há necessidade de cozimento de extrusão apropriado. (FELLOWNS, 1994).

3.3.4 Proteína isolada de soja

A proteína isolada de soja contendo, no mínimo, 90% de proteína é preparada a partir da farinha de soja desengordurada de granulometria especial. A proteína é extraída com solução alcalina e separada do resíduo insolúvel sendo precipitada com solução ácida (pH aproximadamente 4,5) e o precipitado proteico é então separado, lavado e seco. Para obtenção da proteína isolada de soja faz-se uma neutralização do precipitado proteico, para então, se proceder a secagem. As proteínas isoladas de soja são os produtos mais refinados derivados da soja. (JOSEPH, 2001)

3.3.5 Nutrientes em soja e seus derivados

Os elementos podem ser subdivididos em três grupos principais, de acordo com sua abundância no organismo: macromelementos (Ca, K, Mg e Na), microelementos (Cu, Fe, Zn e Mn) e elementos traço (Co, Cr, Mo, Ni). Considerando-se esses elementos e suas funções no corpo humano, pode-se destacar o cálcio, presente nas estruturas ósseas e no esmalte dos dentes, o potássio que contribui para o balanço osmótico em membranas celulares e o ferro, que está presente na estrutura da hemoglobina. O zinco está envolvido na produção e estocagem do hormônio insulina em células beta do pâncreas. O manganês e o cobre estão envolvidos em processos metabólicos que regulam a produção de

energia e o bom funcionamento do corpo humano. (DEMICHELI, 2005; REILLY, 2002)

A ausência ou excesso desses elementos ou qualquer outro elemento químico pode promover danos ao organismo humano, de modo que, um desequilíbrio na concentração de algum destes elementos pode até mesmo causar a morte. Assim, uma alimentação adequada pode ser uma alternativa eficaz para a manutenção do equilíbrio e bom funcionamento do organismo humano, sem escassez ou acúmulo de elementos essenciais (SOUSA, 2005). Pensando nisso, a avaliação dos níveis de macro e micronutrientes inorgânicos em diferentes amostras biológicas e de alimentos é muito importante.

Os alimentos derivados da soja apresentam quantidade adequadas de nutrientes. A soja é considerada um alimento completo, pois além de conter proteínas, vitaminas do complexo B, isoflavonas e vitamina E, ainda apresenta minerais como cobre, ferro, fósforo, potássio, magnésio e manganês (TRUCOM, 2005). Na avaliação nutricional dos produtos derivados da soja as investigações acerca da composição inorgânica tem relevância, visto que a maior parte das informações já existentes na literatura referem-se aos seus constituintes orgânicos (COZOLLINO, 2005). No que se refere à quantificação de inorgânicos em amostras de alimentos, as técnicas analíticas que relacionam espectroscopia atômica são, sem dúvida, as mais apropriadas.

A importância da quantificação de macro, micronutrientes e elementos traços em alimentos, está associada à evidente necessidade de implementação de nutrientes na dieta, além do controle da composição nutricional dos alimentos e prevenção de quaisquer distúrbios no organismo causados pela ingestão excessiva de determinados componentes. A soja além de funções nutricionais básicas, promove benefícios à saúde, reduzindo riscos de ocorrência de doenças crônicas não transmissíveis. E para a determinação das espécies químicas de interesse se faz necessária comumente a oxidação da matéria orgânica presente nas amostras, numa etapa de tratamento prévio da amostra, utilizando essencialmente procedimentos por via úmida, fazendo uso de blocos digestores e fornos de micro-ondas. Esta etapa é essencial para a aplicação das técnicas de espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS), espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF-AAS) e a espectrometria de emissão óptica com plasma

indutivamente acoplado (ICP-OES), as quais são as mais empregadas na quantificação de macro e micro nutrientes em alimentos (COELHO, 2001).

O leite de soja, farinha de soja, proteína texturizada, grãos de soja inteiros e produtos à base de soja foram avaliados por GARCIA *et al.* (1998) e a quantidade de cálcio, cobre, ferro e zinco, foram determinados. Para a determinação dos elementos citados uma massa de aproximadamente 1,0 g de amostra foi submetida à decomposição em bloco digestor utilizando ácido nítrico e peróxido de hidrogênio, para posterior determinação em bloco digestor dos analitos por FAAS e FAES. Com relação à determinação de fósforo, a maior concentração deste elemento foi encontrada na amostra de leite de soja em pó, provavelmente em decorrência da adição de fosfato de cálcio na formulação do produto. Os valores encontrados sugerem que a ingestão dos subprodutos de soja avaliados satisfaz as necessidades diárias para os elementos: Ca, Cu, Fe, K e Zn, com destaque para as concentrações de cálcio nas amostras.

PLESSI *et al.* (1997) analisaram Al e Zn (por GF-AAS e FAAS, respectivamente) em sete formulações infantis e dezoito diferentes tipos de alimentos infantis para dietas de crianças na Itália. A digestão das amostras ocorreu em forno de micro-ondas com cavidade, utilizando cerca de 0,3 g de amostra e 3,0 mL de HNO₃ a 65% m m⁻¹. O volume foi completado para 25 mL com água ultrapura. A exatidão do método foi estimada através da análise de material certificado de referência NIST SRM 1549 *nonfat milk powder* e NIST SEM 1548 *total diet*, havendo concordância entre os valores encontrados e valores certificados. As formulações infantis à base de soja apresentaram maiores valores de concentração para Al (7,0 a 7,8 µg g⁻¹) em comparação às formulações à base de leite (3,0 - 3,5 µg g⁻¹), provavelmente em decorrência do teor de alumínio naturalmente presente em grãos de soja. Os valores encontrados para Zn sofreram maior variação para as amostras à base de soja (13 - 73 µg g⁻¹). A maior concentração de Al foi encontrada na amostra de farinha de soja (26 µg g⁻¹), enquanto que a maior concentração de Zn foi encontrada na amostra de carne congelada (180 µg.g⁻¹). Nos alimentos infantis as concentrações de Al e Zn variaram bastante de uma amostra para outra.

A análise de cinco amostras de alimentos para bebês em fase de lactação, dentre estes, alimentos à base soja, para a determinação de ácidos graxos, aminoácidos e os elementos Ca, Cu, Fe, K, Mg, P e Zn foi realizada por

FERNANDEZ *et al.* (2002). O procedimento de decomposição das amostras para a determinação dos referidos elementos envolveu o aquecimento prévio a 110 °C *overnight* em seguida foi efetuada a pesagem de cerca de 0,1 g das amostras em béqueres e adição de 20 mL de HNO₃ e 1 mL de ácido HClO₄ e aquecidas em placa a 120 °C, durante uma hora. Em seguida a temperatura foi aumentada para 150 °C, e as amostras foram submetidas a refluxo *overnight*. As amostras foram então aquecidas até próxima à *secura* sob a mesma temperatura e posteriormente tratadas com 2,5 mL de uma mistura HNO₃/HClO₄ (4:1). Após o resfriamento as soluções foram diluídas a completando a 50 mL com água deionizada. O ICP OES foi utilizado para determinar a concentração dos analitos. Concluíram que todas as amostras analisadas contêm concentrações inadequadas de cálcio e zinco de acordo com as quantidades diárias recomendadas.

Os elementos Ca, Co, Cu, Cr, Fe, Mg, Mn, Na, Zn, Ag, Al, As, Ba, Be, Cd, Hg, Ni, Pb, Sb, Sn, Sr, Ti, Tl, U e V foram determinados por ICP-OES após decomposição de 26 amostras de formulas infantis a base de leite e de soja em forno de micro-ondas com cavidade fazendo uso de 0,5 a 1,0 g das amostras de formulações infantis em pó, e 5 mL das amostras líquidas utilizando 7,0 mL de ácido nítrico e 3 mL de água deionizada e temperatura máxima de 170 °C. A exatidão do método foi avaliada através da análise de material certificado de referência NIST SRM 8435, havendo concordância entre os valores encontrados e valores certificados. A concentração média da maioria dos elementos determinada nas formulações infantis à base de soja nos Estados Unidos se mostrou geralmente superior em relação às concentrações obtidas para as formulações infantis a base de leite dos Estados Unidos, Reino Unido e Nigéria. (IKEMA *et al.* 2002)

Foram avaliados por HSEU (2004) quatro procedimentos de decomposição para determinação de Cd, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb e Zn em diversos tipos de amostras previamente secas, incluindo grãos de soja, com determinação por GF-AAS ou FAAS. Três desses experimentos foram realizados em bloco digestor utilizando HNO₃; HNO₃/HClO₄ e H₂SO₄/H₂O₂. O volume de HNO₃ utilizado nos procedimentos correspondeu a 10 mL, de HClO₄ a 5,0 mL e H₂SO₄ a 3,5 mL. O ácido sulfúrico foi empregado em mistura com peróxido de hidrogênio, utilizando um volume de 4,5 mL para este último. As temperaturas atingidas no bloco digestor variaram entre 150 e 250°C. O procedimento que emprega somente o ácido nítrico

para a decomposição das amostras foi o recomendado em termos da recuperação obtida, essencialmente para Cd, Mn e Ni, custo e tempo de execução.

Bebidas à base de soja e formulações infantis a base de arroz foram incineradas para posterior análise de Mn por FAAS (COCKELL *et al.* 2004). As amostras foram pesadas (10 mL para amostras líquidas e 1,0 g para amostras em pó) e então submetidas à incineração à 450 °C utilizando HNO₃ como agente oxidante adicionado na preparação. Materiais certificados da NIST foram utilizados para avaliar a exatidão do método, havendo concordância entre os resultados certificados e aqueles obtidos. A concentração de Mn em bebidas à base de soja encontrada correspondeu a $16,5 \pm 8,6 \mu\text{g g}^{-1}$ para 36 amostras, valor este muito superior ao valor encontrado para a concentração de Mn em formulações infantis à base de arroz que correspondeu a $9,9 \pm 1,7 \mu\text{g g}^{-1}$. As bebidas à base de soja investigadas não devem ser administradas para crianças, uma vez que são nutricionalmente inadequadas.

A concentração de 20 elementos traço em iogurtes de soja e produtos lácteos consumidos na Espanha foram determinados por E.J. Llorent-Martínez *et al.* (2012) usando espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) após a digestão em micro-ondas com objetivos de avaliar o teor dos elementos traços e identificar a possível toxicidade desses alimento em relação aos valores recomendados de ingestão diária. O método analítico desenvolvido foi validado usando, tanto um material de referência certificado, e como experimentos de adição e recuperação nas amostras de iogurte, obtendo resultados satisfatórios em todos os casos. Concentrações muito mais altas de Cu e Mn foram encontrados em produtos de soja (até 30 vezes mais elevada) e foram observadas pequenas diferenças na concentração de Fe e Zn. O Ni foi encontrado em altas concentrações em iogurtes de soja (até 450 ng g⁻¹ em algumas amostras). Finalmente, os níveis de elementos tóxicos foram muito baixos, sendo inferiores ao limite de detecção em alguns casos.

Extrato de soja, proteína de soja texturizada, soja transgênicas, e farinha de soja inteira foram mineralizadas em micro-ondas para análise de Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Se, V e Zn por ICP OES e As, Ba, Cd, Pb e Sr por ICP-MS por BARBOSA *et al.* (2015). Foram avaliados parâmetros como: volume de HNO₃ (2,1 - 14,5 mol L⁻¹) e

a utilização de peróxido de hidrogênio na eficiência da decomposição - avaliada com base no teor de carbono residual (% RCC). Foi determinado que 2,1 mol L⁻¹ HNO₃ e 1,0 mL de H₂O₂ era a mistura adequada para uma digestão eficiente, uma vez que o RCC foi menor do que 18%. Alimentos à base de soja investigados neste estudo apresentaram composição variável em termos dos elementos essenciais e elementos potencialmente tóxicos, que podem ser atribuídas aos diferentes métodos de processamento.

3.4 Otimização de experimentos: Planejamento fatorial completo

Existem duas formas de otimização de métodos analíticos: a univariada, na qual cada fator é variado por vez, fixando-se em um determinado valor e variando os outros fatores envolvidos no processo. Este método é relativamente simples e de fácil interpretação, porém requer uma demanda maior de tempo de estudo, maior gasto de reagentes, além de não considerar as interações que ocorrem entre os fatores. Assim, como a maioria dos sistemas apresenta interação entre as variáveis, não se pode dizer que o método univariado é um método de otimização.

Na otimização multivariada todos os fatores são variados simultaneamente, e as condições ótimas de trabalho são encontradas através de modelos matemáticos e testes estatísticos para validar esses modelos. Essa otimização multivariada permite reconhecer se existem interações entre os fatores escolhidos e o número de experimentos pode ser reduzido. A desvantagem dessa otimização está na maior dificuldade de interpretação dos dados gerados, entretanto, muitos softwares possuem recursos que facilitam a interpretação desses dados. E ainda, é possível gerar gráficos de superfície de resposta que mostram as resposta para qualquer experimento dentro do domínio experimental estudado.

Uma das ferramentas multivariadas mais utilizadas é o planejamento fatorial completo, no qual estão envolvidas as variáveis em diferentes níveis. Se o número de variáveis a ser estudado se tornar grande, isto também aumentará o número de experimentos. Para evitar o custo financeiro e também o tempo na realização do grande número de experimentos necessários no planejamento fatorial completo, utiliza-se outros planejamentos experimentais, tais como o fatorial fracionado (frações de experimentos completos). Fazendo a escolha adequada, é

então possível determinar, não somente o efeito de cada fator, mas também o modo com que cada um deles interage com os demais. (LUNDSTEDT, 1998)

Na utilização de planejamento fatorial completo, o experimentador deve selecionar entre 2 e 4 variáveis para serem testadas em dois níveis. Em um planejamento fatorial no qual são testadas 3 variáveis, são realizados $2^3 = 8$ experimentos. Com 4 e 5 variáveis e dois níveis, são realizados 16 e 32 experimentos respectivamente. Quando o número de variáveis é muito alto, o analista pode utilizar planejamentos fatoriais fracionários e executar um número reduzido de experimentos. Após a realização dos experimentos o passo subsequente é identificar quais são as variáveis realmente importantes e que requerem maior atenção do analista.

3.4.1 Gráficos de superfícies de respostas e função desejabilidade

Em diversas situações é necessário efetuar um ajuste fino das variáveis mais importantes no sentido de propor modelos empíricos que correlacionem as variáveis estudadas com as respostas que estão sendo monitoradas. Na década de 1980, Derringer e Suich propuseram um procedimento matemático que relaciona a normalização dos resultados, através de respostas de todas as variáveis dependentes com suas respostas desejáveis identificando uma condição de compromisso entre as diversas respostas que estão sendo avaliadas

A função desejabilidade encontra a melhor condição para todas as variáveis convertendo-as para uma faixa entre 0 (representa um valor indesejável) e 1 (representando um valor de resposta ideal) chamados de desejabilidade individual (d_i). A química analítica considera que os melhores modelos de resposta são aqueles no qual os níveis de desejabilidade sejam igual ou superior a 0,6. Em casos nos quais é importante identificar condições experimentais com respostas elevadas, a d_i deve ser calculada como mostra a Equação (2):

$$d_i = 0 \text{ se } y < L, \left(\frac{y-L}{T-L} \right) \text{ se } L \leq y \leq T \text{ e } 1 \text{ se } y > T \quad (2)$$

Em que y é a resposta que está sendo monitorada, L e T são a menores repostas aceitável e a repostas-alvo, respectivamente. Além disso, é possível atribuir um peso para a resposta (s). Ao atribuir peso para os valores de desejabilidade, o

experimentador irá priorizar aquelas condições que apresentaram resultados mais satisfatórios. Após calcular todas as desejabilidades individuais (d_i), deve-se agrupar todas elas por meio de uma média, e assim, calcular a desejabilidade global (D) como mostra a equação 3:

$$D = \sqrt[m]{d_1 \times d_2 \dots d_m} \quad (3)$$

4 EXPERIMENTAL

4.1 Reagentes

Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura (resistividade 18,2 M Ω cm) de um sistema de purificação Milli-Q (Millipore, USA). As vidrarias e frascos foram previamente descontaminados, em banho ácido HNO₃ 10% v v⁻¹, por 24 horas e lavadas com água destilada antes do uso. Nos experimentos foi utilizado ácido nítrico 65% m m⁻¹ (Vetec, Brasil). Para determinação do teor de óleo das amostras foi utilizado como solvente o Hexano (Dinâmica, Brasil). Para determinação do teor de nitrogênio foi utilizado H₂SO₄ P.A, Na₂SO₄, CuSO₄.5H₂O (Sigma Chemical Company, EUA) e NaOH 40% m m⁻¹ (Merck, Alemanha).

Os padrões, utilizados nas curvas analíticas, necessários para análise dos elementos Cu, Fe, Mn, Mg, K, P e Ca por ICP-OES e Zn por FAAS foram preparados a partir de diluições de soluções estoque 1000 mg L⁻¹ (Across Organics, Bélgica). As curvas analíticas para determinação de carbono orgânico residual foram preparadas a partir de ureia (LabSynth, São Paulo, Brasil) em meio aquoso a quente.

4.2 Amostras e material de referência certificado

Os experimentos foram realizados utilizando amostras de origem vegetal derivadas do grão de soja: extrato hidrossolúvel, farinha tostada, proteína texturizada e proteína isolada disponíveis em estabelecimentos locais na cidade de Fortaleza – Ceará. O material de referência certificado utilizado no estudo de validação foi o NIST 1568b (*Rice Flour*).

4.3 Instrumentação

Os teores de óleo foram determinados por gravimetria empregando sistema Soxhlet. Os teores de umidade e a secagem das amostras foram realizados com auxílio de uma estufa (Micronal, São Paulo, Brasil) e de um dessecador para armazenagem. Os teores de proteína foram realizados com auxílio de um bloco digestor e um destilador de nitrogênio.

O sistema de preparo das amostras (IR) foi desenhado e montado no Laboratório de Estudos em Química Aplicada (LEQA) e consta de uma caixa de MDF (fibra de média densidade) de 30x17x20 cm revestida internamente com alumínio e

com capacidade para um frasco com diâmetro máximo de 6 cm. Nesse sistema uma lâmpada halógena de Tungstênio (500W, FLC, China) com 11,8 cm, utilizada como fonte de radiação infravermelha, foi acoplada internamente na lateral direita. A caixa possui uma tampa removível com orifício central de encaixe do tubo reacional e um pedestal de vidro fixado no interior da caixa usado como suporte. Um refletor de alumínio foi empregado para garantir uma maior eficiência de aquecimento do meio (Figura 4).

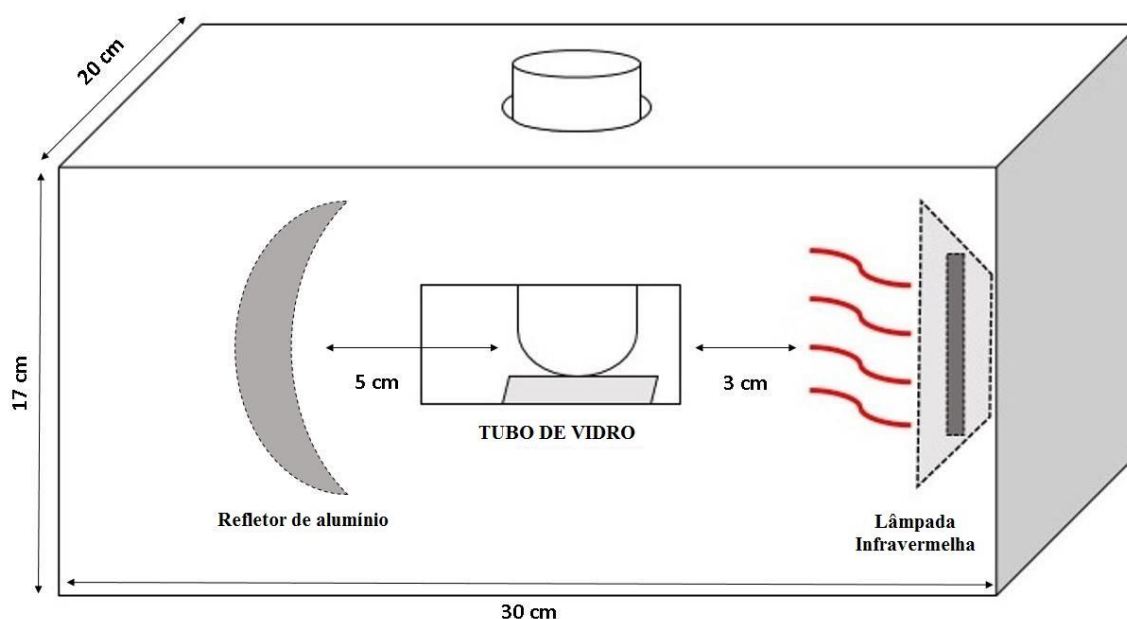


Figura 4 - Sistema (IR): Caixa MDF acoplada com lâmpada de halogênio utilizado

A determinação do teor de carbono residual, Cu, Fe, Mn, Mg, K, P e Ca foi efetuada em um espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, ICP OES, “dual view” (OPTIMA 4300 DV, Perkin Elmer) que opera em visão axial e radial com sistema simultâneo de detecção. A quantificação Zn foi realizada em um espectrômetro de absorção atômica com chama (FAAS) (Varian AS 240FS, Mulgrave, Australia).

Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.4 Procedimento experimental

4.4.1 Determinação do teor de óleo, umidade e proteína nas amostras

Para quantificação do teor de umidade cerca de 1,00 g de cada amostra foi pesado em um béquer e submetido a aquecimento em estufa à 105° C durante 4 horas. Após esfriamento em dessecador, as amostras foram novamente pesadas, e em seguida, submetidas a aquecimento em estufa à 105° C por uma hora. Esse processo foi repetido até peso constante. O cálculo do teor de umidade é obtido pela diferença entre a massa inicial e final, dividida pela massa inicial e o resultado multiplicado pelo fator 100.

Para a secagem das amostras, utilizadas para análise da porcentagem de óleo, proteína e cinzas, massa equivalente a 20,0 g dos derivados de soja foram submetidos a aquecimento em estufa à 105° C durante 15 horas e armazenadas em dessecador.

Para a extração e a quantificação do óleo nas amostras derivadas da soja utilizou-se o solvente hexano com o auxílio de um sistema Soxhlet. O método de Soxhlet é altamente eficaz para amostras vegetais e consistiu no tratamento sucessivo da amostra imersa no hexano por sifonação e posterior condensação do solvente aquecido dentro do balão de fundo chato fixado na base do aparelho.

Em um cartucho de papel de filtro qualitativo, selado com algodão, cerca de 2,00 g da amostra seca foram introduzidos, sendo o cartucho posteriormente encaixado no extrator. As extrações foram realizadas em 6 h. Após o término do período de extração, o balão de fundo chato contendo a fração lipídica com o solvente foi retirado e levado a estufa à 100° C para evaporação do solvente por 12 horas. A diferença de massa do balão de fundo chato seco e após extração e secagem fornece o valor de lipídios na amostra e o teor pode ser calculado com o valor dessa diferença dividido pela massa pesada e o resultado multiplicado por um fator 100.

O teor de nitrogênio foi determinado pelo método Kjeldahl. Este procedimento baseia-se na decomposição da matriz orgânica por ácido sulfúrico e o nitrogênio na forma de amônia é coletado usando um sistema de destilação.

4.4.2 Digestão parcial da amostra empregando radiação infravermelha

Avaliou-se o desempenho das digestões parciais das amostras com HNO_3 65% m m⁻¹ considerando aspectos como a massa de carbono solubilizado e de resíduo final, eficiência de decomposição parcial ou solubilização, tempo do processo, utilização de um sistema de refluxo dos gases e a extração elementar.

Primeiramente foram realizados testes nas amostras com a finalidade de se determinar o volume mínimo de ácido necessário para homogeneização; tempo mínimo para iniciar borbulhamento e tempo máximo de exposição à radiação infravermelha para evitar carbonização e a observação do comportamento das amostras ao ataque ácido. Inicialmente, 1,0 g de cada amostra foi pesado e transferido para tubos de vidro seguido da adição de volumes equivalente a 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 e 5,0 mL de HNO_3 65% m m⁻¹ misturados com auxílio de um bastão de vidro. Posteriormente, o frasco foi exposto a radiação infravermelha no sistema (IR).

As amostras foram submetidas à radiação infravermelha em um frasco de vidro de 30 cm de altura e 3 mm de espessura. Este frasco foi idealizado para evitar o transbordamento da amostra durante a reação. Para o sistema de refluxo foi utilizado um dedo frio de vidro de 13 cm, com saída para gás, acoplado e vedado no frasco reacional com uma tampa de teflon (Figura 5). Massas equivalentes a 1,00 g de amostras foram submetidas ao sistema (IR), usando HNO_3 65% m m⁻¹.

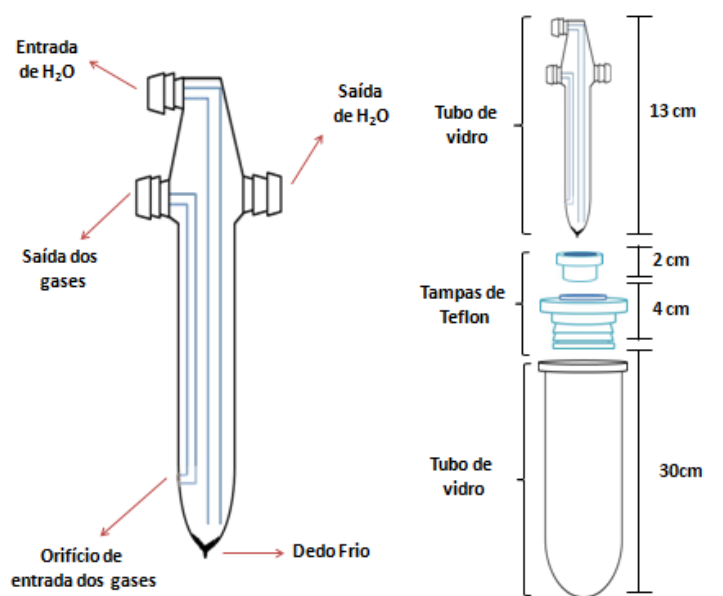


Figura 5- Esquema detalhado do dedo frio utilizado acoplado ao frasco para

promover o refluxo dos vapores ácidos. Elaborado pelo autor.

Na otimização do procedimento experimental, utilizou-se um planejamento fatorial completo em dois níveis com variação do uso de refluxo, volume de HNO₃ e tempo de exposição à radiação infravermelha. As variáveis e seus níveis estão detalhadas na Tabela 2.

Tabela 2 Matriz de planejamento dos experimentos.

Experimento	Ácido Nítrico (mL)	Tempo (min)	Refluxo
1	5	4	Sim
2	5	4	Não
3	5	7	Sim
4	5	7	Não
5	8	4	Sim
6	8	4	Não
7	8	7	Sim
8	8	7	Não

Depois de submetidas ao aquecimento, as amostras foram filtradas em papel de filtro quantitativo (previamente seco em estufa a 105 °C por 2 horas), transferidas para tubos de falcon e diluídas para 30,0 mL com água deionizada. Após a filtragem os papéis contendo o resíduo da amostra foram lavados sucessivas vezes com água destilada, secados em estufa a 55 °C por 12 horas e pesados para quantificar a massa de resíduo remanescente. O Fluxograma da Figura 6 detalha esquematicamente todo procedimento:

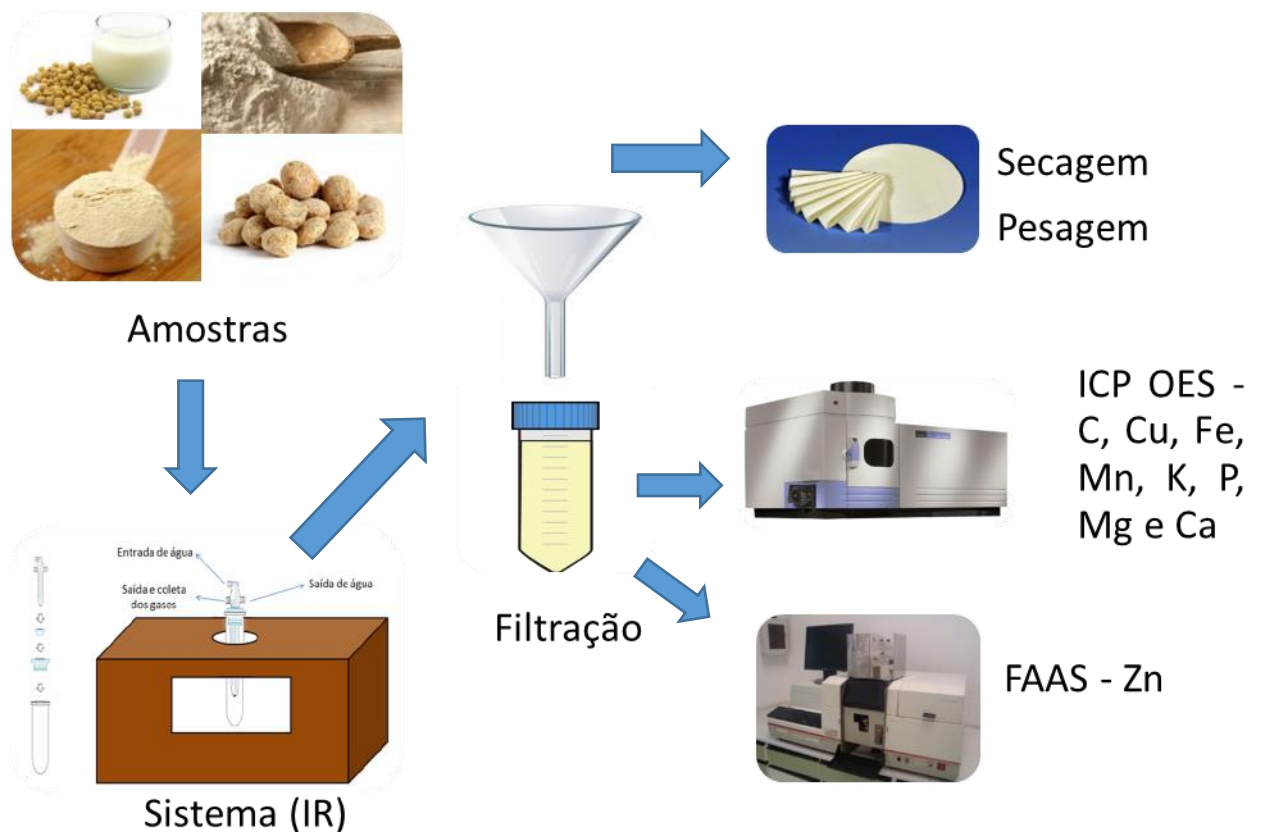


Figura 6- Fluxograma do procedimento experimental para extração multielementar no sistema (IR).

4.4.3 Equipamentos utilizados para a análise elementar

A determinação dos elementos Cu, Fe, Mn, K, P, Mg e Ca e o teor de carbono residual foram realizadas por ICP OES. O teor de carbono residual (% RCC) foi obtido após as soluções finais passarem por um banho ultrassônico de 3 minutos para evitar a presença de compostos voláteis de carbono nestas soluções. As soluções padrão de calibração para carbono foram preparadas em meio aquoso a quente na faixa de 0,5 a 2,5 % C m v⁻¹ segundo método proposto por Gouveia *et al.* (2001). Os parâmetros utilizados podem ser verificados na Tabela 2. As linhas de emissão selecionadas para cada elemento foram em nm: C 193,027 (axial), Cu 327, 393 (axial), Fe 238,204 (axial), Mn 257,610 (axial), K 766,490 (radial), Mg 285,213 (radial), P 213,617 (radial) e Ca 315,887 (axial).

Tabela 3- Parâmetros operacionais do ICP-OES.

Parâmetro	ICP-OES
Câmara de spray	Duplo passo
Nebulizador	Fluxo cruzado
Potência RF (kW)	1,1
Vazão de Ar plasma (L min⁻¹)	15,00
Vazão de Ar auxiliar (L min⁻¹)	0,50
Vazão de Ar nebulização (L min⁻¹)	0,80
Taxa de aspiração (mL min⁻¹)	1,40

A concentração de Zn foi determinada através da técnica de espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS) equipado com lâmpada de deutério para correção de fundo e chama de ar-acetileno. As medidas foram obtidas por lâmpada de cátodo oco (HCL) de Zn com corrente de 4 mA. O comprimento de onda utilizado foi de 213,9 nm e abertura de fenda de 1,0 nm.

4.4.4 Tratamento dos dados

O Software Statistica 6.0 (StatSoft, EUA) foi utilizado para o tratamento de dados do planejamento experimental 2³ proposto na Tabela 2. A função desejabilidade foi realizada utilizando 60 passos para plotar os gráficos de superfície de respostas.

5 RESULTADOS

5.1 Análise dos teores de óleo, umidade e proteína.

Os valores encontrados dos teores de proteína, óleo e umidade nas amostras estão demonstrados na Tabela 4.

Tabela 4- Teores de proteína, óleo e umidade nas amostras de extrato hidrossolúvel de soja (EHS), farinha de soja (FS), proteína texturizada de soja (PTS) e proteína isolada de soja (PIS). Valores médios (n=3) e desvio padrão.

	Nitrogênio* (%)	Óleo* (%)	Umidade (%)
EHS	6,25 ± 0,18	8,36 ± 0,18	7,8 ± 0,27
FS	8,26 ± 1,73	9,13 ± 0,84	6,98 ± 0,31
PTS	7,79 ± 0,40	1,20 ± 0,62	10,95 ± 0,19
PIS	12,54 ± 2,95	-	5,50 ± 0,25

*teor em base seca

A farinha de soja (FS), conforme o esperado, apresentou o maior teor de óleo entre todas as amostras, seguido do extrato hidrossolúvel de soja (EHS). Essas amostras também apresentaram valores próximos de teor de umidade, em torno de 7%. A proteína texturizada (PTS) apresentou baixíssimo teor de óleo, porém o maior teor de umidade. A proteína isolada (PIS) não apresentou teor de óleo e o menor teor de umidade.

O maior teor de nitrogênio corresponde a proteína isolada de soja, por consequência do processo de concentração proteica que ocorre em sua fabricação. Comparando os teores de proteína da farinha de soja (51,67%, em base seca) e o da proteína texturizada de soja (48,70%, em base seca).

5.2 Avaliação dos testes iniciais

Com os testes iniciais, descritos no procedimento experimental, foi possível fazer uma avaliação preliminar da quantidade de ácido necessário quando se deseja trabalhar com 1,0 g das amostras e dos tempos mínimo e máximo de aquecimento. O objetivo destes testes foi determinar a faixa de estudo das variáveis do planejamento fatorial. Verificou-se, durante os testes, que a proteína isolada de soja (PIS) necessita de maiores volumes de ácido para formar uma mistura e facilitar a extração, e ainda, evitar a carbonização quando exposta a radiação infravermelha

em sistema sem refluxo dos gases. Desse modo, foi estabelecida a PIS como amostra crítica na escolha dos níveis mínimo e máximo de faixa de trabalho.

Observou-se que para a solubilização de 1,0 g de PIS no sistema sem refluxo, volumes de 2,0 a 3,5 mL de HNO_3 e tempos inferiores a 2 minutos não são suficientes. Quando o volume de HNO_3 é inferior a 3,5 mL, a amostra, além de não misturar efetivamente, carboniza rapidamente, antes mesmo de se iniciar a ebulição. Usando-se um volume de 4,0 mL de HNO_3 a amostra forma uma mistura completa, contudo, quando exposta a radiação, seca rapidamente formando um resíduo sólido, indicando início de carbonização. Pôde-se concluir que maiores volumes de ácido são necessários. O teste seguinte, realizado com 4,5 mL de HNO_3 , necessita de 2,8 minutos para iniciar ebulição e de 8 minutos de exposição à radiação para iniciar a carbonização. Esse teste foi repetido em todas as amostras, que apresentam tempos semelhantes, contudo, necessitam de menores volumes de ácido para solubilizar.

Posteriormente, repetiu-se o último teste utilizando o dedo frio (sistema de refluxo) acoplado ao frasco. O sistema de refluxo resfria os vapores ácidos regenerando-os. Com esse sistema, a PIS necessita de 3,5 minutos de exposição à radiação para iniciar a ebulição da mistura. As outras amostras apresentam tempos mínimos semelhantes. Assim, ficou estabelecido um volume mínimo de 5 mL de ácido nítrico concentrado e tempo mínimo de aquecimento de 4 minutos. Para os valores máximos estabeleceu-se 8 mL de ácido nítrico e 7 minutos de exposição à radiação infravermelha. Foi possível também concluir que trabalhar com o tempo máximo de 8 minutos, no sistema sem refluxo, não é interessante pois corre-se o risco de carbonizar a amostra, principalmente a PIS que é a amostra mais crítica, neste caso. E ainda, a carbonização e secura da mistura pode levar a formação de óxidos de difícil decomposição, inviabilizando os estudos de extração dos elementos e a posterior análise por técnicas espectrométricas.

5.3 Teores de carbono residual nos digeridos (% RCC)

Os valores obtidos para % RCC (m v^{-1}) nas soluções dos filtrados após os procedimentos de extração do planejamento fatorial 2^3 (Tabela 2) estão demonstrados na Tabela 5. A amostra de proteína isolada de soja apresentou os maiores teores de carbono residual entre os experimentos. A farinha de soja e a proteína texturizada de soja apresentaram as menores % RCC (m v^{-1}).

Tabela 5- Teores de carbono residual das soluções digeridas e filtradas após aquecimento com radiação infravermelha em meio ácido nas amostras de extrato hidrossolúvel de soja (EHS), farinha de soja (FS), proteína texturizada de soja (PTS) e proteína isolada de soja (PIS). Valores médios ($n=3$) e desvio padrão.

	EHS	FS	PTS	PIS
Experimento 1	1,13 ± 0,07	0,43 ± 0,05	0,40 ± 0,02	1,51 ± 0,29
Experimento 2	1,12 ± 0,10	0,89 ± 0,09	1,01 ± 0,05	1,51 ± 0,26
Experimento 3	1,02 ± 0,04	0,46 ± 0,04	0,46 ± 0,10	1,58 ± 0,14
Experimento 4	1,15 ± 0,06	0,80 ± 0,03	1,05 ± 0,02	1,38 ± 0,03
Experimento 5	1,19 ± 0,14	0,53 ± 0,03	0,33 ± 0,08	1,33 ± 0,27
Experimento 6	1,00 ± 0,15	0,61 ± 0,03	0,79 ± 0,04	1,48 ± 0,08
Experimento 7	0,99 ± 0,03	0,30 ± 0,05	0,41 ± 0,13	1,10 ± 0,12
Experimento 8	0,84 ± 0,08	0,73 ± 0,04	0,88 ± 0,08	1,34 ± 0,05

O teor de carbono residual em todas as amostras ficou entre 0,30 – 1,58 % nas soluções dos digeridos. Para as técnicas de detecção empregadas nesse trabalho o teor elevado de carbono residual não é crítico, considerando que a matéria orgânica remanescente da decomposição da amostra sofrera combustão durante o processo de determinação.

5.4 Estudo da digestão parcial e da solubilização das amostras

Na figura 7 e 8 são apresentados os gráficos comparativos obtidos para massa de carbono solubilizado nas soluções finais e a massa de resíduo sólido coletado na filtração. Os valores de carbono solubilizado, em mg, foram obtidos a partir da % RCC m v^{-1} por equivalência à massa de amostra pesada. O aquecimento assistido por radiação infravermelha em meio oxidante pode causar dois processos:

extração dos elementos de interesse fracamente ligados a matriz e/ou oxidação da matéria orgânica, caracterizando um processo de decomposição.

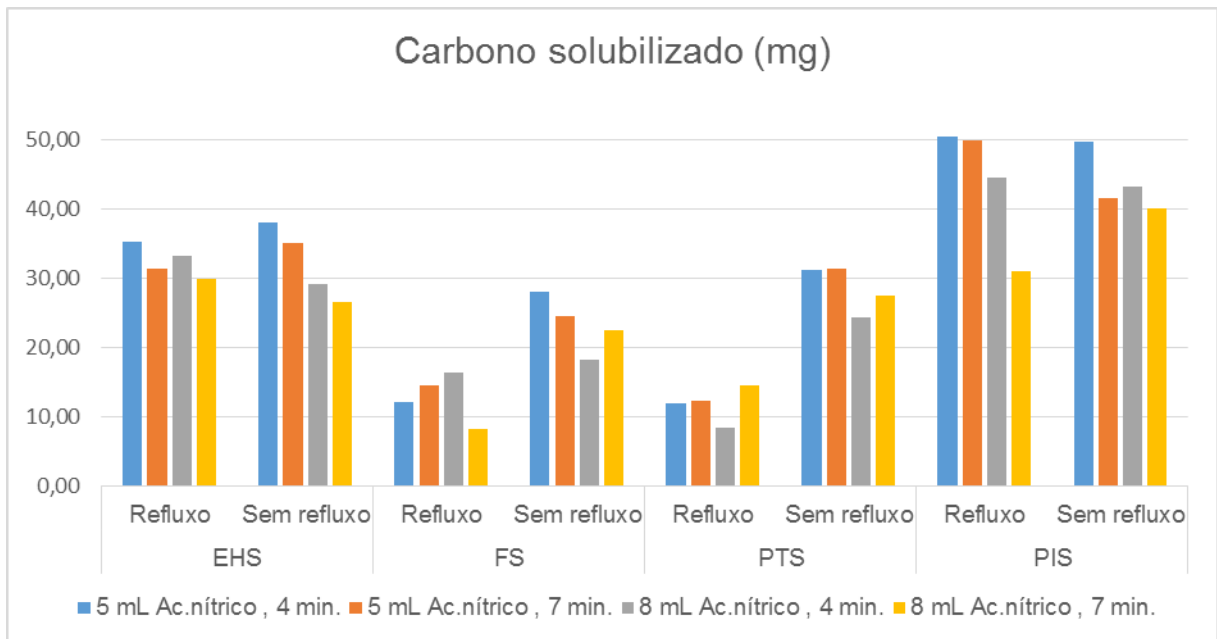


Figura 7 - Gráficos comparativos entre carbono solubilizado, em mg, nas amostras de extrato hidrossolúvel, farinha, proteína texturizada e proteína isolada de soja após os experimentos do planejamento fatorial 2^3 (Tabela 2).

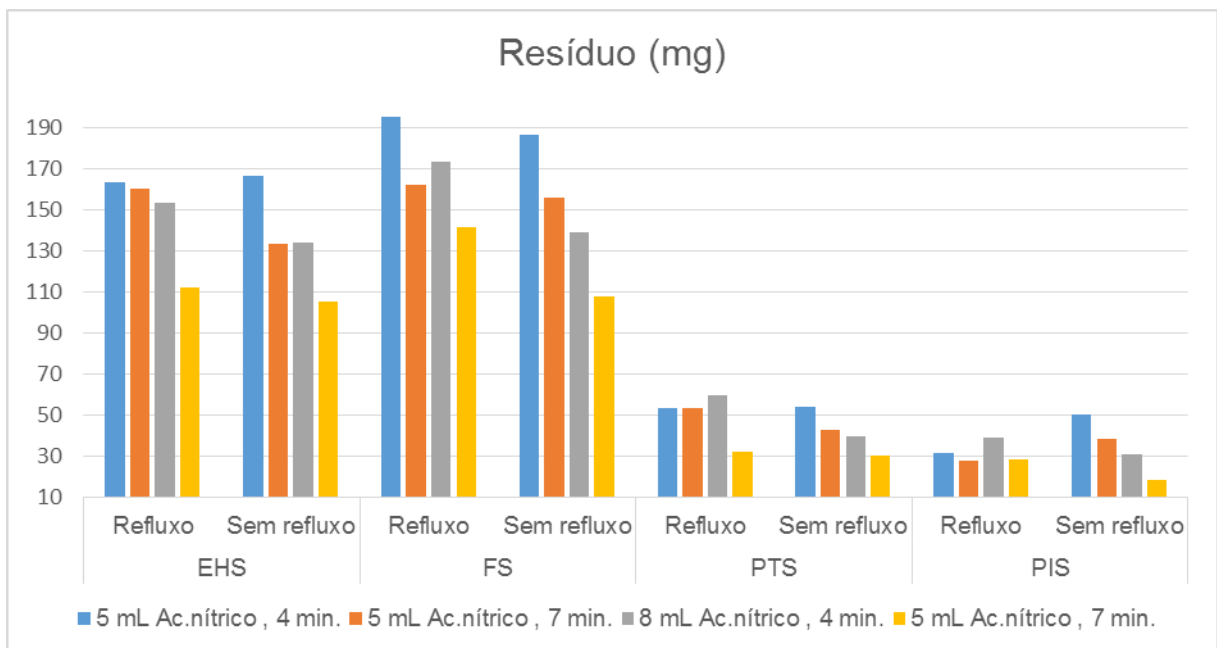


Figura 8 - Gráficos comparativos entre massa de resíduo remanescente, em mg, nas amostras de extrato hidrossolúvel, farinha, proteína texturizada e proteína isolada de soja após os experimentos do planejamento fatorial 2^3 (Tabela 2).

O uso do ácido nítrico resulta em soluções límpidas, amareladas e sem precipitado, após filtração, em todos os casos. A cor, textura e a massa dos resíduos sólidos varia nas diferentes amostras. O extrato hidrossolúvel e a farinha de soja geram resíduos amarelos, com aspecto de cera e com elevadas massas. A proteína texturizada forma um pó claro e amarelado. Já o resíduo da proteína isolada de soja apresenta aspecto de pó seco esbranquiçado. Observou-se também que as amostras PTS e PIS formam pequenas quantidades de resíduo após a extração. Durante o aquecimento todas as amostras formam espuma. Neste sentido, pode-se destacar a PTS que apresenta maior volume de espuma e maior formação de gases de coloração marrom, que pode ser indicativo de formação de gases NO_x .

Em geral, o uso de maiores tempos de aquecimento e de maiores volumes de ácido nítrico resulta em menores quantidades de carbono residual nas soluções finais e de menores massas de resíduos remanescentes, o que pode ser indicativo da digestão parcial das amostras. Geralmente, espera-se que a maior exposição à radiação infravermelha (tempo de aquecimento) e maiores volumes de ácido torne o meio reacional mais oxidante, melhorando a taxa de decomposição da matéria orgânica em sistemas abertos. É interessante obter menores valores de carbono residual nas soluções finais, uma vez que, dependendo da técnica analítica empregada, o carbono pode interferir significativamente nos resultados. (WASILEWSKA, 2002)

Vale ressaltar que o sistema em refluxo demanda maiores tempos para aquecer a mistura reacional, em virtude do resfriamento do ácido que evapora e condensa de volta para a mistura reacional no dedo frio acoplado no interior do frasco. Contudo, o meio reacional é mais ácido por consequência da recirculação dos vapores ácidos gerados. Já o sistema sem refluxo demanda menores tempos para aquecimento, entretanto, os vapores ácidos gerados são liberados para fora do sistema. As particularidades desses sistemas podem favorecer em algumas situações a eficiência de extração e/ou decomposição parcial das amostras. Na literatura, alguns autores (PINHEIRO, 2014; FERREIRA, 2013) relataram o uso do dedo frio para decomposição de amostras alimentícias, concluindo que foi possível mineralizar a matéria orgânica nas amostras em teores próximos ao de um sistema aberto sem refluxo, com a vantagem de se evitar perdas de elementos voláteis durante a digestão.

Acredita-se que a eficiência na decomposição de matrizes orgânicas está mais relacionada ao tipo de carbono original do que com o teor de carbono nas amostras (NOBREGA *et al.* 2001). Dessa forma, conhecer a composição proteica, lipídica e de carboidratos é um fator indispensável na compreensão da eficiência da pré-digestão das amostras. A amostra de extrato hidrossolúvel de soja (EHS) apresenta cerca de 6,25 % de nitrogênio, a farinha de soja cerca de 8%, a proteína texturizada cerca de 7,8 % e a proteína isolada de soja cerca de 12,5%. Ressaltando que quanto maior o teor de nitrogênio em uma amostra maior será a quantidade de proteínas na mesma.

PRATT *et al.* (1988) estudaram as temperaturas específicas para a decomposição de três componentes de matrizes botânicas e biológicas utilizando ácido nítrico como reagente. Os autores concluíram que as matrizes que contêm em sua estrutura basicamente carboidratos são decompostas totalmente a 140° C, proteínas a 150° C e moléculas lipídicas a aproximadamente 160° C. O sistema estudado nesse trabalho opera à pressão ambiente, e conseqüentemente está limitado a temperatura de ebulição do HNO₃. Todavia, foi possível verificar a ocorrência de uma degradação parcial da matéria orgânica nas amostras. Esse fato foi observado quando a diminuição da massa de carbono e de resíduo ocorria simultaneamente entre os experimentos.

Würfels e Jackwerth (1989) relataram que no início da decomposição de materiais biológicos ocorre primeiramente uma hidrólise ácida nas seguintes ligações: peptídeos ligados a proteínas, ésteres ligados a gorduras, glicosídeos ligados a carboidratos, e nucleosídeos e amidas ligados a aminoácidos. Observa-se que, em alguns ensaios, ocorre um aumento do carbono solubilizado e a diminuição do resíduo remanescente. Isto porque, provavelmente parte da matriz orgânica estava solubilizando, mas não sendo mineralizadas.

A degradação das amostras biológicas com ácido nítrico sob pressão e a 180 °C foi estudada por Würfels e Jackwerth (1989) com o objetivo de elucidar os resíduos restantes nas digestões após a decomposição das amostras. Estes autores verificaram que os compostos orgânicos que não podem ser volatilizados a temperaturas de até 130°C são aminoácidos, tais como: fenilalanina, histidina, triptofano e metionina, e ácidos graxos insaturados, como o ácido linoleico. As proteínas de soja contem cerca de 90 mg g⁻¹ de fenilalanina, 26-28 mg g⁻¹ de histidina,

14 mg g⁻¹ de triptofano e 26 mg g⁻¹ de metionina (JOSEPH, 2001). Pode-se estipular, portanto que, a amostra de proteína isolada de soja estudada nesse trabalho, possui cerca de 72 mg de fenilalanina, 21,6 mg de histidina, 11,2 mg de triptofano e 20,8 mg de metionina. Esses dados são importantes para a compreensão dos altos valores de carbono solubilizado na PIS além dos baixíssimos valores de resíduo indicando que as proteínas constituintes da matriz são solubilizadas. E ainda, como ocorre uma diminuição do carbono solubilizado (carbono residual) entre os experimentos, pode-se afirmar também a ocorrência de digestão parcial das proteínas. Essa observação pode ser aplicada as outras amostras, visto que as amostras derivadas de soja estudadas nesse trabalho apresentam altos teores de proteína.

As amostras de EHS e FS apresentam massas elevadas de resíduo sólido. Comparando com a amostra PTS (contém baixo teor de gordura) sugere-se que o resíduo seja proveniente mais dos lipídios do que das proteínas das amostras. Sabe-se que óleos e gorduras são as matrizes orgânicas de maior dificuldade de decomposição e solubilização (KRUG, 2000). Assim, grande parte dos produtos orgânicos permanecem não dissolvidos, em especial quando as amostras contêm gorduras. O óleo da soja contém cerca de 50 % de ácido linoleico (EMBRAPA, 2006) e como estudado por Würfels e Jackwerth (1989) é um dos compostos biológicos de maior dificuldade de degradação. Carrilho *et al.* (2001) apresentaram uma tentativa de correlacionar os teores de gordura e proteína bruta de amostras biológicas com o teor de carbono residual após decomposições assistidas por radiação micro-ondas, e concluíram que o parâmetro mais importante para investigar a dificuldade em destruir totalmente uma matriz orgânica é seu teor de gordura.

Würfels e Jackwerth (1989) também relacionaram a quantidade de carboidratos das amostras com a eficiência de decomposição de matrizes biológicas. Estes autores concluíram que maiores teores de carboidratos levam a maior formação de NO₂ aumentando-se, assim, a pressão interna em sistemas fechados. No entanto, os autores consideraram também que em sistemas abertos essa eficiência é diminuída. A amostra PTS apresenta menores valores de carbono solubilizado (teor de carbono residual) e de resíduo entre todas as amostras. Se comparada com a amostra PIS, com baixas quantidades de carboidratos e elevada quantidade de nitrogênio, verificamos que obtiveram quantidades de resíduos semelhantes, no entanto, diferentes quantidades de carbono solubilizados (carbono

residual). Quando comparada com a FS (quantidades de proteína semelhantes e variação do teor de lipídios) concluímos que parte do resíduo remanescente da farinha de soja deve ser proveniente de óleos.

A amostra PIS possui aproximadamente 40% mais nitrogênio em sua composição do que a amostra PTS, contudo, resulta em, nas melhores condições do sistema com refluxo, cerca de 366% a mais de carbono solubilizado. Isso pode ser observado também nas amostras EHS e FS que possuem quantidade de gordura semelhantes e variação na quantidade de carboidrato (cerca de 40% a mais na farinha de soja). Entre essas duas amostras a FS apresenta menor quantidade de carbono e de resíduo. Provavelmente, nesses casos a quantidade de carboidrato presente nas amostras esteja facilitando a decomposição (como um todo) dessas amostras nos sistemas propostos. Visto que os carboidratos são a matriz biológica de maior facilidade de decomposição.

5.4.1 Extrato hidrossolúvel de soja (EHS)

Para a amostra EHS observa-se na tabela 6, que quando fixado o volume em 5 mL de ácido nítrico e variando o tempo de exposição à radiação, não se observam diferenças significativas quanto ao carbono solubilizado em ambos os sistemas. Porém, quando se utiliza 8 mL de ácido, variando-se o tempo, a eficiência dos sistemas é favorecida. Outra observação acerca dessa amostra é que o sistema sem refluxo apresenta melhores resultados quando submetido a um maior tempo de exposição à radiação.

No sistema com refluxo, volume de 5 mL de ácido nítrico e variação do tempo percebe-se que a massa residual permanece constante e ocorre redução do carbono na solução. Isso indica que parte do carbono solubilizado mineralizou, porém, o volume de ácido não é suficiente para solubilizar a parte restante do resíduo. Em contrapartida, com uso de 8 mL de ácido, o aumento do tempo de exposição à radiação infravermelha resulta em uma expressiva redução do resíduo remanescente e do carbono solubilizado, característica também observada no sistema sem refluxo.

Vale ressaltar que no sistema sem refluxo com menor volume de ácido e variação do tempo, são obtidos maiores valores de carbono solubilizado e menores

quantidades de resíduo. Os dados desses ensaios estão dentro da faixa de dispersão do desvio padrão, prevendo que parte do resíduo solubiliza e parte do carbono é mineralizado.

Tabela 6- Valores de carbono orgânico solubilizado (C solubilizado), em mg, e da massa de resíduo remanescente (Resíduo), em mg, referente ao extrato hidrossolúvel de soja submetido a aquecimento por radiação infravermelha em meio ácido. Valores médios (n=3) e desvio padrão.

Experimento	C solubilizado (mg)	Resíduo (mg)
1 (5 mL HNO ₃ , 4 min, C/ dedo frio)	350,41 ± 8,58	163,43 ± 10,26
2 (5 mL HNO ₃ , 4 min, S/ dedo frio)	343,30 ± 8,39	166,37 ± 5,18
3 (5 mL HNO ₃ , 7 min, C/ dedo frio)	312,25 ± 2,08	160,00 ± 5,66
4 (5 mL HNO ₃ , 7 min, S/ dedo frio)	355,89 ± 1,65	133,53 ± 8,15
5 (8 mL HNO ₃ , 4 min, C/ dedo frio)	331,26 ± 9,65	153,53 ± 3,87
6 (8 mL HNO ₃ , 4 min, S/ dedo frio)	323,41 ± 30,48	134,05 ± 1,34
7 (8 mL HNO ₃ , 7 min, C/ dedo frio)	296,38 ± 8,73	111,90 ± 2,97
8 (8 mL HNO ₃ , 7 min, S/ dedo frio)	264,07 ± 12,15	105,30 ± 9,25

5.4.2 Farinha de soja (FS)

Na Tabela 7 observa-se que para a amostra farinha de soja (FS), o sistema com refluxo é expressivamente mais efetivo, mesmo apresentando ao final uma maior massa de resíduo sólido que, pode-se dizer, em equivalência, ainda resulta em uma maior decomposição da matriz orgânica. Em ambos os sistemas, um maior tempo de exposição à radiação infravermelha leva a menores valores de resíduo e de carbono solubilizado, o volume de ácido não é muito significativo na solubilização dessa amostra.

Pode-se observar que: utilizando-se refluxo, volume fixo de 5 mL e aumento do tempo de aquecimento ou utilizando-se menor tempo de aquecimento e variando-se o volume de ácido ocorre um aumento do carbono solubilizado e diminuição do resíduo remanescente. Essa mesma característica é observada quando se utiliza 8 mL de ácido em sistema sem refluxo. Provavelmente isto ocorre porque parte da matéria orgânica está sendo degradada e solubilizada, porém, não está sendo mineralizada. Nos ensaios com maior tempo de aquecimento e variando-

se o volume de ácido, em ambos os sistemas, observa-se uma diminuição do carbono solubilizado e diminuição do resíduo.

Tabela 7- Valores de carbono orgânico solubilizado (C solubilizado), em mg, e da massa de resíduo remanescente (Resíduo), em mg, referente a farinha de soja submetido a aquecimento por radiação infravermelha em meio ácido. Valores médios (n=3) e desvio padrão.

Experimento	C solubilizado (mg)	Resíduo (mg)
1 (5 mL HNO ₃ , 4 min, C/ dedo frio)	121,14 ± 6,49	195,04 ± 2,92
2 (5 mL HNO ₃ , 4 min, S/ dedo frio)	279,99 ± 11,37	186,63 ± 1,40
3 (5 mL HNO ₃ , 7 min, C/ dedo frio)	143,95 ± 3,89	162,17 ± 7,99
4 (5 mL HNO ₃ , 7 min, S/ dedo frio)	238,74 ± 10,31	155,90 ± 3,25
5 (8 mL HNO ₃ , 4 min, C/ dedo frio)	158,09 ± 8,05	172,98 ± 4,05
6 (8 mL HNO ₃ , 4 min, S/ dedo frio)	181,64 ± 8,98	139,17 ± 2,01
7 (8 mL HNO ₃ , 7 min, C/ dedo frio)	82,34 ± 0,03	141,46 ± 7,19
8 (8 mL HNO ₃ , 7 min, S/ dedo frio)	216,29 ± 12,49	107,40 ± 4,10

5.4.3 Proteína texturizada de soja (PTS)

No caso das amostras com altos teores de proteína e baixos teores de óleo, observa-se uma mínima quantidade de resíduo remanescente. Para a proteína texturizada de soja (Tabela 8) o refluxo, entre todas as amostras, apresentou maior desempenho quanto a mineralização da matéria orgânica. O volume de ácido e o tempo de aquecimento mostram se positivos tanto na solubilização quanto na decomposição parcial dessa amostra. Os vapores ácidos condensados tornam o meio reacional bastante oxidativo.

Em ambos os sistemas, a massa de resíduos obtida é semelhante durante os ensaios, apresentando um menor valor no experimento 7. Observa-se ainda que, parte da massa desse resíduo pode ter sido causada pela elevada formação de espuma, que arrasta parte da amostra para as paredes do frasco, permanecendo sem contato com o meio reacional.

No sistema com refluxo, o uso de 4 mL de ácido não varia o carbono solubilizado e o resíduo indicando que, mesmo aumentando a exposição à radiação infravermelha, esse volume de ácido não é suficiente para melhorar a solubilização

dessa amostra. Quando o volume de 8 mL de ácido é utilizado, variando o tempo, ocorre uma expressiva diminuição do carbono solubilizado e da massa de resíduo indicando que ocorre a oxidação da matéria orgânica.

Outro ponto relevante nesse sistema, é quando se fixa o tempo em 4 minutos e varia-se o volume de ácido, pode-se perceber que o aumento do volume de ácido gera mais resíduo remanescente e carbono solubilizado. Pode-se atribuir isso ao fato que o sistema em refluxo necessitar de mais tempo de exposição à radiação infravermelha para que se alcance a temperatura de ebulição do ácido. No sistema sem refluxo, o volume de 4 mL de ácido não é efetivo para solubilização e decomposição da amostra, fato já verificado para o sistema com refluxo. Quando se trabalha com 8 mL de ácido ocorre uma expressiva diminuição do carbono solubilizado e do resíduo. Nota-se que o carbono solubilizado apresenta um leve aumento, todavia, os valores estão na faixa de dispersão dos seus desvios padrão, e a massa de resíduo remanescente decai com a variação do tempo nessa condição.

Tabela 8 - Valores de carbono orgânico solubilizado (C solubilizado), em mg, e da massa de resíduo remanescente (Resíduo), em mg, referente a proteína texturizada de soja submetido a aquecimento por radiação infravermelha em meio ácido. Valores médios (n=3) e desvio padrão.

Experimento	C solubilizado (mg)	Resíduo (mg)
1 (5 mL HNO ₃ , 4 min, C/ dedo frio)	119,76 ± 5,74	53,13 ± 1,27
2 (5 mL HNO ₃ , 4 min, S/ dedo frio)	310,83 ± 11,84	53,75 ± 7,42
3 (5 mL HNO ₃ , 7 min, C/ dedo frio)	122,07 ± 1,46	53,10 ± 0,42
4 (5 mL HNO ₃ , 7 min, S/ dedo frio)	312,48 ± 5,92	42,93 ± 1,60
5 (8 mL HNO ₃ , 4 min, C/ dedo frio)	144,01 ± 12,29	59,31 ± 7,30
6 (8 mL HNO ₃ , 4 min, S/ dedo frio)	235,54 ± 12,92	39,23 ± 3,55
7 (8 mL HNO ₃ , 7 min, C/ dedo frio)	83,76 ± 2,21	32,12 ± 1,44
8 (8 mL HNO ₃ , 7 min, S/ dedo frio)	249,60 ± 14,10	29,90 ± 1,30

5.4.4 Proteína isolada de soja

Na proteína isolada de soja (PIS) ambos sistemas apresentam características semelhantes (Tabela 9): o aumento do volume de ácido e do tempo de exposição à radiação infravermelha apresentam maiores eficiências de solubilização do carbono e da mineralização. No sistema com refluxo, o aumento do volume de ácido é significativo com aumento do tempo de aquecimento, gerando menores valores de resíduo e de carbono solubilizado.

Vale destacar que, no experimento 7, o sistema com refluxo apresenta menores valores de carbono solubilizado e maiores massas de resíduo quando comparado ao sistema sem refluxo (Experimento 8). Ainda assim, conclui-se, por equivalência dos valores, o sistema com refluxo é mais efetivo na mineralização dessa amostra. O meio com maior volume de ácido pode apresentar regeneração dos vapores ácidos, e portanto, tem maior eficiência na oxidação parcial dessa matriz orgânica.

Tabela 9 - Valores de carbono orgânico solubilizado (C solubilizado), em mg, e da massa de resíduo remanescente (Resíduo), em mg, referente a proteína isolada de soja submetida a aquecimento por radiação infravermelha em meio ácido. Valores das médias (n=3) e desvio padrão.

Experimento	C solubilizado (mg)	Resíduo (mg)
1 (5 mL HNO ₃ , 4 min, C/ dedo frio)	501,69 ± 5,37	31,52 ± 2,03
2 (5 mL HNO ₃ , 4 min, S/ dedo frio)	495,56 ± 7,29	50,37 ± 3,84
3 (5 mL HNO ₃ , 7 min, C/ dedo frio)	496,34 ± 7,44	27,54 ± 2,18
4 (5 mL HNO ₃ , 7 min, S/ dedo frio)	414,64 ± 9,28	38,40 ± 0,57
5 (8 mL HNO ₃ , 4 min, C/ dedo frio)	457,31 ± 10,33	39,05 ± 5,14
6 (8 mL HNO ₃ , 4 min, S/ dedo frio)	429,43 ± 3,38	30,77 ± 1,53
7 (8 mL HNO ₃ , 7 min, C/ dedo frio)	306,79 ± 13,78	28,12 ± 1,65
8 (8 mL HNO ₃ , 7 min, S/ dedo frio)	389,61 ± 3,53	18,23 ± 2,37

5.5 Otimização do procedimento proposto para análise multielementar em amostras derivadas de soja

Os resultados do planejamento fatorial 2^3 proposto na Tabela 2 para extração dos elementos Cu, Fe, Zn, Mn, K, P, Mg e Ca podem ser visualizados na Tabela 10. O uso do planejamento fatorial permitiu estudar a interação do volume de ácido, tempo de exposição à radiação infravermelha e o uso de um sistema de refluxo. A resposta utilizada para avaliar tais parâmetros é a extração dos elementos analisados.

É possível constatar que para a maioria dos elementos, os maiores valores de extração (%) são obtidos utilizando o sistema sem refluxo. O Cu apresenta-se em menor concentração em todas as amostras. Assim, devido ao seu baixo teor, observa-se maior dispersão nos resultados das análises, ou seja, maiores desvios padrão. Esse fato é verificado na amostra EHS que apresenta altos desvios para esse elemento. A amostra FS apresenta maior heterogeneidade dentre as amostras (constituída das cascas, fibras solúveis e insolúveis do grão de soja) em estudo, em contrapartida, para todos os experimentos realizados, apresenta os menores desvios dentre as amostras, indicando que o uso de 1,0 g de amostra resulta em menores desvios de medidas para essa amostra.

Em geral, o uso do sistema com refluxo e a adição de um volume mínimo de ácido nítrico resulta em menores desvios padrão nos valores obtidos para a análise de ferro em todas as amostras. Vale ressaltar que o sistema com refluxo opera com vedação do frasco, o que diminui o risco de contaminação do meio, e, considerando que o ferro é um dos elementos com maior probabilidade de erros por contaminação, o uso deste sistema pode ser vantajoso neste caso.

Os elementos presentes em baixas concentrações nas amostras, tais como o Cu e o Zn, apresentam menores valores de desvios padrão quando são utilizados maiores volumes de ácido nítrico e o sistema sem refluxo. O sistema com refluxo proporciona o gotejamento do ácido condensado dos vapores em temperaturas bem mais baixas que a mistura reacional, e provavelmente isso pode diminuir a temperatura da mistura reacional, de forma aleatória, ocasionando maior dispersão dos valores obtidos nas extrações dos elementos.

Os elementos Mn, K, P e Mg apresentam variações de desvios padrão não muito significativas entre os sistemas utilizados. A amostra de PTS apresenta concentração de Ca mais alta em comparação com as demais amostras, e também os maiores desvios padrão entre os experimentos são observados para esse elemento. No geral, podemos afirmar que dentre as amostras de alto teor proteico, a PTS apresenta os maiores valores de extração dos elementos com destaque para o Ca, K e P. O EHS e o FS apresentam valores dos elementos semelhantes. Os menores valores de extração dos elementos estudados são da amostra PIS (amostra com maior valor proteico).

Tabela 10- Concentração dos elementos Cu, Fe, Zn, Mn, K, P, Mg e Ca nas amostras de extrato hidrossolúvel de soja (EHS), farinha de soja (FS), proteína texturizada de soja (PTS) e proteína isolada de soja (PIS) submetidas aos experimentos do planejamento fatorial 2³ (Tabela 2). (n=3) e desvio padrão.

Experimento	Amostras	Cu (mg/Kg)	Fe (mg/Kg)	Zn (mg/Kg)	Mn (mg/Kg)	K (g/Kg)	P (g/Kg)	Mg (g/Kg)	Ca (mg/Kg)
1	EHS	4,44 ± 1,06	28,53 ± 1,10	43,96 ± 4,71	10,97 ± 0,25	10,02 ± 0,91	4,74 ± 0,31	1,51 ± 0,19	201,94 ± 3,64
	FS	2,23 ± 0,04	33,90 ± 2,21	43,45 ± 1,10	10,79 ± 0,19	7,18 ± 0,84	4,75 ± 0,17	1,26 ± 0,18	188,01 ± 13,08
	PTS	4,79 ± 0,56	34,74 ± 3,69	49,88 ± 1,88	15,44 ± 0,71	12,09 ± 1,14	5,54 ± 0,51	2,11 ± 0,33	281,98 ± 6,86
	PIS	7,15 ± 0,64	38,55 ± 0,21	27,40 ± 0,29	5,48 ± 0,44	0,90 ± 0,15	5,93 ± 0,18	0,51 ± 0,02	93,78 ± 0,60
2	EHS	3,38 ± 0,17	29,09 ± 1,84	39,63 ± 3,83	12,46 ± 0,72	10,12 ± 0,60	5,31 ± 0,43	1,67 ± 0,17	206,78 ± 13,56
	FS	3,38 ± 0,04	28,00 ± 1,53	44,33 ± 1,36	6,89 ± 0,36	10,16 ± 0,85	4,40 ± 0,47	1,42 ± 0,10	186,59 ± 0,78
	PTS	2,93 ± 0,17	43,44 ± 1,78	46,51 ± 1,98	16,93 ± 0,15	11,86 ± 0,78	6,32 ± 0,12	2,40 ± 0,15	285,14 ± 13,35
	PIS	8,64 ± 0,72	30,42 ± 5,01	27,88 ± 0,18	6,61 ± 0,26	1,00 ± 0,01	7,08 ± 0,48	0,62 ± 0,02	108,41 ± 0,10
3	EHS	3,85 ± 0,93	30,78 ± 0,84	48,38 ± 0,96	11,92 ± 0,25	10,23 ± 0,25	5,36 ± 0,09	1,73 ± 0,04	213,62 ± 5,53
	FS	2,77 ± 0,17	30,40 ± 1,96	45,12 ± 0,98	8,73 ± 0,63	9,83 ± 0,66	4,48 ± 0,31	1,40 ± 0,14	199,72 ± 12,86
	PTS	4,52 ± 0,66	39,88 ± 0,39	46,37 ± 2,69	16,88 ± 1,11	12,17 ± 0,11	5,46 ± 0,35	2,34 ± 0,02	266,69 ± 7,64
	PIS	8,64 ± 0,42	37,70 ± 1,58	30,47 ± 1,78	6,29 ± 0,36	0,88 ± 0,01	6,69 ± 0,22	0,59 ± 0,07	104,41 ± 6,53
4	EHS	4,55 ± 1,23	33,59 ± 6,10	36,19 ± 0,64	12,76 ± 0,40	11,43 ± 1,17	5,78 ± 0,20	1,87 ± 0,11	235,93 ± 9,70
	FS	2,81 ± 0,22	26,40 ± 0,99	42,70 ± 2,70	7,06 ± 0,60	10,79 ± 0,87	4,80 ± 0,32	1,54 ± 0,13	196,75 ± 14,07
	PTS	4,91 ± 0,21	41,97 ± 5,16	42,62 ± 3,11	16,76 ± 2,27	13,28 ± 0,51	6,02 ± 0,45	2,42 ± 0,21	287,61 ± 24,57
	PIS	8,32 ± 0,20	43,95 ± 3,08	29,22 ± 0,66	7,19 ± 0,07	2,37 ± 0,24	7,38 ± 0,12	0,66 ± 0,08	120,48 ± 5,97
5	EHS	3,32 ± 0,08	25,60 ± 2,66	47,35 ± 0,60	10,36 ± 0,78	9,09 ± 0,62	4,75 ± 0,27	1,53 ± 0,09	188,18 ± 7,97
	FS	1,78 ± 0,15	25,93 ± 1,99	43,27 ± 3,45	7,35 ± 0,30	8,84 ± 0,21	3,85 ± 0,13	1,23 ± 0,08	161,45 ± 0,55
	PTS	3,92 ± 0,11	34,85 ± 1,39	51,17 ± 0,61	15,87 ± 0,60	11,50 ± 0,56	5,11 ± 0,44	2,08 ± 0,28	232,40 ± 3,58
	PIS	6,94 ± 0,28	22,78 ± 0,89	30,76 ± 3,27	4,37 ± 0,35	2,54 ± 0,25	5,51 ± 0,09	0,56 ± 0,12	105,38 ± 3,12
6	EHS	2,75 ± 0,96	24,28 ± 0,12	52,29 ± 4,45	10,44 ± 0,26	9,38 ± 0,35	5,03 ± 0,44	1,63 ± 0,11	191,17 ± 8,90
	FS	1,51 ± 0,11	37,80 ± 3,43	45,93 ± 1,50	7,97 ± 0,99	9,08 ± 0,81	4,92 ± 0,40	1,41 ± 0,18	198,52 ± 16,68
	PTS	2,46 ± 0,70	51,19 ± 3,28	51,84 ± 6,47	16,90 ± 1,63	10,62 ± 1,49	5,70 ± 0,62	2,29 ± 0,22	295,40 ± 7,59
	PIS	7,30 ± 0,10	39,45 ± 0,78	29,99 ± 0,72	5,15 ± 0,36	1,07 ± 0,40	5,83 ± 0,07	0,59 ± 0,01	97,01 ± 4,07
7	EHS	5,83 ± 0,88	23,97 ± 0,12	43,32 ± 2,87	8,55 ± 0,55	9,40 ± 0,40	4,27 ± 0,15	1,47 ± 0,01	180,12 ± 13,89
	FS	2,62 ± 0,08	28,66 ± 2,36	42,61 ± 2,34	6,95 ± 0,39	9,45 ± 0,10	4,05 ± 0,27	1,33 ± 0,15	179,49 ± 2,05
	PTS	4,19 ± 0,20	26,15 ± 2,81	45,99 ± 1,99	13,92 ± 1,38	11,09 ± 0,72	4,83 ± 0,22	2,17 ± 0,04	234,66 ± 0,39
	PIS	8,20 ± 0,58	28,14 ± 1,76	32,61 ± 1,17	4,67 ± 0,05	0,81 ± 0,03	5,94 ± 0,29	0,52 ± 0,03	91,21 ± 3,07
8	EHS	4,43 ± 0,31	24,67 ± 3,02	39,35 ± 2,49	10,92 ± 0,23	10,96 ± 0,86	5,06 ± 0,26	1,52 ± 0,10	210,10 ± 11,79
	FS	2,21 ± 0,55	36,73 ± 5,36	43,56 ± 1,43	7,92 ± 0,73	10,35 ± 0,61	4,70 ± 0,35	1,54 ± 0,07	187,69 ± 12,86
	PTS	2,99 ± 0,33	52,35 ± 0,76	47,12 ± 1,16	16,54 ± 0,12	11,85 ± 0,20	6,37 ± 0,31	2,53 ± 0,13	295,96 ± 5,55
	PIS	8,17 ± 0,63	25,15 ± 4,11	31,08 ± 1,61	5,40 ± 0,29	1,16 ± 0,27	6,63 ± 0,51	0,57 ± 0,01	105,86 ± 4,46

Para análise individual dos efeitos e das interações das variáveis em cada amostra utilizou-se gráficos de superfície de resposta (Figuras 7, 8, 9 e 10) que foram plotados usando a função desejabilidade. Os resultados obtidos das superfícies de resposta como pontos máximos (maiores valores de extração dos elementos) foram escolhidos com a ressalva de sempre avaliar as condições químicas do sistema. Entretanto, considerando-se que uma das variáveis do sistema é qualitativa (uso do dedo frio – refluxo), deve-se analisar os gráficos observando as extremidades (+1 e -1) para esta variável.

5.5.1 Extrato hidrossolúvel de soja (EHS)

As Figuras 9, 10 e 11 apresentam os gráficos das superfícies de resposta plotados a partir da função desejabilidade. A partir da Tabela 10 é possível observar que Fe, Mg e Ca são os elementos que sofrem maior influência da variação do volume de ácido nítrico. Sendo assim, nota-se que o uso de maiores volumes de ácido resulta em um efeito positivo na extração desses elementos. Em contrapartida, o aumento do tempo tem um efeito negativo na extração do Fe, K e Mg (Figura 10, Tabela 10).

O uso do sistema de refluxo gera efeito positivo nas respostas para quase todos os elementos dessa amostra, apenas com um leve efeito negativo para Fe, Mg e no K. Fato também observado na figura 8 na qual pode-se observar que o uso do dedo frio (extremidade +1) com maiores volumes de ácido apresenta um valor de desejabilidade superior a 0,6, indicando que, o uso do sistema com refluxo aliado a maiores volumes de ácido promove melhores extrações dos elementos nessa matriz. Isto pode ser explicado pelo fato da recirculação de ácido tornar o meio reacional mais reativo facilitando a extração dos elementos estudados.

De forma comparativa, a Figura 10 relaciona o tempo de exposição à radiação com o volume de ácido nítrico para o sistema sem refluxo. Em geral, é observado que em menores tempos de aquecimento e maiores volumes de ácido obtém-se a melhor região da superfície de resposta, na extremidade direita do gráfico, indicando que o planejamento fatorial, ou o domínio experimental poderia ser expandido para obtenção de um ponto de máximo no gráfico. Mesmo assim, pode-se considerar a região de maior desejabilidade (0,7) como ótima.

Na Figura 9 leva em consideração os efeitos das variáveis tempo e uso de refluxo (dedo frio). Pode-se observar que independente do refluxo de ácido, em menores tempos de exposição à radiação infravermelha temos uma melhora na extração dos elementos, o que é interessante no preparo de amostras que busca metodologias rápidas.

Sendo assim, com a análise dos gráficos, conclui-se que o uso de maiores volumes de ácido nítrico e menores tempos de aquecimento, para a amostra do extrato hidrossolúvel de soja, resulta em melhores resultados para a extração dos elementos escolhidos para análise. O uso do sistema em refluxo pode ser descartado, neste caso, pois apresenta resultados de desejabilidade semelhantes. E ainda, o uso do sistema sem refluxo possuiu como vantagem a obtenção de resultados mais precisos, ou seja, com baixos desvios padrão, sendo, portanto, escolhido como melhor condição para extração dos elementos nessa amostra.

Vale ressaltar que, como foi estudado anteriormente, para essa amostra (EHS), o sistema com refluxo apresentou valores de carbono solubilizado e de resíduo semelhantes ao sistema que opera sem o uso do dedo frio, porém na extração elementar o sistema de refluxo obteve menor eficiência. A recirculação dos vapores ácidos não aumentou a extração dos analitos para essa amostra.

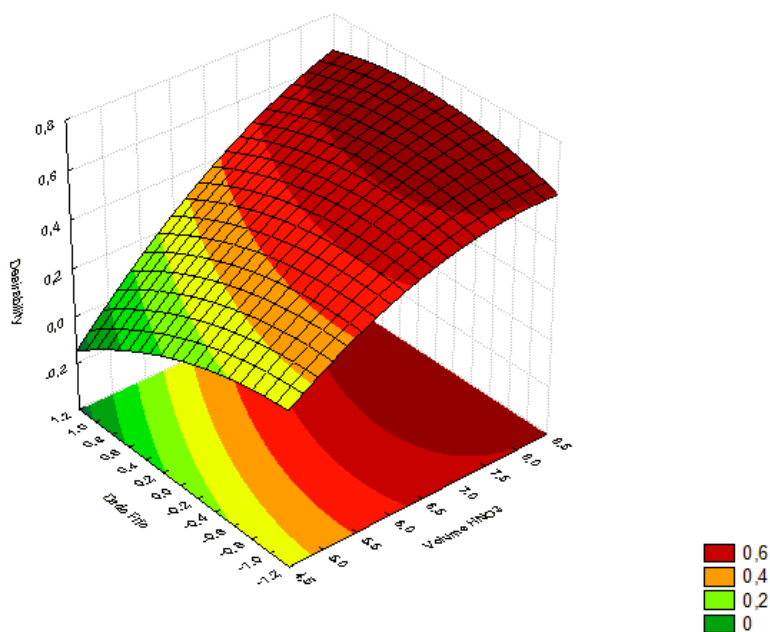


Figura 9- Gráficos de superfície de resposta para a amostra EHS (extrato hidrossolúvel de soja):desejabilidade em função do uso do dedo frio e do volume de ácido nítrico

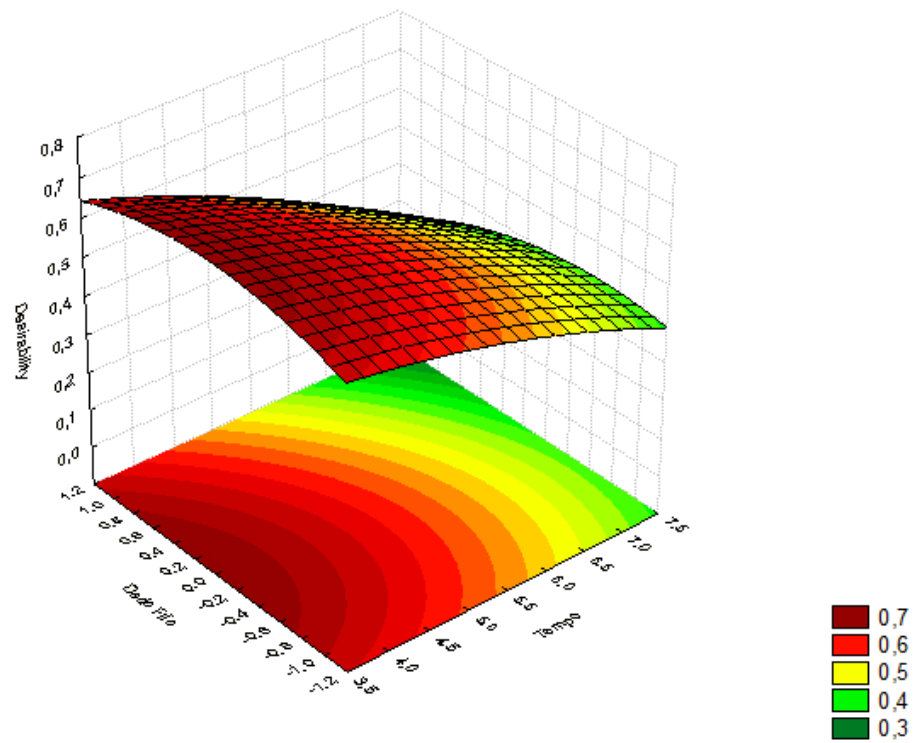


Figura 10- Gráficos de superfície de resposta para a amostra EHS (extrato hidrossolúvel de soja): desejabilidade em função do uso do dedo frio e da variação do tempo.

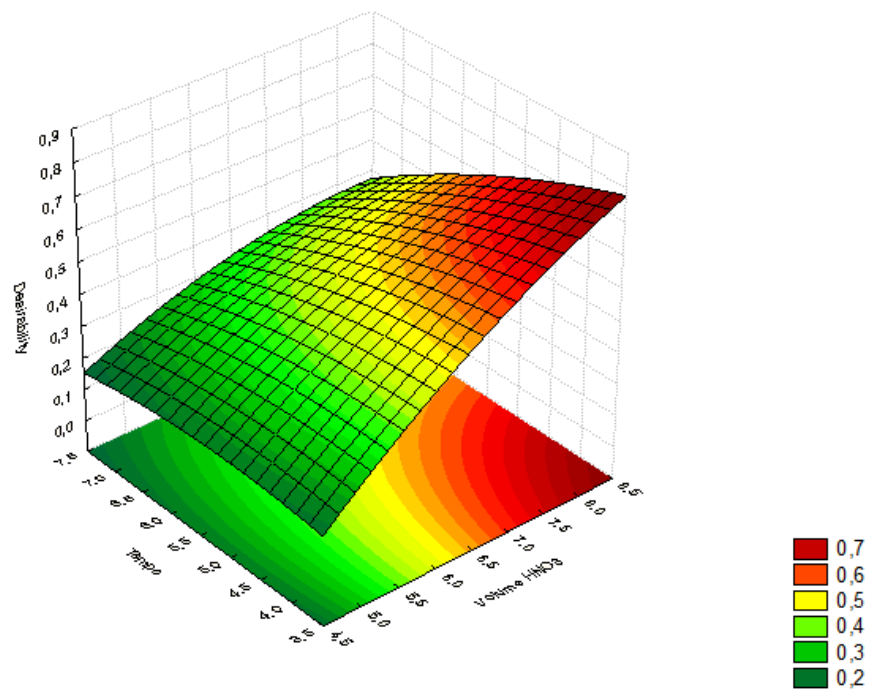


Figura 11- Gráficos de superfície de resposta para a amostra EHS (extrato hidrossolúvel de soja): desejabilidade em função do tempo e do volume de ácido no sistema sem dedo frio.

5.5.2 Farinha de soja (FS)

Os gráficos referentes as condições de extração dos elementos estão plotados como superfícies de resposta nas Figuras 12, 13 e 14. Na Figura 12 é observado que o uso do dedo frio (refluxo) e um menor volume de ácido resulta em um valor de desejabilidade próximo de 0 (o que é indesejável). Em contrapartida, verifica-se que o uso do sistema em refluxo com maiores volumes de ácido, e o uso do sistema sem refluxo com menores volumes de ácido, resultam em desejabilidades superiores a 0,6. Conforme discutido anteriormente, o sistema em refluxo diminui a temperatura da mistura reacional pois o vapor do ácido gerado se condensa durante o procedimento de extração e as gotas de ácido resfriadas diminuem a temperatura do meio reacional, sendo que este efeito é mais significativo quando se trabalha em menores volumes de ácido. Assim, o resfriamento do meio reacional resulta em menores extrações dos elementos em estudo para a amostra de farinha de soja, por este motivo temos baixa desejabilidade.

Analisando a Figura 13 que relaciona a variação do tempo de exposição à radiação e o uso de refluxo, verifica-se que a região máxima de superfície de resposta acontece com o uso de refluxo (+1) e menor tempo de aquecimento.

Observa-se que menores tempos de aquecimento e maiores volumes de ácido tem efeito positivo na extração dos elementos. Este gráfico (Figura 12), por possuir região de máximo próximo as extremidades, nos leva a acreditar que aumentando o domínio experimental, ou seja, utilizando-se maiores volumes de ácido, poderíamos obter o ponto de máximo para essa amostra. Entretanto, considerando aspectos práticos, o uso de maiores volumes de ácido pode acarretar maiores valores de brancos, e além da necessidade de maiores diluições das soluções finais.

Conclui-se que para análise simultânea e multielementar na amostra de farinha de soja as condições otimizadas são: o uso do sistema com refluxo, maiores volumes de ácido e menores tempos de aquecimento. A recirculação de ácido (com gotejamento frio) não apresenta efeito significativo na extração dos elementos da farinha de soja em tempo menor de exposição à radiação infravermelha. Porém,

mesmo com essa vantagem sobre o sistema sem refluxo, ambos apresentaram próximas eficiências na extração

Em um estudo comparativo entre a extração elementar e a digestão parcial dessa amostra observa-se que o uso de um sistema de refluxo resultou menores valores de carbono solubilizado nas soluções dos digeridos e menores valores de resíduos e que o uso do dedo frio resultou em uma melhor eficiência na extração do analitos. Sendo assim, a recirculação dos vapores ácidos gerou melhores digestões parciais e eficácia na extração elementar. Devido a técnica de detecção utilizada nesse trabalho é interessante trabalhar com menores teores de carbono residual.

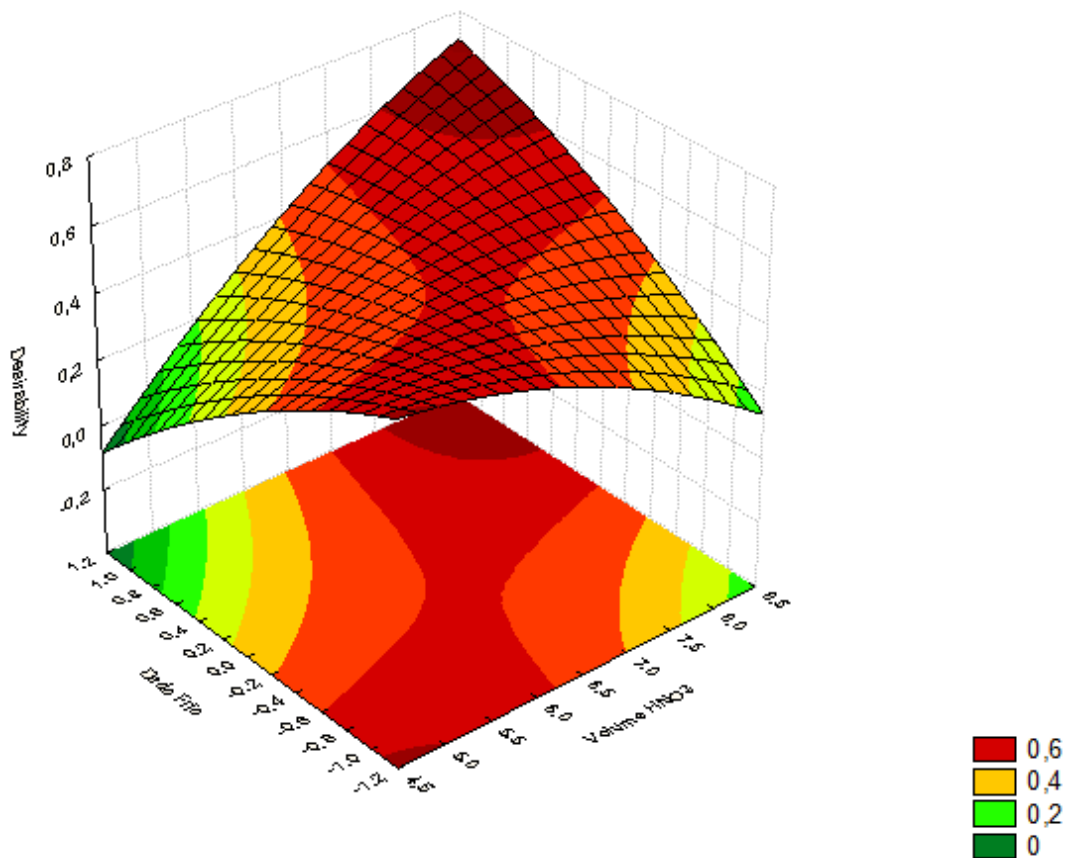


Figura 12- Gráfico de superfície de resposta para a amostra FS (farinha de soja): desejabilidade em função do uso do dedo frio e do volume de ácido nítrico.

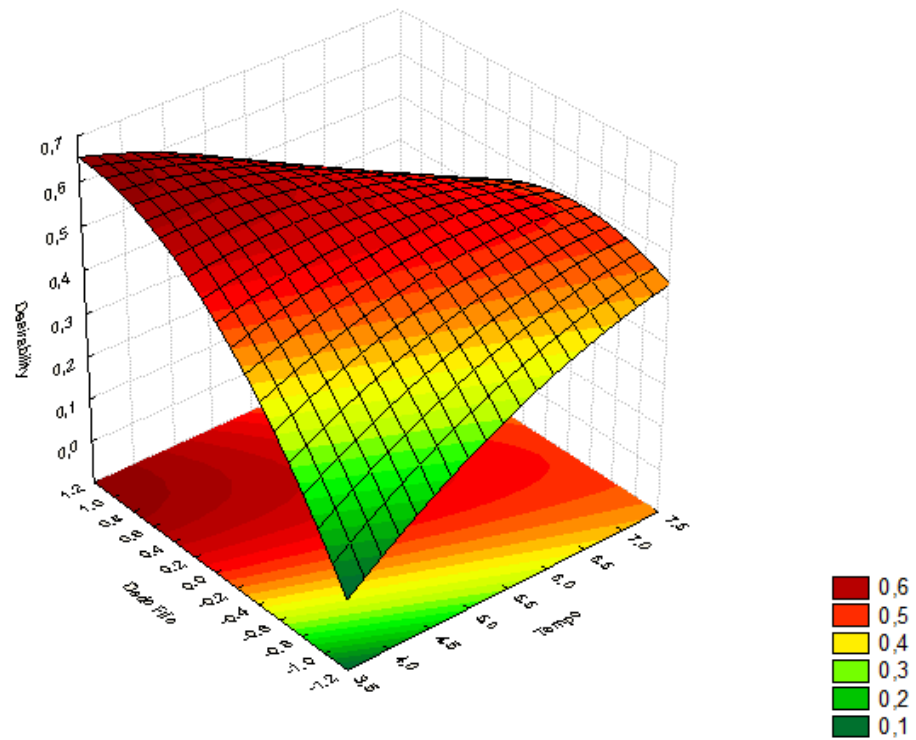


Figura 13- Gráfico de superfície de resposta para a amostra FS (farinha de soja): desejabilidade em função do uso do dedo frio e da variação do tempo.

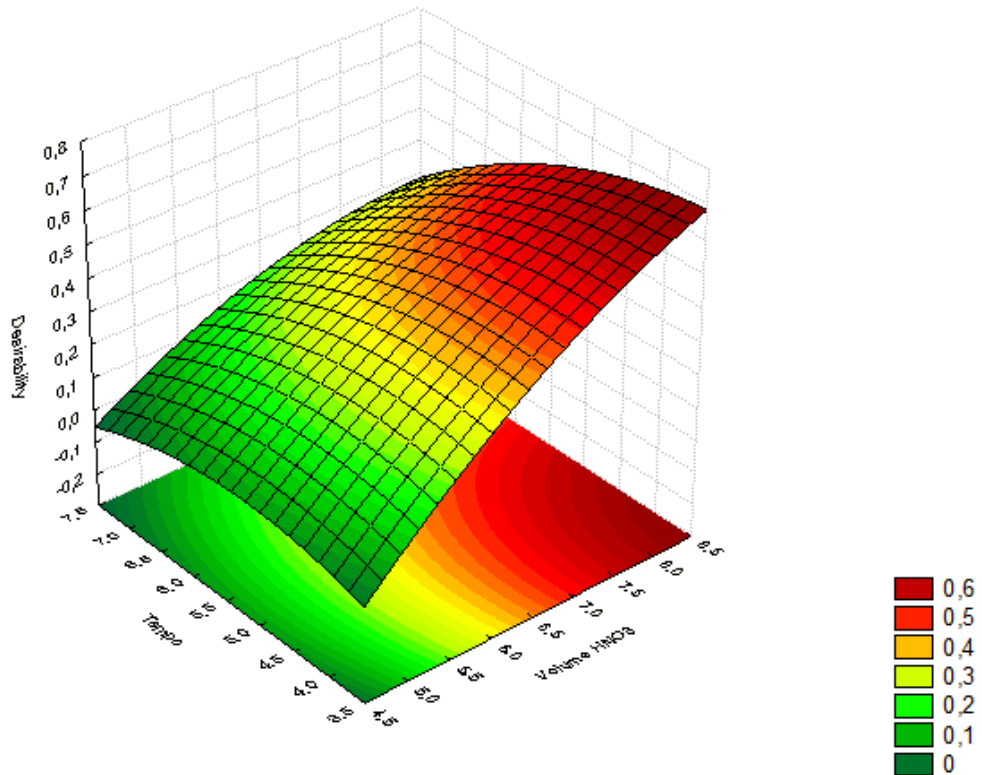


Figura 14 - Gráfico de superfície de resposta para a amostra FS (farinha de soja): desejabilidade em função do tempo e do volume de ácido no sistema sem dedo frio.

5.5.3 Proteína texturizada de soja (PTS)

Os gráficos das superfícies de resposta plotados a partir da função desejabilidade e a variação da extração dos elementos, de acordo com cada fator estudado para a amostra PTS podem ser observados nas Figuras 15, 16 e 17. Analisando a Tabela 10 é possível observar que as extrações dos elementos Zn e K foram as mais afetadas, de acordo com as variações dos fatores neste estudo. Enquanto o aumento do volume de ácido nítrico tem efeito positivo na extração do K, este aumento gera um efeito negativo na extração do Zn. De forma semelhante, o aumento do tempo melhora a extração do Zn e diminui a extração do K.

Observando o gráfico de superfície de resposta da Figura 15 pode-se afirmar que, utilizando o dedo frio (refluxo) e menores volumes de ácido nítrico resulta em um valor de desejabilidade próximo a 0 (indesejável). Este resultado é semelhante ao obtido na Figura 8 para a amostra FS, isto porque, o sistema em refluxo diminui a temperatura da mistura reacional por gotejamento de ácido frio, sendo mais significativo quando se trabalha em menores volumes de ácido. Nota-se que, trabalhando com maiores volumes de ácido pode-se alcançar uma região de máximo do gráfico de superfície de resposta. Vale observar que para o sistema sem refluxo, valores máximos em toda a região de variação do volume são encontrados, isto sugere a possibilidade de se trabalhar com menores volumes de ácido nessa amostra, sem o uso do sistema de refluxo.

Quando observamos as Figuras 16 e 17 verificamos que o uso de dedo frio é extremamente negativo durante a variação do tempo. No caso do sistema sem refluxo, menores tempos geram máximo positivo como resposta. Uma análise detalhada da Figura 8 (c) indica uma região entre 5 – 6,5 mL de ácido nítrico e tempo entre 4 – 5,5 minutos de aquecimento, sem refluxo, como melhores condições para a máxima extração dos elementos na amostra PTS. Portanto, conclui-se que para essa amostra o sistema sem refluxo apresenta melhores resultados para a extração multielementar e, apesar de, o sistema com refluxo apresentar menores valores de carbono solubilizado e de resíduo que o sistema que opera sem o uso do dedo frio, na extração elementar o sistema sem refluxo apresenta a melhor eficiência. A recirculação dos vapores ácidos apesar de gerar uma melhor digestão parcial da amostra, não aumentou a eficiência de extração dos analitos.

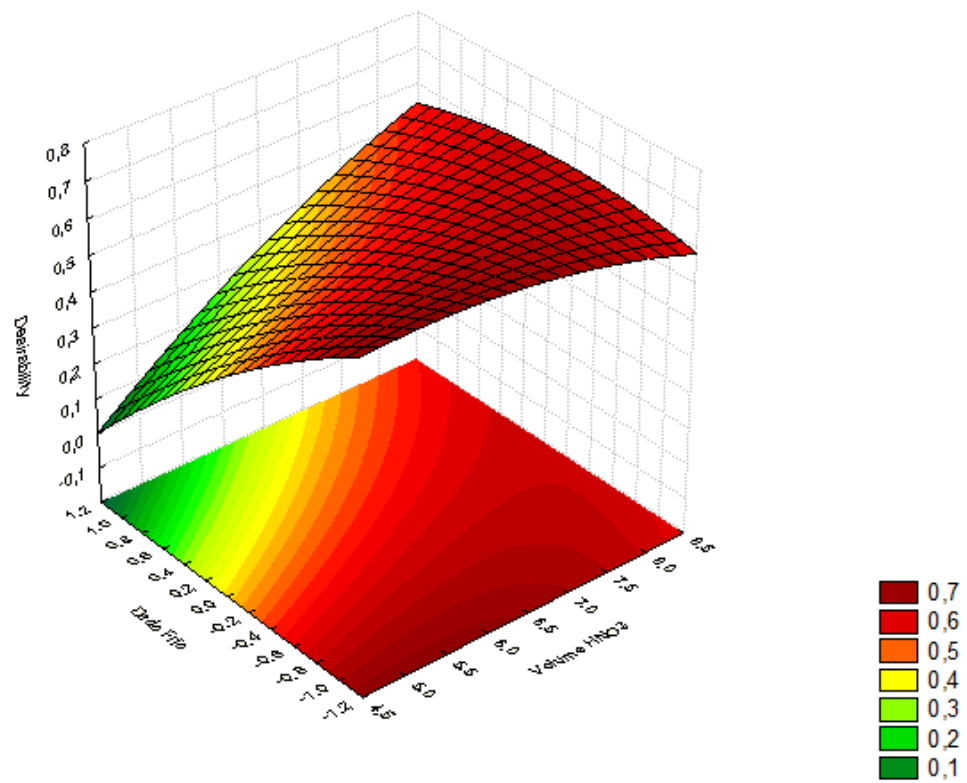


Figura 15- Gráficos de superfície de resposta para a amostra PTS (proteína texturizada de soja: desejabilidade em função do uso do dedo frio e do volume de ácido nítrico.

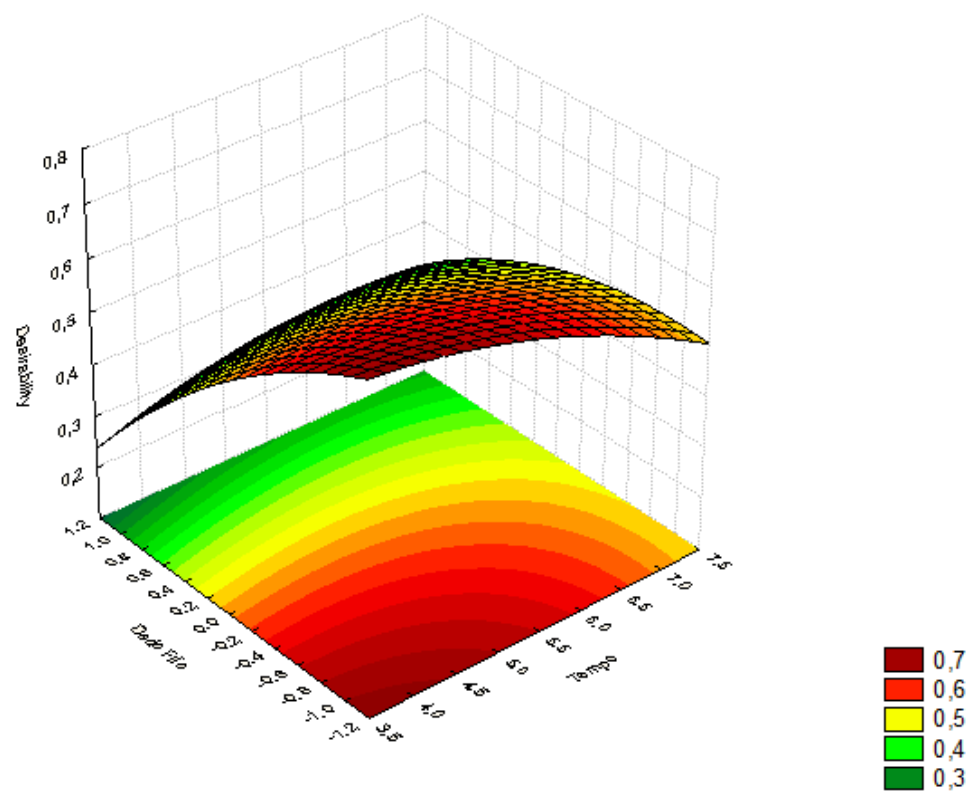


Figura 16 -Gráficos de superfície de resposta para a amostra PTS (proteína texturizada de soja: desejabilidade em função do uso do dedo frio e da variação do tempo.

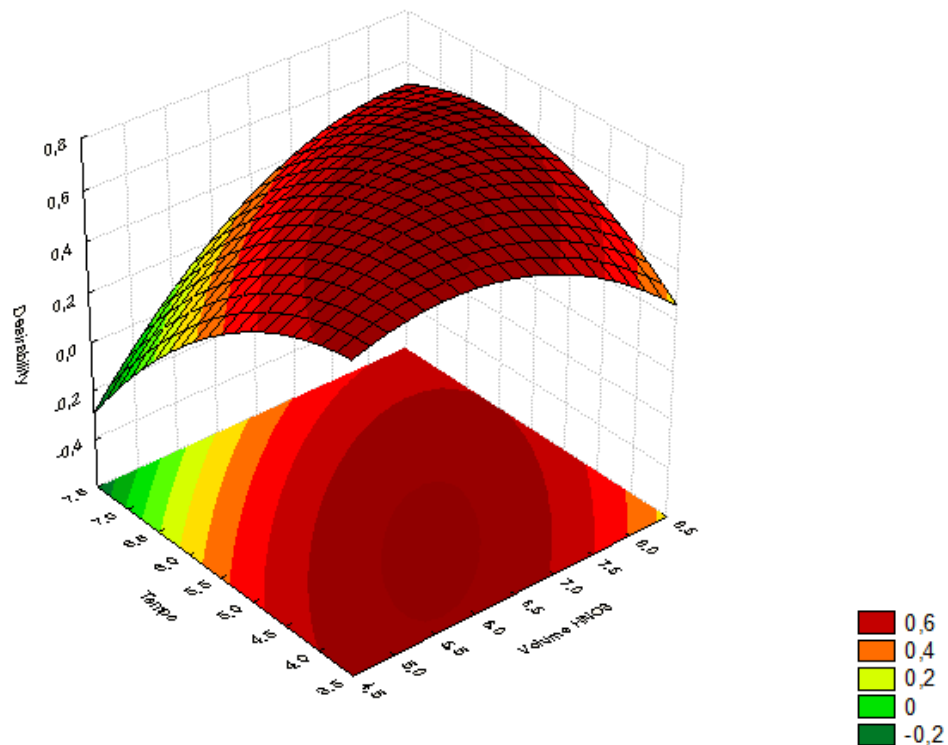


Figura 17-Gráficos de superfície de resposta para a amostra PTS (proteína texturizada de soja: desejabilidade em função do tempo e do volume de ácido no sistema sem dedo frio.

5.5.4 Proteína isolada de soja (PIS)

Nas Figuras 18, 19 e 20 são mostrados os gráficos da amostra PIS referentes às superfícies de resposta e variação de extração dos elementos conforme os intervalos estudados de cada fator. Os gráficos das Figuras 18 e 19 mostram que o refluxo de ácido teve efeito negativo na superfície de resposta. E ainda, percebe-se uma sutil melhora na desejabilidade com o aumento do volume de ácido nítrico, contudo os resultados de desejabilidade continuam inferiores a 0,5. Para essa amostra, o sistema sem refluxo apresenta melhores resultados.

O gráfico da Figura 20 detalha melhor o efeito do tempo de aquecimento e do volume de ácido para o sistema sem refluxo. Resultados mais positivos são obtidos quando trabalha-se com menores tempos de aquecimento e maiores volumes de ácido. Novamente as regiões de máximo estão na extremidade indicando necessidade de expandir os valores de máximo e mínimo do planejamento fatorial. Entretanto, no sistema proposto nesse trabalho não é possível trabalhar com menores tempo de exposição, pois conforme explicado anteriormente, não ocorre

homogeneização da mistura. O sistema sem refluxo nessa amostra resulta em valor de desejabilidade em torno de 1,0 (valor ideal). Comparando a eficiência de digestão parcial dessa amostra com a extração multielementar, o sistema com refluxo foi extremamente ineficaz.

Em uma análise geral, pode-se concluir que o sistema sem refluxo é mais vantajoso para as amostras com alto teor de proteínas e baixo teor de gordura (PTS E PIS). Em contrapartida, para essas amostras o sistema com refluxo resulta em menores valores de carbono solubilizado e de resíduo (com destaque para a amostra PIS que em ambos os sistemas possuiu altos valores de carbono solubilizado). Dessa forma, conclui-se que não é necessária uma completa solubilização das amostras para se conseguir extrair maiores teores dos elementos inorgânicos em estudo. A amostras FS e EHS apresentam extrações semelhantes com ou sem o uso do refluxo para os elementos analisados nesse trabalho.

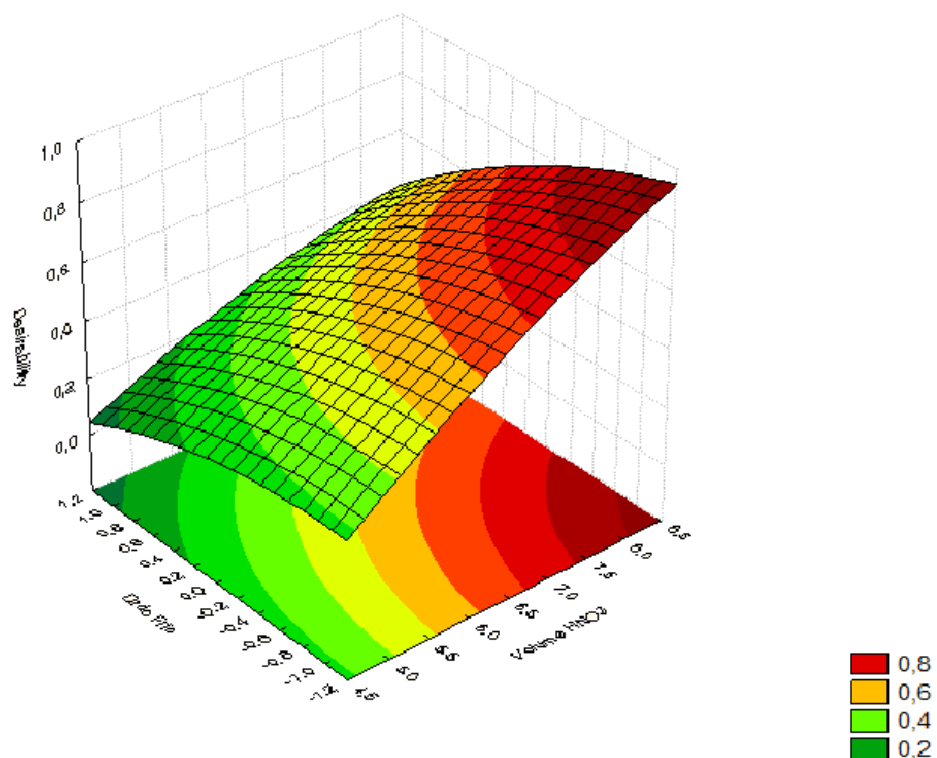


Figura 18 - Gráfico de superfície de resposta para a amostra PIS (proteína isolada de soja): desejabilidade em função do uso do dedo frio e do volume de ácido nítrico.

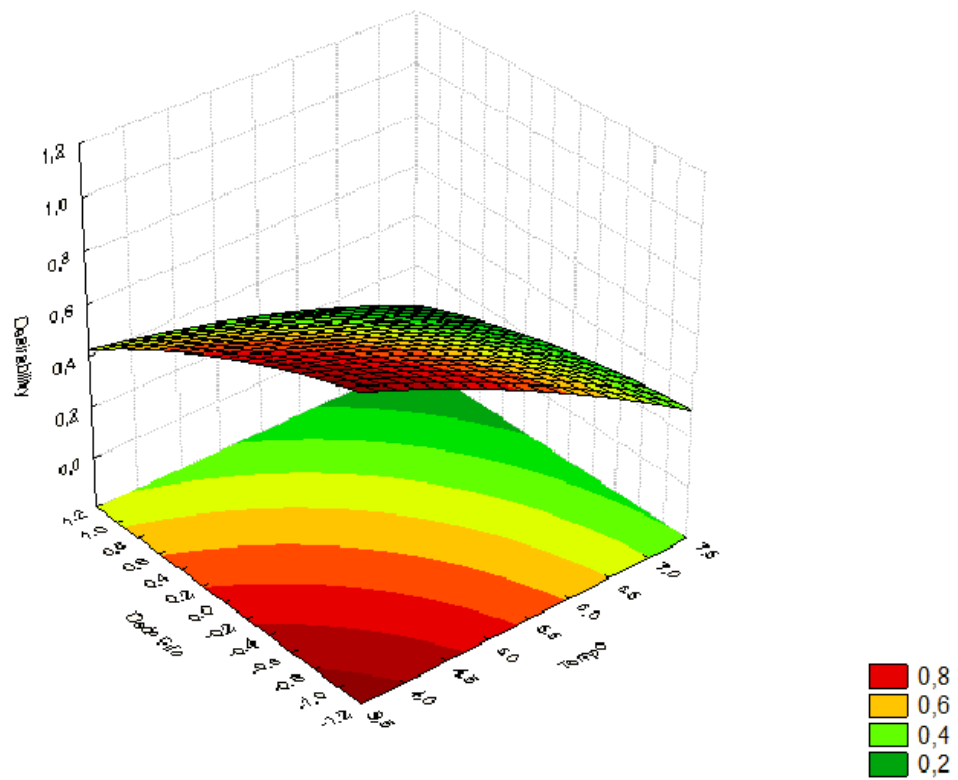


Figura 19 - Gráfico de superfície de resposta para a amostra PIS (proteína isolada de soja):
desejabilidade em função do uso do dedo frio e da variação do tempo.

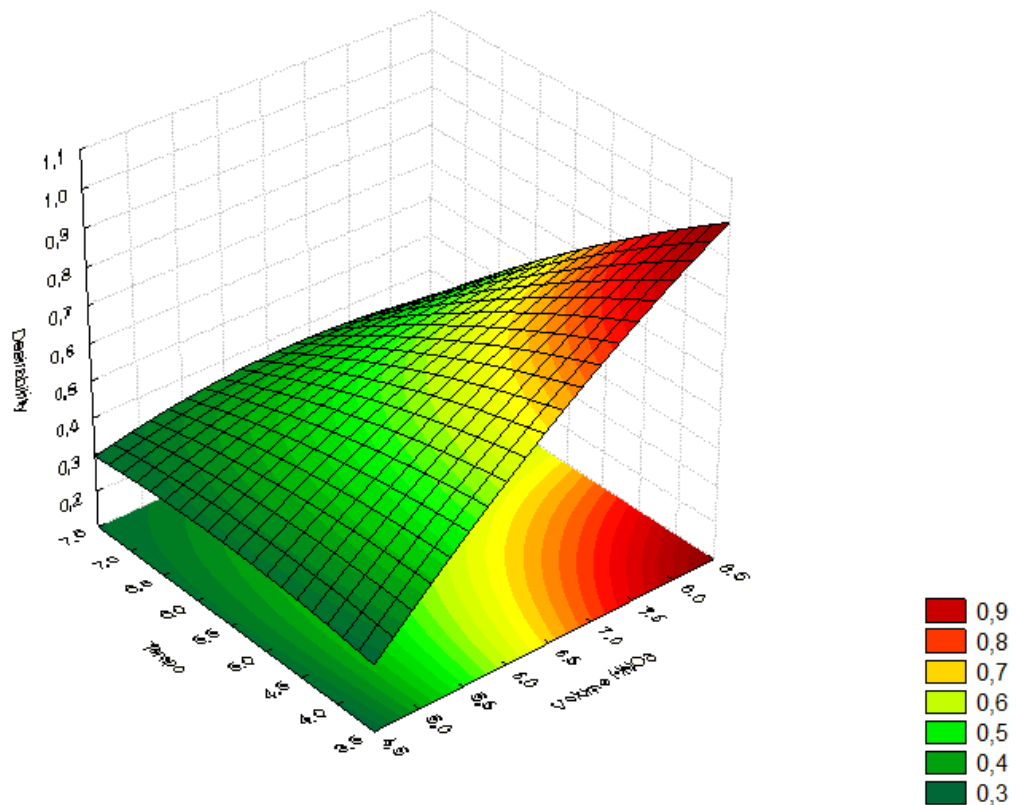


Figura 20 - Gráfico de superfície de resposta para a amostra PIS (proteína isolada de soja):
desejabilidade em função do tempo e do volume de ácido no sistema sem dedo frio.

5.5.5 Condições ótimas do método proposto

Considerando os parâmetros investigados, o procedimento proposto para a determinação multielementar em amostras derivadas de soja em grãos, pode ser descrito como segue: para uma massa de cerca de 1,00 g de amostra, adiciona-se 8,0 mL de HNO₃ 65% (m m⁻¹) em seguida a mistura é levada para aquecimento no sistema (IR), com tempo de exposição à radiação infravermelha de 5 min. Os resultados dessas condições experimentais, para as amostras derivadas de soja podem ser visualizados na Tabela 11.

Tabela 11- Concentrações (mg kg⁻¹) dos elementos Cu, Fe, Zn, Mn, K, P, Mg e Ca nas amostras de extrato hidrossolúvel de soja (EHS), farinha de soja (FS), proteína texturizada de soja (PTS) e proteína isolada de soja (PIS) nas condições experimentais otimizadas. Valores médios (n=3) e desvio padrão.

Elementos	EHS	FS	PTS	PIS
Cu	8,07 ± 0,49	6,83 ± 0,42	9,73 ± 0,39	12,1 ± 0,6
Fe	21,5 ± 1,6	26,4 ± 1,4	36,9 ± 2,8	30 ± 0,4
Mn	13,0 ± 0,8	8,3 ± 0,5	19,6 ± 0,9	5,2 ± 0,3
Zn	35,9 ± 0,5	37,41 ± 0,6	44,9 ± 0,7	26,5 ± 0,3
K	21,4 ± 0,7	20,2 ± 1,8	27,3 ± 1,6	4,61 ± 0,47
P	3852 ± 60	3374 ± 143	4781 ± 242	5081 ± 205
Mg	1473 ± 34	1289 ± 57	2081 ± 55	563 ± 25
Ca	2986 ± 92	1066 ± 36	1832 ± 78	474 ± 14

As concentrações médias obtidas para os analitos estudados considerando as 4 amostras analisadas em mg kg⁻¹ foram: Cu (6,83 – 12,1), Fe (21,5 – 36,9), Zn (26,5 – 44,9), Mn (5,15 – 19,6), K (4,61 – 27,3), P (3374 – 5081), Mg (563 – 2081), Ca (475 – 2986). A amostra do extrato hidrossolúvel de soja (usada em dietas restritivas de leite de vaca) apresentou o maior teor de Ca. A proteína texturizada de soja (“carne de soja”) apresentou maior teor de Fe e de Zn dentre as amostras. A presença de elementos inorgânicos no produto final, considerando as amostras derivadas de soja, depende das condições a que são submetidas durante o cultivo, transporte, armazenamento e/ou durante o processamento industrial.

As concentrações de Cu, Fe, Zn, Ca, P e K em amostras de extrato, farinha, proteína texturizada e isolada de soja, adquiridas em Madrid, Espanha,

foram determinadas por Garcia *et al.* (1998). Para a amostra de extrato de soja, os teores médios de Cu, Fe e Zn obtidos em mg kg^{-1} corresponderam a 6,6; 17,4 e 51,1 respectivamente. Estes valores se apresentaram comparáveis para Cu e Fe nas amostras desse estudo. Para a amostra de farinha de soja, os teores de Cu, Fe e Zn obtidos por estes autores foram 17,6; 42,6 e 50,3 mg kg^{-1} , respectivamente. Estes valores não foram similares para a amostra de farinha de soja avaliada neste estudo. Para a amostra de proteína texturizada de soja, os teores de Cu, Fe e Zn obtidos por Garcia *et al.* (1998) corresponderam a 13,2; 69,8; 43,9 mg kg^{-1} , respectivamente. Estes valores foram similares para Cu e Zn na amostra de proteína texturizada de soja estudada nesse trabalho. Para a amostra de proteína isolada de soja, os teores obtidos pelos autores mencionados de Cu, Fe e Zn foram de 13,2; 69,8 e 43,9 mg kg^{-1} , respectivamente, sendo similar para Cu na amostra de proteína isolada no presente trabalho.

Em um estudo mais recente Barbosa *et al.* (2013) determinaram a concentração de Cu, Fe, Mn e Zn em extrato hidrossolúvel, farinha, proteína de soja e em grãos de soja. As concentrações de Cu, Fe, Mn e Zn na farinha e na soja em grãos foram de 11,1 – 12,1; 56 – 81, 22 – 33,3 e 40 – 39,2 mg kg^{-1} respectivamente. Na farinha de soja estudada neste trabalho foram encontrados em mg kg^{-1} 6,83; 26,42; 8,33; 37,41 respectivamente. Para o extrato de soja os autores determinaram a concentração de Cu, Fe, Mn e Zn como 12,9; 56; 22 e 40 mg kg^{-1} respectivamente. O Cu apresentou valor comparável ao deste trabalho para essa amostra. Para a proteína texturizada de soja os autores encontraram valores em mg kg^{-1} , de Cu, Fe, Mn e Zn de 11,5; 77; 24,4 e 47, respectivamente. Valores comparáveis ao da amostra de proteína texturizada de soja estudada nesse trabalho em relação ao Cu, Mn e Zn.

5.6 Validação do método

5.6.1 Exatidão

A exatidão de um método é o grau de concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como convencionalmente verdadeiro (INMETRO, 2003). Os materiais de referência certificados (CRM) devem, sempre que possível, ser utilizados para validar um método analítico. A Tabela 12 mostra os valores obtidos na análise do material de referência certificado NIST 1568b (*Rice Flour*) após extração no sistema IR com 8 mL de ácido nítrico e 5 minutos de exposição à radiação infravermelha, sem o uso do sistema de refluxo.

Tabela 12 - Concentrações (mg kg^{-1}) dos analitos no material de referência certificado NIST 1568b (*Rice Flour*) após extração no sistema (IR) empregando 8 mL de ácido nítrico e 5 minutos de aquecimento. Valores médios ($n=3$) e desvio padrão.

Elementos	Valor Encontrado (mg kg^{-1})	Valor Certificado (mg kg^{-1})
Cu	2,35 \pm 0,09	2,35 \pm 0,08
Fe	6,52 \pm 0,18	7,42 \pm 0,22
Mn	10,05 \pm 0,33	19,2 \pm 0,09
Zn	19,15 \pm 0,21	19,42 \pm 0,13
K	1248 \pm 0,15	1282 \pm 5,5
P	1194 \pm 0,12	1530 \pm 20
Mg	284,15 \pm 10	559 \pm 5
Ca	106,70 \pm 8,58	118,4 \pm 1,55

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

5.6.2 Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ)

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

Os cálculos do limite de detecção e limite de quantificação para os elementos Cu, Fe, Mn, K, P, Mg e Ca detectados por ICP-OES podem ser efetuados como descrito nas equações (3) e (4):

$$LOD = 3.RSD_{bco}.BEC / 100 \quad (3) \quad \text{e} \quad LOQ = 3.LOD \quad (4)$$

Onde:

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

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

Para o elemento Zn detectado por F AAS o LOD e o LOQ podem ser efetuados como descrito nas equações 5 e 6:

$$LOD=3. \sigma/a \quad (5) \quad \text{e} \quad LOQ=10.\sigma/a \quad (6)$$

Onde:

σ = desvio padrão de 10 medidas consecutivas do branco

a = coeficiente angular médio da curva analítica.

Os valores para LOD e LOQ para os analitos, considerando o procedimento empregando o sistema (IR) são mostrados na Tabelas 13.

Tabela 13 - Estimativa dos limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) nas amostras derivadas de soja.

Elementos	LOD (mg L ⁻¹)	LOQ (mg kg ⁻¹)
Cu	0,0028	0,0084
Fe	0,0091	0,0273
Zn	0,0175	0,0584
Mn	0,1226	0,6810
K	0,2843	0,8529
P	0,2105	0,6315
Mg	0,0263	0,0789
Ca	0,0670	0,2011

5.6.3 Faixa linear de trabalho

A faixa linear de trabalho para os elementos Cu, Fe, Mn, Ca, Mg, K e P considerando detecção por ICP-OES correspondeu a 0,1 a 5,0 mg L⁻¹. Para Zn considerando a detecção por F AAS correspondeu a faixa linear de 0,5 - 2 mg L⁻¹.

5.6.4 Precisão

A precisão é convencionalmente avaliada para cada procedimento analítico considerando as duas formas mais comuns de expressá-las: repetitividade e a reprodutibilidade (INMETRO, 2003). Para a avaliação da precisão do procedimento de extração das amostras do extrato hidrossolúvel, farinha, proteína texturizada e proteína isolada de soja com 8 mL HNO₃ 65% m m⁻¹ no sistema (IR), foi estimada a repetitividade, usando para tanto os coeficientes de variação em percentual (CV%) obtidos para as amostras. Foram observados valores de CV menores que 8,9 % para todos os analitos nas amostras analisadas (Tabela 14). O elemento Mn, mesmo possuindo baixas concentrações nas amostras, apresenta o menores coeficientes de variação em %.

Tabela 14- Valores de CV% para amostras de extrato hidrossolúvel soja (EHS), farinha de soja (FS), proteína texturizada de soja (PTS) e proteína isolada de soja (PIS) com detecção por ICP-OES e F-AAS.

Elementos	EHS	FS	PTS	PIS
Cu	6,05	6,14	3,96	5,22
Fe	7,53	5,11	7,64	1,40
Mn	3,64	0,57	1,46	0,32
Zn	6,15	6,04	4,57	4,97
K	3,38	8,88	5,98	10,18
P	1,55	4,25	5,06	4,03
Mg	2,35	4,44	2,61	4,47
Ca	3,07	3,36	4,27	2,92

6 CONCLUSÃO

No sistema proposto nesse trabalho, foram avaliadas e comparadas a solubilização das amostras por pesagem do resíduo remanescente e análise de carbono residual nos filtrados, bem como a extração dos elementos nas soluções dos filtrados analisadas por ICP-OES e FAAS. Ferramentas quimiométricas de planejamento e otimização possibilitaram um estudo mais detalhado dos efeitos e interações causados pelas variáveis que apresentam influência na extração dos elementos.

O sistema de refluxo apresenta influência significativa na temperatura da mistura reacional dependendo do volume em que se está trabalhando, pois, o dedo frio leva a formação de gotas frias de ácido condensadas durante o processo de extração. Apesar de alguns autores indicarem o uso do dedo frio acoplado ao frasco como sendo uma metodologia eficaz e rápida na decomposição da matéria orgânica em sistemas aquecidos por condução, deve-se levar em consideração o volume total de trabalho da mistura reacional. Deve-se considerar também, que nesses casos, no aquecimento por condução, os frascos são submetidos ao aquecimento por longos períodos de tempo. Os gases gerados são resfriados e gotejados frios novamente na mistura, o que pode ser economicamente viável.

Com uso de planejamentos fatoriais e de ferramentas quimiométricas foi possível otimizar e identificar a faixa de trabalho das variáveis estudadas e da forma como esses fatores afetam o sistema (tanto na digestão parcial das amostras quando na extração dos analitos). O sistema IR permitiu trabalhar com massas de amostra de 1,00 g, obtendo-se boas precisões nas medidas dos procedimentos utilizados para os elementos determinados. A exatidão do método foi confirmada com material de referência certificado NIST 1568b (Rice Flour).

O uso da radiação infravermelha combinado com o uso de maiores massas de amostra é uma alternativa rápida, de baixo custo e eficaz para extração de Ca, Cu, Fe, K e Zn em amostras de derivados de soja.

REFERÊNCIAS

BARBOSA J T, SANTOS C M M, PERELVA V N, FLORES E M, NOBREGA J A, KORN M G, ERICO M M. **Microwave-assisted diluted acid digestion for trace elements analysis of edible soybean products microwave-assisted wet ashing of biological samples.** Food Chemistry, 2015, 212 - 217

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

COELHO, N. M. M.; **Digestão em micro-ondas - uma nova proposta para o tratamento de amostras.** Ciência para o desenvolvimento, 2001. Belo Horizonte. FAEPMIG, 2001.

COSTA, L.M. **Digestão de aluminas e óleos em forno de microondas com cavidade e com radiação focalizada.** 2003. 157 f. Tese (Doutorado em Química) – Referências Bibliográficas 73 Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2003.

DANTAS A. N. S., MATOS W. O., GOUVEIA S. T., LOPES G. S., **The combination of infrared and microwave radiation to quantify trace elements in organic samples by ICP OES,** Talanta, 107 (2013) 292-296.

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

DERRINGER.G, R. SUICH, **Simultaneous optimization of several response variable,** J Qual Technol, 12 (1980) 214-219.

EDMUND.W, RIAZ M. **Soy Protein Products: Processing and use.**The jornal of nutrition. 125: 573S-580S, 1995.

EMBRAPA, **A Soja no Brasil.** Disponível em: <<http://www.cnpso.embrapa.br/producaosoja/SojanoBrasil.htm>>. Acesso em: 06 out. 2015.

EMBRAPA, **Soja na alimentação.** Disponível em:<http://www.cnpso.embrapa.br/soja_alimentacao/index.php?pagina=22>. Acesso em: 04 dez. 2015.

Fellows, P. *Tecnología de 1 Procesado de 10s Alimentos:Principios y Prcicticas.* Acribia S. A., Zaragoza. 1994

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

FERREIRA S L C, JESUS R M, MATOS G D, ANDRADE J B, BRUNS R E, SANTOS W N L, CAVALCANTE D D, VALE M B, DESSUY M G R **Multivariate optimisation and validation of an analytical method for the determination of cadmium in wines employing ETAAS**, J. Brazil. Chem. Soc., 2009, 20(4), 788—794.

FERREIRA S L C, SILVA L O B, SANTANA F A, JUNIOR M M S, FLORES E M M. BARIN J S, PANIZ J N G, MEDEIROS J A, KNAPP G. **Microwave-assisted sample combustion: a technique for sample preparation in trace element determination**, Analytical Chemistry 76 (2004) 3525-3529.
Fresenius J. Anal. Chem., 308: 97, 1981.

SANTOS W N L. **A review of reflux systems using cold finger for sample preparation in the determination of volatile elements**; Microchemical Journal 106 (2013) 307–310.

G1.**Brasil se destaca como maior produtor de soja do mundo**. Globo.com. Fev 2014. Disponível em:<<http://g1.globo.com/matogrosso/agrodebate/noticia/2014/02/brasil-se-destaca-como-o-maior-produtor-de-soja-do-mundo-diz-usda.html>> Acesso em: 1 dez de 2015.

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

GOUVEIA, S T. FATIBELLO-FILHO, J. A. NÓBREGA, **Infra-red Heating as an Alternative Technique for Fast Sample Preparation**, J Braz Chem Soc, 11 (2000) 261-265.

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

GRAS, L.; MORA, J.; TODOLÍ, J. L.; CANALS, A. & HERNANDIS, V. **Desolvation of acid solutions in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry by infrared radiation. Comparison with a system based on microwave radiation** *Spectrochim. Acta Part B*, 54: 1321, 1999.

HARRINGTON E. C, **The desirability function**, Ind Qual Cont, 21 (1965) 494-498.

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

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

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

JOSEPH G. ENDRES, PH. **Soy Protein Products Characteristics, Nutritional Aspects, and Utilization.** The Endres Group, Inc. Fort Wayne, Indiana. 2001.

KERNAD. **INFRAVERMELHO.** Disponível em < <http://infravermelho.info/aplicacoes-do-infravermelho.html>> Acesso em 11 nov de 2015.

KNAPP, G.; RAPTIS, S. E.; KAISER, G.; TÖLG, G.; SCHRAMEL, P. & KRUG, F. J. **Métodos de Preparo de Amostras: Fundamentos sobre métodos de preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar**, Piracicaba: Edição do autor, v. 1, p. 340, 2008.

KRUG, F.J **Workshop Sobre Preparo de Amostra.** São Carlos: UFSCar, 2008.

KUEHNER, J; ALVAREZ, R.; PAUSEN, P. J. & MURPHY, T. J. **Production and analysis of special high-purity acids purified by sub-boiling distillation** *Anal. Chem.*, 44: 2050, 1972.

LLORENT-MARTÍNEZ, M.L. FERNÁNDEZ DE CÓRDOVA, A. RUIZ-MEDINA, P. ORTEGA-BARRALES **Analysis of 20 trace and minor elements in soy and dairy yogurts by ICP-MS** Department of Physical and Analytical Chemistry, Faculty of Experimental Sciences, University of Jaén, Campus Las Lagunillas, E-23071 Jaén, *Spa Microchemical Journal* 102 (2012) 23–27.

LOGERAIS P O, A.BOUTEVILLE **Modelling of an infrared halogen lamp in a rapid thermal system.** *International Journal of Thermal Sciences*. 49 (2010) 1437-1445.

LUNDSTEDT, T. **Experimental design and optimization. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems.** v.42, p.3-40, 1998.

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

MORAIS, A. A. C.; da SILVA, A. L. **Soja: Suas Aplicações.** Editora médica e

científica LTDA (MEDSI), p. 240, 1996.

NANO, R.M.W.BRUNS, R.E.FERREIRA, S.L.C.BACCAN, N.CADORE, S. **Statistical mixture design development of digestion methods for Oyster tissue using inductively coupled plasma optical emission spectrometry for the determination of metallic ions.** Talanta, v.80, p. 559-564, 2009.

NEVES, C. F. C.; SCHVARTZMAN, M. M. A. M.; JORDÃO, E. **Variables search technique applied to gas separation.** Química Nova. v.25, p.327-329, n.2, 2002.

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

NÓBREGA, J.A. TREVIZAN L.C, GEORGIA C.L. ARAUJO, NOGUEIRA A.R; **Focused microwave assisted strategies for sample preparation,** Spectrochimica Acta Part B 57 (2002) 1855-1876.p. 2024-2027, 1988.

ORESTE, A. DE JESUS, R.M. DE OLIVEIRA, M.M. DA SILVA, M.A. VIEIRA, A.S. RIBEIRO, **New design of cold finger for sample preparation in open system: Determination of Hg in biological samples by CV-AAS.** Microchem. J. (2012) Volume 109, July 2013,

PERRY R. H.; GREEN D. **Perry's chemical handbook.** 6. ed. Nova York, EUA: Mc Graw-Hill, 1984.

PINHEIRO A.C.A, LISBOA M.T, RIBEIRO A.S, NUNES A.M, YAMASAKI A. **Avaliação da mineralização de arroz em sistema de refluxo para a determinação de Cu, Fe, Mn e Zn por FAAS.** Quim. Nova, Vol. 37, No. 1, 6-9, 2014

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.

PRATT, K., W.; KINGSTON, H.M.; M^{AC}CREHEN, W., A.; KOCH, W., F.REILLY, C. **Metal contamination of food:its significance for food quality and human health.** Blackwell Science Ltd. Oxford, UK, 3a Ed., 2002.

SCHÖNIGER, W. **Eine mikroanalytische schnellbestimmung Von halogen in organischen substanzen** II Mikrochim. Acta, p 123, 1955.

SCHREIBER, B. **A partially mechanized for the combustion of organic samples**

in a stream of oxygen with quantitative recovery of the trace elements spectrometry *Fresenius J. Anal. Chem.* 357: 22, 1997.

SCHRÖN, W. & MÜLLER, U. **Influence of heated spray chamber desolvation on the detectability in inductively coupled plasma atomic emission Spectrochimica Acta Part B**, v. 62, p. 631 – 640, 2005.

SILVA D. G., JUNIOR, M. M. SILVA, S L. O. B PORTUGAL L. A., MATOS G. D. **Determination of cadmium in rice by electrothermal atomic absorption spectrometry using aluminum as permanent modifier**, *Anal. Methods* 3 (2011) 2495–2500.

SKOOG, D. A., 1918-; HOLLER, F. J.; NIEMAN, TIMOTHY A. **Principles of instrumental analysis**. 5a Ed, Philadelphia: Harcourt Brace College, 1998.

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

TRUCOM, C. **Soja: nutrição e saúde: com receitas práticas e saborosas**. São Paulo: Alaúde, 2005.

VOGEL, A. I. **Química Analítica Qualitativa**. 6ª ed. Ed. LTC, 2002.

WASILEWSKA M, GOESSLER A.W, ZISCHKA M.B, MAICHINC.C.B, KNAPP.G. **Efficiency of oxidation in wet digestion procedures and influence from the residual organic carbon content on selected techniques for determination of trace elements**. *J. Anal. At. Spectrom.*, 2002.

WÜRFELS, M.; JACKWERTH, E. **Residues from biological materials after pressure decomposition with nitric-acid. 1. Carbon conversion during sample decomposition**. *Anal. Chim. Acta*, v.226, p. 1-16, 1989.