



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



LAÍS SILVA GOMES

**Planejamento Doehlert na otimização de procedimento para dissolução de amostras de
leite de soja em hidróxido de tetrametilamônio assistido por energia de ultrassom
visando a determinação de metais por FAAS**

JEQUIÉ - BA
AGOSTO/ 2024

LAÍS SILVA GOMES

Planejamento Doehlert na otimização de procedimento para dissolução de amostras de leite de soja em hidróxido de tetrametilamônio assistido por energia de ultrassom visando a determinação de metais por FAAS

Dissertação (em formato de artigo) apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química.

Área de concentração: Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Marcos de Almeida Bezerra (UESB)

JEQUIÉ - BA

AGOSTO/ 2024

G633p Gomes, Laís Silva.

Planejamento Doehlert na otimização de procedimento para dissolução de amostras de leite de soja em hidróxido de tetrametilamônio assistido por energia de ultrassom visando a determinação de metais por FAAS / Laís Silva Gomes.- Jequié, 2024.
44f.

(Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, sob orientação do Prof. Dr. Marcos de Almeida Bezerra)

1.Leite de soja 2.Extrato de soja 3.Metals 4.Segurança alimentar
5.TMAH 6.Energia de ultrassom 7.FAAS I.Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia II.Título

CDD – 540

Rafaella Cândia Portela de Sousa - CRB 5/1710. Bibliotecária – UESB - Jequié

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB
Recredenciada pelo Decreto Estadual Nº 16.825, de 04.07.2016

Ata da Sessão Pública da defesa de Dissertação do Mestrando em Química, realizada no dia 02 de agosto de 2024.

Às quinze horas do dia dois de agosto de dois mil e vinte e quatro (02.08.2024), realizou-se de forma remota a Sessão Pública da Defesa de Dissertação intitulada **“Planejamento Doehlert na otimização de procedimento para dissolução de amostras de leite de soja em hidróxido de tetrametilamônio assistido por energia de ultrassom visando a determinação de metais por FAAS”**, da mestranda **Laís Silva Gomes**, discente do Programa de Pós-graduação em Química da UESB, área de concentração em Química Analítica, sob orientação do Prof. Dr. Marcos de Almeida Bezerra (UESB). A Banca Examinadora foi composta pelos membros: Prof. Dr. Marcos de Almeida Bezerra (Orientador – UESB), Profª. Drª. Liz Oliveira dos Santos (UFRB/Feira de Santana) e Prof. Dr. Cleber Galvão Novaes (UESB – Jequié). Estiveram presentes professores, alunos e demais convidados do mestrando. Sob a presidência do Prof. Dr. Marcos de Almeida Bezerra (UESB), orientador da mestranda, foi iniciada a Sessão. A Comissão Examinadora arguiu a aluna, após a mesma realizar uma exposição oral sobre a introdução, parte experimental da Dissertação e discussão dos resultados obtidos. Após arguição, os membros examinadores exararam os pareceres, tendo a aluna sido considerada aprovada. Entretanto, para que o respectivo título possa ser concedido com as prerrogativas legais dela advindas, o exemplar definitivo da referida dissertação, revisado e aprovado pelo orientador, deverá ser entregue à secretaria do mestrado em um prazo máximo de trinta dias, qual seja, 02 de setembro de 2024, com as alterações e/ou correções sugeridas pelos membros da banca, para que possa ser homologada pelo Colegiado do Curso. Nada mais havendo a constar foi lavrada a presente Ata que vai assinada pelos presentes. Jequié-BA, 02 de agosto de 2024.

Prof. Dr. Marcos de Almeida Bezerra
(Orientador – UESB/Jequié – BA)

Profª. Drª. Liz Oliveira dos Santos
(UFRB/Feira de Santana)

Prof. Dr. Cleber Galvão Novaes
(UESB/Jequié – BA)

AGRADECIMENTOS

Como posso retribuir ao Senhor toda a sua bondade para comigo? (Salmo 116:12) Dedico cada conquista, cada aprendizado e cada momento de perseverança a Deus, cuja graça infinita tornou tudo possível.

A minha família principalmente meus pais por toda dedicação e sacrifício para que isso se torna-se possível, as minhas irmãs fontes de inspiração, dedicação e exemplo na minha vida. A minha tia Dalva, por todo apoio, amor, preocupação e cuidado.

Ao Professor Marcos Bezerra, que me deu a grande oportunidade de realizar minha pesquisa de mestrado com a sua orientação, dedicação, paciência e muita sabedoria. Minha profunda gratidão por essa oportunidade.

Aos meus colegas de laboratório por todo apoio e contribuição, a Márcio por ter me ajudado a realizar a maioria das leituras das amostras e todos do LQA que de alguma maneira contribuíram neste projeto.

A professora Ana Biggi por todo apoio, ensinamentos e orientações que recebi durante minha graduação e mestrado. Seus ensinamentos foram fundamentais para meu desenvolvimento acadêmico e profissional. Sua dedicação e amor a pesquisa é um exemplo para mim.

A professora Leane Nunes pela oportunidade de realizar o estágio docente em sua disciplina e por sempre me incluir nas atividades realizadas na turma. Muita obrigada, pelo apoio.

A UESB e ao Programa de Pós-Graduação pela oportunidade de ter me formando e feito meu mestrado nesta universidade. A CAPES pelo apoio financeiro para que o projeto de pesquisa fosse desenvolvido.

As minhas amigas de infância Katarine e Nayla, as minhas amigas da escola Teixeira de Freitas: Fernanda, Islane e Jaíne que ao longo dessa vida sempre estiveram presentes.

Estendo meus agradecimentos para todos aqueles que contribuíram e apoiaram de alguma forma na realização deste objetivo.

*“Deus não escolhe os capacitados; Mas ele capacita os escolhidos.
Fazer ou não fazer algo só depende de nossa vontade e perseverança”*

Albert Einstein

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura molecular do TMAH.	15
Figura 2. Gráficos de Valores predito versus valores observados para (a) modelo linear e (b) modelo quadrático	26
Figura 3. Gráficos de resíduos para (a) modelo linear e (b) modelo quadrático	27
Figura 4. Três superfícies de respostas parciais obtidas por ajuste de uma função quadrática aos valores de desejabilidade global	28
Figura 5. Perfis de desejabilidade individuais e desejabilidade global para o modelo quadrático na otimização do procedimento para dissolução da amostra de leite de soja com destaque para os valores ótimos.....	29
Figura 6. Três superfícies de respostas parciais obtidas por ajuste de uma função quadrática aos valores de turbidez	30
Figura 7. Estudo da massa da amostra de leite de soja para (a) Mn (x) e Fe (x) e (b) Zn (x). Condições experimentais: Volume de TMAH: 600 µL, tempo de sonicação: 26 min e temperatura ambiente.	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Matriz de Planejamento Doehlert e respostas obtidas na otimização do procedimento para tratamento de amostra de leite de soja com TMAH e energia de ultrassom.	24
Tabela 2. Parâmetros das curvas analíticas para Fe, Mn e Zn obtidas em meio aquoso de TMAH e por adição padrão às suspensões de leite de soja em TMAH	33
Tabela 3. Resultados dos testes Spike para dois níveis de concentração em uma amostra de leite de soja líquido.	34
Tabela 4. Resultados (mg L^{-1}) para determinação de Fe, Mn e Zn, (N=3) em amostras de leite de soja líquido e comparação de duas metodologias	35
Tabela 5. Resultados (mg Kg^{-1}) para determinação de Fe, Mn e Zn, (N=3) em amostras de extrato de soja pulverizadas.....	35
Tabela 6. Determinação de Mn e Zn (N=3) em uma amostra de material de referência certificada de leite desnatado em pó (ERM-BD150)	36

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FAAS: Espectrometria de absorção atômica com chama (do inglês: Flame atomic absorption spectrometry)

FAES: Espectrometria de emissão atômica na chama (do inglês: Flame atomic emission spectrometry);

GFAAS: Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite (do inglês: Graphite furnace atomic absorption spectrometry);

ICP OES: Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (do inglês: inductively coupled plasma optical emission spectrometry);

ICP-MS: Espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente (do inglês: inductively coupled plasma mass spectrometry);

RSD: Desvio Padrão Relativo (do inglês relative standard deviation);

TMAH: Hidróxido de tetrametilamônio (do inglês: tetramethylammonium hydroxide);

TEAH: Hidróxido de tetraetilamônio (do inglês: tetraethylammonium hydroxide);

TBAH: Hidróxido de tetra-n-butilmônio (do inglês: tetra-n-buthylammonium hydroxide);

TPAH: Hidróxido de tetra-n-propilamônio (do inglês: tetra-n-propylammonium hydroxide)

Planejamento Doehlert na otimização de procedimento para dissolução de amostras de leite de soja em hidróxido de tetrametilamônio assistido por energia de ultrassom visando a determinação de metais por FAAS

Autora: Laís Silva Gomes

Orientador: Prof. Dr. Marcos de Almeida Bezerra

RESUMO:

No presente trabalho desenvolveu-se uma metodologia para determinação de Fe, Mn e Zn por espectrometria de absorção atômica com chama em amostras de leite de soja. A determinação de metais no leite de soja é importante por vários motivos principalmente relacionados à saúde pública, qualidade do produto e conformidade com as normas regulamentares, segurança alimentar, qualidade nutricional e monitoramento de contaminação. As amostras foram tratadas por dissolução com hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) com auxílio de energia de ultrassom. Planejamento Doehlert e função de desejabilidade foram ferramentas aplicadas na otimização multivariada da metodologia das variáveis: tempo de sonicação, volume de TMAH e temperatura durante a dissolução. A metodologia desenvolvida apresentou limites de quantificação de 14,2; 4,7 e 0,73 mg Kg⁻¹, precisão, expressa como repetitividade (%RSD, 2,0 mg L⁻¹, N=10) de 1,5; 1,3 e 0,95% respectivamente para Fe, Mn e Zn. A exatidão foi acessada por teste de adição/recuperação (recuperações na faixa de 93 e 105%), comparação com outro método adotado como padrão (digestão ácida em bloco digestor) e análise de material de referência certificado (Powdered Skimmed Milk, ERM-BD150). A aplicação de teste t e teste t-pareado aos resultados mostraram que o método apresenta exatidão adequada para a determinação dos elementos estudados nas amostras de leite e extrato de soja.

Palavras-chave: Leite de soja, extrato de soja, metais, segurança alimentar, TMAH, energia de ultrassom, FAAS

Doehlert design to optimize a procedure for dissolving soy milk samples in tetramethylammonium hydroxide assisted by ultrasound energy for the determination of metals by FAAS

Author: Laís Silva Gomes

Advisor: Prof. Dr. Marcos de Almeida Bezerra

ABSTRACT:

In the present work, a methodology was developed to determine Fe, Mn and Zn by flame atomic absorption spectrometry in soy milk samples. The determination of metals in soy milk is important for several reasons mainly related to public health, product quality and compliance with regulatory standards, food safety, nutritional quality and contamination monitoring. The samples were treated by dissolution with tetramethylammonium hydroxide (TMAH) using ultrasound energy. Doehlert design and desirability function were tools applied in the multivariate optimization of the methodology of the variables: sonication time, TMAH volume and temperature during dissolution. The methodology developed presented quantification limits of 14.2; 4.7 and 0.73 mg Kg⁻¹, precision, expressed as repeatability (%RSD, 2.0 mg L⁻¹, N=10) of 1.5; 1.3 and 0.95% respectively for Fe, Mn and Zn. Accuracy was assessed by addition/recovery test (recoveries in the range of 93 and 105%), comparison with another method adopted as standard (acid digestion in digester block) and analysis of certified reference material (Powdered Skimmed Milk, ERM-BD150). The application of t-test and paired t-test to the results showed that the method presents adequate accuracy for determining the elements studied in soy milk samples.

Keywords: Soy milk, metals, Doehlert design, TMAH, ultrasound energy, FAAS

APRESENTAÇÃO

Este trabalho de dissertação foi desenvolvido no Laboratório de Química Analítica II da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, *Campus* de Jequié. As análises utilizando a técnica de espectrometria de absorção e emissão atômica na chama (FAAS e FAES) foram realizadas no Laboratório de Química Analítica I coordenado pelo Prof. Valfredo Lemos com auxílio do técnico Márcio José. Este trabalho foi escrito seguindo o formato de Publicação, conforme as orientações constantes no Manual para Elaboração de Dissertações do Programa de Pós-Graduação em Química (PGQUI-UESB). A escrita dos capítulos seguiu as instruções do periódico *Microchemical Journal*, para submissão após as alterações sugeridas pela banca examinadora. O Periódico é enquadrado como estrato A1 na CAPES e Fator de Impacto de 4,9 (JCR 2022).

Link para acesso ao Manual de dissertações do PGQUI:

<http://www2.uesb.br/ppg/ppgquimica/wp-content/uploads/2018/09/Manual-para-elabora%C3%A7%C3%A3o-de-disserta%C3%A7%C3%A3o-Vers%C3%A3o-Final-01.04.pdf>.

SUMÁRIO

Fundamentação teórica	12
1. Introdução	18
2. Parte Experimental	20
2.1. Instrumentação.....	20
2.2. Reagentes e soluções.....	21
2.3. Aquisição das amostras	21
2.4. Otimização do procedimento de tratamento	22
2.5. Procedimento de obtenção de suspensão em TMAH após otimização	22
2.6. Decomposição ácida das amostras de leite de soja em bloco digestor	22
3. Resultados e discussão	23
3.1. Otimização multivariada.....	23
3.2. Estudo da massa da amostra	31
3.3. Avaliação de existência de efeitos de matriz	32
3.4. Características analíticas e aplicação do método	33
4. Conclusões	37
Referências	38

Fundamentação teórica

Os primeiros indícios do aparecimento da soja (*Glycine max (L) Merrill*) foram no continente asiático, há aproximadamente cinco mil anos. A cultura é considerada uma das mais antigas e, durante séculos, mantiveram-se somente neste continente, mas especialmente na China. Expandindo-se entre os séculos XV e XVI, com a chegada de embarcações europeias para o ocidente [1].

A inserção da cultura da soja no Brasil deu-se em meados de 1882, no Estado da Bahia, trazida por Gustavo D'Utra. Anos mais tarde, em 1949 a mesma expandiu-se para o Sul do país, mais precisamente no Rio Grande do Sul, onde houve a intensificação dos estudos de rentabilidade técnica e econômica da cultura pelo Prof. E. Craig e seus alunos da Escola Superior de Agronomia e Veterinária da Universidade Técnica, atual Universidade Federal do Rio Grande do Sul [1].

A expansão da cultura deu-se nas décadas de 1970 e 1980, consolidando-se de forma efetiva nas regiões Sul e Centro-Oeste, tudo isso graças às políticas agrícolas de incentivo, mercado favorável e pelo estabelecimento da cadeia produtiva que propiciou a intensificação de tecnologias de produção associadas ao melhoramento vegetal, bem como das condições do solo, adubação, entre outros fatores relevantes para a expansão da cultura ao longo dos anos [2].

O Brasil é um dos maiores produtores de soja, com produções recordes a cada ano e possui uma área semeada estimada em 38 milhões de hectares da oleaginosa [3]. É a cultura mais explorada em todos os segmentos da atividade agrícola no país, sendo 57% do total da área de grãos. A rápida expansão do cultivo também coloca o Brasil como um dos maiores exportadores mundiais [4].

Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento no levantamento de maio de 2021 o Brasil na safra 2020/2021 teve uma produção de 135,409 milhões de toneladas e uma produtividade de 3.517 kg/ha, se tornando o maior produtor mundial do grão. Por ser uma cultura de expressividade nacional, a soja é considerada uma commodity. Sua cadeia produtiva está integrada a outros setores, buscando o beneficiamento e agregando valor ao grão, transformando-o em alimentação humana, animal, energia, entre outros [5]. A importância econômica da soja deve-se ao fato de ela se constituir de uma fonte considerável de óleo e

proteína, apresentando grande diversidade de usos, tanto agrícola como industrial. A composição da soja contém de 7 a 11% de água, em torno de 32 a 42% de proteína, 28 a 39% de carboidrato e 4 a 5% de cinza (Vieira et al., 2001) [6].

A soja está classificada no grupo das leguminosas e é considerada uma das principais oleaginosas cultivadas no mundo [7]. A soja, com uma composição química diversificada é considerada um alimento completo fornecedor de proteínas, ácidos graxos saturados e insaturados, algumas vitaminas, além de possuir compostos polifenólicos, como as isoflavonas [8].

Sua composição química, com base em 100 g de amostra seca, constitui-se de 40 g de proteínas, 30 g de glicídios, 20 g de lipídios, 226 mg de cálcio, 546 mg de fósforo e 8,8 mg de ferro [9,10]. Além da proteína, a soja fornece ácidos graxos e linolênico [11] e algumas vitaminas, como a B6 (piridoxina) e B12 (cianocobalamina) [12]. Também é uma excelente fonte de minerais como: cobre, ferro, fósforo, potássio, magnésio, manganês, enxofre e cloro, espécies químicas utilizadas para manter o bom funcionamento do organismo.

Do processamento da soja, seus derivados apresentam grande potencial no mercado de alimentos funcionais devido a presença de compostos bioativos como as isoflavonas e que tem sido largamente estudada quanto aos seus efeitos biológicos benéficos à saúde, tais como atividades estrogênica, hipocolesterolêmica e anticarcinogênica [13]. A constatação científica da funcionalidade da soja, além do reconhecimento valor nutricional, aumentou o interesse pelo consumo dos grãos dessa leguminosa [14].

A utilização da soja tem como foco principal a alimentação humana e animal, sendo consumida em diversas formas como a bebida láctea de soja e em forma de grãos [15]. O extrato proteico solúvel, extraído do grão da soja, comumente conhecido como bebida láctea de soja, é um produto de alto valor nutritivo e de fácil elaboração. É uma solução coloidal obtida a partir da extração aquosa resultante da hidratação dos grãos de soja, convenientemente limpos, seguido de processamento tecnológico adequado, adicionado ou não ingredientes opcionais permitidos, podendo ser submetido à desidratação total ou parcial [16,17].

A bebida láctea de soja é conhecida por ser uma excelente fonte proteica, sendo uma alternativa para veganos ou pessoas que possuem intolerância à lactose [18]. Assim como nos grãos, encontramos também na bebida láctea de soja as isoflavonas [19,20].

Em geral, para a determinação de elementos inorgânicos os diferentes métodos se baseiam em procedimentos de dissolução ou, decomposição (principalmente da porção orgânica da amostra) e, para isso, empregam-se ácidos ou reagentes alcalinos [21]. A preparação da amostra é uma etapa crítica de uma análise e, apesar de todos os avanços recentes, ainda requer mais desenvolvimento para alcançar os mesmos padrões elevados de todas técnicas instrumentais necessárias para a determinação precisa de analitos [22].

Quase todos os procedimentos de preparação de amostras antigos e novos baseiam-se no uso de ácidos concentrados para promover ataque agressivo, especialmente sob altas temperaturas e pressões quando conduzidas usando reação fechada. Um olhar mais atento à literatura, no entanto, revela que o uso de reagentes alcalinos também levou ao desenvolvimento de procedimentos de preparação de amostras, envolvendo digestões, extrações, ou formação de pastas antes das determinações usando técnicas espectroanalíticas [22].

As Solubilização da amostra em meio alcalino, através da utilização do hidróxido de tetrametilamônio (TMAH), alternativa viável para amostras biológicas com alto teor de proteínas na sua composição, surgiu na década de 70 [23]. O uso de TMAH foi proposto para digestão de tecidos animais. Murthy et al. [24] usou a solução de TMAH aquosa para digestão de fígado de rato, homogeneizados de rim e amostras homogêneas de pelos. Os resultados obtidos para determinações de Cd, Cu, Pb e Zn concordaram com aquelas obtido por digestão ácida convencional usando concentrado ácido nítrico ou uma mistura contendo ácido nítrico e perclórico. O uso de soluções preparadas em 5% v/v HNO_3 não eram adequadas devido mudanças na taxa de aspiração dos digeridos decorrentes dos efeitos de viscosidade e tensão superficial causados por TMAH.

Julshamn e Andersen [25] usaram TMAH em tolueno para digestão de biópsias musculares humanas para determinação de Al, Cd, Cu e Mn por GFAAS e a determinação foi um sucesso. Essa mesma técnica foi empregada para determinação de espermatozoides humanos e prostassomas digeridos com 25% m/v TMAH em metanol. Os autores enfatizaram que os resultados obtidos usando a digestão TMAH estão concordantes com uma digestão convencional usando ácido nítrico concentrado e não exigiu aquecimento ou ácidos fortes e era adequado para pequenas amostras biológicas.

O meio fortemente básico surgido pela adição de TMAH provoca clivagem hidrolítica e metilação de éster, amida e éter a uma faixa de temperatura de 250–300 °C, permitindo

aplicações deste reagente na degradação de biomacromoléculas. Essas aplicações são divididas em duas categorias distintas: a termoquimólise, que ocorre em temperaturas mais amenas e permite a caracterização de ligações C–O, e a pirólise, fenômeno obtido em temperaturas mais elevadas, capaz de degradar ligações mais fortes como C–C [22].

Amostras tratadas com TMAH fornecem uma solução com características de suspensão, apresentando um baixo fator de diluição e permanecendo estáveis por meses em temperatura ambiente [26]. O composto TMAH é caracterizado por possuir quatro grupos metila ligados ao nitrogênio que têm sua carga positiva contrabalanceada pelo grupo hidroxila (Fig. 1). Os compostos alcalinos que pertencem à família deste composto são: hidróxido de tetraetilamônio (TEAH), hidróxido de tetra-n-propilamônio (TPAH), hidróxido de tetra-n-butilmônio (TBAH), etc. No entanto, nenhum registro de uso dessas outras substâncias para fins de preparação de amostras em química analítica foi encontrado, como é o caso em abundância do TMAH.

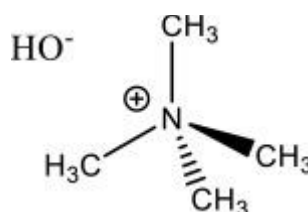
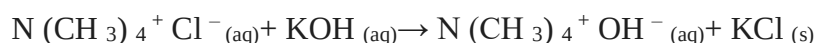


Figura 1. Estrutura molecular do TMAH

Alguns compostos hidratados ($\text{N}(\text{CH}_3)_4\text{OH} \cdot x\text{H}_2\text{O}$) podem ser cristalizados a partir de soluções aquosas de TMAH. Esses cristais são formados com $(\text{CH}_3)_4\text{N}^+$ alternando com grupos OH^- e águas de hidratação ligando-se a esses grupos hidroxila por interações de hidrogênio. Os cristais de pentahidrato são os mais comuns. Soluções aquosas entre 20 e 25% (m/v) de TMAH têm densidade de $1,015 \text{ g cm}^{-3}$.

Uma forma estabelecida de preparar TMAH foi desenvolvida por Walker e Johnston. Neste procedimento, o cloreto de tetrametilamônio reage com hidróxido de potássio em metanol anidro. Neste álcool, o TMAH é solúvel, mas o KCl precipita e pode ser facilmente separado.



O hidróxido de tetrametilamônio apresenta fórmula molecular $(\text{CH}_3)_4\text{NOH}$, é comercializado na forma de uma solução alcalina (pH 13,4-14,7) a 25 % m/v em água ou metanol, sendo a pureza dependente do fabricante. É uma base orgânica forte solúvel em água ou álcoois, capaz de se complexar e estabilizar os elementos voláteis. A solução formada é incolor com odor de amina [22].

Além de seu uso em laboratórios de pesquisa, o TMAH é amplamente utilizado nas indústrias de semicondutores e fotoelétricas. Um exemplo dessa utilização é a produção de displays de cristal líquido. Apesar desta utilização em larga escala, as informações sobre a toxicidade deste reagente ainda são insuficientes. É possível encontrar na literatura estudos que relatam alguns efeitos causados pelo contato com este reagente: dentre eles, destaca-se a possibilidade de irritação do nariz e vias aéreas pela inalação de vapores e a possibilidade de queimadura com a absorção do reagente pela pele. Entre as causas dos efeitos adversos estão, principalmente, a força da base (na concentração de 25%, pH > 13) e a decomposição do TMAH em tetrametilamônio (TMA), composto responsável por diversas intoxicações em humanos.

A utilização deste reagente é reportada como alternativa principal às digestões ácidas para o preparo de amostras proteicas, originalmente pouco solúveis em meio aquoso [21].

O reagente promove a clivagem de proteínas em fragmentos menores, facilitando a dissolução da amostra [27]. O TMAH é capaz de dissociar espécies químicas e de complexar efetivamente com elementos metálicos. Com isso, ele tem se mostrado adequado para o tratamento de amostras biológicas, como alternativa aos procedimentos de decomposição convencional, e posterior determinação de íons metálicos por técnicas de espectrometria atômica [22].

Pelas suas características, o tratamento alcalino de amostras com TMAH tem sido amplamente utilizado em análises que envolvem determinação de metais, halogênios, nanopartículas e especiação química. O tratamento das amostras com TMAH apresenta as seguintes vantagens: utiliza pequena quantidade de reagente (na ordem de microlitros) e isso acarreta baixos custos, as dissoluções são realizadas a baixas temperaturas, constitui um tratamento mais suave e seguro no que diz respeito à mineralização com ácidos e pode proporcionar procedimentos de tratamento rápidos.

Existem estudos em que o TMAH foi aplicado para o preparo de amostras biológicas tais como leite em pó, biodiesel, cabelo, unhas, sangue e tecidos proteicos (músculo e vísceras) [28]. Estes trabalhos demonstraram que o emprego da solubilização alcalina com TMAH promove uma redução do tempo do preparo relativo à manipulação-supervisão do processo, leva a obtenção de uma solução/suspensão de amostra estável em meio aquoso, além de favorecer estudos de especiação, por não alterar o estado de oxidação de espécies inorgânicas [21].

Com base na literatura, os meios alcalinos oferecem uma boa alternativa para preparo de amostras envolvendo um apreciável grupo de analitos em diferentes tipos de amostras. Esses reagentes também são empregados em procedimentos de especiação sob medida em que há uma dependência crítica na manutenção de formas químicas.

Vários efeitos indesejáveis nos processos de transporte e atomização requerem o uso do método de adições padrão para obter resultados precisos. Também é evidente que meios alcalinos podem melhorar o desempenho de técnicas como espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado e acessórios, como amostradores automáticos acoplados a fornos atômicos de grafite espectrômetros de absorção [22].

Desta forma, o objetivo geral deste trabalho foi desenvolver um procedimento com base na dissolução de leite de soja em hidróxido de tetrametilamônio com auxílio de energia de ultrassom visando a determinação de três metais (Fe, Mn e Zn) por espectrometria de absorção atômica com chama.

Destacam-se também os seguintes objetivos específicos:

- Utilizar planejamento experimental de Doehlert para otimização multivariada das variáveis envolvidas na dissolução assistida por ultrassom;
- Utilizar função de desejabilidade para otimização simultânea das três respostas estudadas (as absorvâncias dos metais) permitindo a obtenção de uma única condição ótima;
- Aplicar a metodologia desenvolvida na determinação de Fe, Mn e Zn em amostras de leite de soja líquido e extratos de soja.
- Contribuir com informações químicas relevantes para a área de alimentos, nutrição e saúde.

1. Introdução

Atualmente, a necessidade de informação da população em relação ao consumo de alimentos saudáveis, funcionais e práticos tem levado a indústria a desenvolver alternativas que atendam às necessidades nutricionais de grupos específicos quanto as, por exemplo, faixas etárias, estilos de vida e intolerâncias à determinadas substâncias. Leite de soja é um alimento que atende vários desses requisitos sendo indicada para auxiliar na redução da gordura corporal, para esportistas e por pessoas adeptas ao veganismo. Ele é também adotado por quem precisa controlar os níveis de colesterol ou para quem apresenta alergia às algumas substâncias do leite de vaca [29-33].

É uma bebida produzida usando-se grãos de soja (*Glycine max*) através de sua moagem na presença de água obtendo-se uma suspensão coloidal. Este processo preserva a maior parte dos carboidratos solúveis, proteínas, gorduras, vitaminas e minerais presentes naturalmente nos grãos. Para o produto final, pode haver também a adição de nutrientes, estabilizantes, flavorizantes e conservantes. Outra forma de comercializar o produto é na forma pulverizada (conhecida como proteína isolada de soja, extraída da farinha desengordurada) que deve ser preparada por dissolução em água morna. Ela oferece quantidades semelhantes de proteínas por porção em relação ao extrato líquido já pronto para consumo [30-31].

Os alimentos são as fontes principais de metais para a nutrição dos seres vivos. Porém, a ação benéfica no metabolismo e na saúde humana depende da espécie metálica e de sua quantidade ingerida. Enquanto os metais macronutrientes como Ca, K e Na são requeridos na dieta em grandes quantidades, na ordem de vários gramas por dia, os metais micronutrientes (Ex: Cr, Mn, Ni, Co, Fe, Cu, Zn, etc) são necessários em quantidades muito menores, na ordem de mili ou microgramas. A ingestão de quantidades insuficientes desses metais é responsável por quadros de desnutrição, como, por exemplo a anemia (deficiência de ferro) e deformações ósseas (deficiência de cálcio). Por outro lado, a ingestão de grandes quantidades de certos metais pode provocar intoxicação. Há também metais que são tóxicos mesmo em pequenas quantidades e não apresentam nenhuma função para o metabolismo, com é o caso do Cd, Pb e Hg.

Os metais não existem livres no alimento ingerido. Algumas espécies orgânicas se ligam aos íons metálicos e formam complexos de diferentes estabilidade e disponibilidade ao

organismo. A presença de metais em alimentos pode ser proveniente da lavoura (tipo de solo, uso de fertilizantes e defensivos agrícolas, água usada na irrigação, etc) e do manejo e processamento desse alimento podendo haver o aporte de metais de fontes externas por contaminação ou uso de aditivos para enriquecer o alimento. A determinação de metais e seus compostos em alimentos é uma demanda atual da sociedade cada vez mais preocupada com a qualidade de vida e preservação da saúde.

Tradicionalmente, para a determinação de metais em uma matriz orgânica utilizando-se técnicas espectroanalíticas, é necessário aplicar a decomposição em meio ácido por aquecimento. Esta técnica atende muitos requisitos necessários em termos de figuras de mérito necessárias para realizar a análise e confiabilidade nos resultados gerados, porém, em muitos casos, ela é demorada e requer o uso de grandes quantidades de reagentes e condições drásticas para atacar a amostra e liberar os metais na solução a ser analisada. Desta forma, o desenvolvimento de novas metodologias analíticas mais rápidas, econômicas, confiáveis e que utilizem pequena quantidade de reagentes (e, portanto, mais afinado com os princípios da química verde) é necessário.

O tratamento da amostra com o reagente hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) apresenta vantagens tais como: o uso de pequena quantidade do reagente (na ordem de algumas dezenas ou centenas de microlitros), as condições brandas do ataque à amostra e a simplicidade operacional. As desvantagens são: o uso específico do reagente às amostras de natureza proteica e a possibilidade de precipitação de metais na forma de hidróxido devido ao ambiente fortemente alcalino (o que merece um estudo cuidadoso da influência deste fenômeno nos resultados).

O reagente TMAH já foi aplicado em amostras de alimentos no desenvolvimento de: desenvolver um método para dissolução de amostras de leite de vaca para determinação de Ca, Fe, Mg, e Zn por FAAS [32], otimização de um método para determinação de Ca, Cu, Fe, K, Mg, Na e Zn em amostras de carne de bode por FAAS [33], preparar amostras visando determinar Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn e Zn em camarão e caranguejo por MIP OES [34], realizar a análise de especiação de Cr (VI) em amostras de arroz por ICP-MS após separação por cromatografia [35], determinação de Ca, Fe, Mg e Zn em amostras de filé de peixe por FAAS [36], usar energia de ultrassom para extrair Pb, Cd, Cr, Mn, Fe, Cu e Zn em óleos comestíveis

visando a determinação por GFAAS [37], solubilização de tecidos de frango monitorada por espectroscopia Raman seguida pela determinação de Pb por GFAAS [38], extração e determinação de iodo em frutas, vegetais, cereais, carnes, leite, e frutos do mar por ICP-MS [39], desenvolvimento de método rápido para determinação simultânea de mono metil mercúrio e mercúrio inorgânico em amostras de arroz e plantas aquáticas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de fluorescência atômica [40], determinação de nanopartículas de Ag em amostras de peixe usando ICP-MS de partícula única [41], extração e quantificação de nanopartículas de Ag, Au e Ti nanoparticles em biota marinha ICP-MS de partícula única [42], entre outros trabalhos.

Neste trabalho, aplicou-se otimização multivariada (planejamento experimental Doehlert) e função de desejabilidade no desenvolvimento de uma metodologia para o preparo de amostras de leite de soja por dissolução em meio de TMAH visando a determinação de metais (Fe, Zn e Mn) por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS).

2. Parte Experimental

2.1. Instrumentação

Os analitos foram determinados nas amostras de leite de soja utilizando-se um espectrômetro de absorção atômica com chama da Perkin Elmer (Modelo Analyst 200, Norwalk, CT, USA). A influência da radiação de fundo foi corrigida das medidas de absorvância por uma lâmpada de deutério. Lâmpadas de cátodo oco, operadas de acordo com as recomendações do fabricante, foram usadas como fonte de radiação para a determinação dos metais. Assim, os comprimentos de onda adotados (248,3; 279,5 e 213,9 nm), largura de fenda (0,2; 0,2 e 0,7 nm) e corrente da lâmpada (30, 20 e 15 mA) respectivamente para Fe, Mn e Zn, foram aplicada. Gás acetileno (razão de fluxo: 2,0 L min⁻¹) e ar atmosférico fornecido por equipamento de compressão (razão de fluxo: 13,5 L min⁻¹) foram utilizados para manter a chama e a razão de fluxo de aspiração do digerido da amostra foi de 5,0 mL min⁻¹.

A turbidez foi realizada em espectrômetro com comprimento de onda 550 nm.

Um equipamento de banho de ultrassom (Cristofoli, Campo Mourão, Brasil) foi utilizado no tratamento das amostras com TMAH. A digestão das amostras em meio ácido foi realizada por um bloco digestor (Tecnal, Piracicaba, São Paulo) provido com tubos de digestão e dedos frios de vidro. Uma balança Sartorius (modelo BLD105, Göttingen, Alemanha) foi utilizada para determinação de massas das amostras.

2.2. Reagentes e soluções

Hidróxido de tetrametilamônio 25% m/v (grau de pureza: 97%) foi obtido da Sigma Aldrich (Darmstadt, Alemanha). No preparo das soluções padrão dos metais e nos testes spike (Fe, Zn e Mn) usou-se soluções estoques de Fe, Mn e Zn, (Specsol, Jacareí, São Paulo) 1000 mg L⁻¹ (mv⁻¹) conservadas em HCl 1% (vv⁻¹). Na decomposição total das amostras de leite de soja no bloco digestor foram utilizados ácido nítrico concentrado (F. Maia, Cotia, São Paulo) e peróxido de hidrogênio (Êxodo Científica, Hortolândia, São Paulo). Um sistema Permution (Labnorte, Salvador Bahia) foi utilizado para obtenção de água deionizada. As vidrarias usadas foram descontaminadas por contato com solução de HNO₃ 5% por no mínimo 12 horas, seguida por seu enxague com água deionizada e secagem em ambiente livre de poeira.

2.3. Aquisição das amostras

As amostras de leite de soja líquido (pronto para consumo) ou em pó foram adquiridas em supermercados e em lojas especializadas em alimentos naturais da cidade de Jequié (Bahia, Brasil). As amostras foram armazenadas em prateleira, ao abrigo da luz e da umidade, sem a necessidade de refrigeração. As embalagens foram abertas apenas no momento do preparo das amostras. O produto sólido já é comercializado na forma de um pó muito fino, dispensando o processo de cominuição, realizando apenas peneiração.

2.4. Otimização do procedimento de tratamento

Planejamento Doehlert e função de desejabilidade foram as duas ferramentas multivariadas aplicadas na otimização do procedimento de dissolução das amostras assistida por energia de ultrassom de leite de soja em meio de TMAH. O planejamento Doehlert foi aplicado para modelar os dados e encontrar as condições experimentais ótimas usando o programa Statistic. As variáveis tempo de sonicação (TS) e volume do reagente TMAH (VR) foram estudadas em cinco níveis. A variável temperatura (T) foi estudada em três níveis. Para a otimização simultânea das três respostas (as absorvância dos metais Fe, Zn e Mn), função de desejabilidade foi utilizada no conjunto da dados visando a maximização das respostas. Para a turbidez, desejou-se a minimização da resposta.

2.5. Procedimento de obtenção de suspensão em TMAH após otimização

O procedimento otimizado deve ser aplicado da seguinte forma: (i) pesar cerca de 0,25 g da amostra de extrato de soja em pó em um tubo de centrífuga de vidro com fundo cônico; (ii) adicionar uma alíquota de 5 mL de água deionizada e agitar o tubo para formar a suspensão da amostra; (iii) adicionar uma alíquota de 700 μL de TMAH 25% ($\text{v}\cdot\text{v}^{-1}$) e a mistura deve ser submetida a banho ultrassônico por 15 min em temperatura ambiente; (iv) após sonicação, a amostra deve ser diluída à 20 mL com água desionizada e (v) transferida para um frasco de polietileno e armazenado em refrigerador até o momento da determinação dos metais por FAAS.

Para as amostras líquidas, deve-se transferir 5 mL da amostra para o tubo, não adicionar água e seguir o procedimento igual ao da amostra sólida a partir do item iii.

2.6. Decomposição ácida das amostras de leite de soja em bloco digestor

Para realizar a decomposição ácida pesou-se 0,25 g da amostra sólida e transferiu-se para o tubo digestor. A amostra deve ser umedecida com 5 mL de água e agitada para não formar uma crosta que a mantém grudada no fundo do tubo. Em seguida, deve-se adicionar 3

mL de ácido nítrico concentrado e acoplar o dedo frio. Leva-se o tubo ao bloco digestor para aquecimento a temperatura de 110°C. Manter sob aquecimento até que o digerido pare de liberar uma fumaça marrom correspondente ao óxido de nitrogênio. Adiciona-se 2 mL de peróxido de hidrogênio à amostra e deve-se continuar seu aquecimento até a sua completa decomposição e o volume chegar a quase securo. Transferir o digerido para um tubo Falcon e diluir com água até 20 mL. Para a decomposição das amostras líquidas, transferiu-se 5 mL do leite para o tubo digestor após homogeneização por simples agitação da embalagem e prosseguir como foi feito para a amostra sólida eliminando a etapa de adição de água. Conservar os digeridos sob refrigeração até o momento da determinação dos metais.

3. Resultados e discussão

3.1. Otimização multivariada

A otimização do tratamento das amostras de leite de soja usando (TMAH) e energia de ultrassom foi realizada de forma multivariada. A matriz de planejamento Doehlert e a função de desejabilidade foi usada na definição dos experimentos realizados e na otimização simultânea das múltiplas respostas. A Tabela 1 apresenta os experimentos correspondentes à matriz Doehlert e as respostas obtidas (as absorvâncias dos analitos e a turbidez final da suspensão após o tratamento).

Tabela 1. Matriz de Planejamento Doehlert e respostas obtidas na otimização do procedimento para tratamento de amostra de leite de soja com TMAH e energia de ultrassom.

Exp.	Variáveis			Respostas				
	VR (uL)	TS (min)	T (°C)	Mn	Zn	Fe	DG	Turbidez
1	1000	30	40	0,0142	0,589	0,0151	0,2864	0,585
2	800	20	30	0,027	0,1773	0,0154	0,7207	0,824
3	800	20	50	0,0245	0,1615	0,0157	0,6084	0,548
4	800	40	30	0,0244	0,1595	0,0144	0,5416	0,874
5	800	40	50	0,0234	0,1642	0,0146	0,5587	0,536
6	600	10	40	0,0199	0,1672	0,013	0,4281	1,09
7	600	30	40	0,0252	0,1800	0,0132	0,5779	0,698
8	600	30	40	0,0253	0,1591	0,0215	0,7769	0,671
9	600	30	40	0,0209	0,1529	0,0174	0,5379	0,668
10	600	30	40	0,0238	0,1549	0,0201	0,6798	0,682
11	600	30	40	0,0253	0,1605	0,0236	0,8348	0,691
12	600	30	40	0,0228	0,1717	0,0206	0,7828	0,674
13	600	50	40	0,0127	0,1267	0,0104	0	0,563
14	400	20	30	0,0175	0,1732	0,0131	0,3965	0,951
15	400	20	50	0,0185	0,1718	0,0138	0,4515	0,878
16	400	40	30	0,0154	0,1680	0,0111	0,2006	1,103
17	400	40	50	0,0175	0,1720	0,013	0,3882	0,561
18	200	30	40	0,0169	0,1779	0,0111	0,2497	1,009

VR: volume do reagente TMAH (em microlitros); TS: tempo de sonicação (em minutos); T: temperatura (em graus Célsius); DG: desejabilidade global; Turbidez em -log T.

Para permitir o estudo simultâneo das três respostas obtidas (as absorbâncias dos metais Fe, Mn e Zn) utilizou-se a função de desejabilidade. A turbidez foi estudada separadamente. Esta abordagem demanda que primeiro se calcule as desejabilidades individuais (d_i) de cada conjunto de resposta. Neste trabalho a expressão utilizada neste cálculo foi simplificada por:

$$d_i = \frac{y_i - y_{\min}}{y_{\max} - y_{\min}}$$

Em que y_i é um valor da resposta observada para um dado metal em um dado experimento, $y_{\min}$ e $y_{\max}$ são, respectivamente o valor de resposta mínima e máxima observada para dado metal.

De posse das desejabilidades individuais, elas são combinadas na forma de desejabilidade global, segundo a expressão:

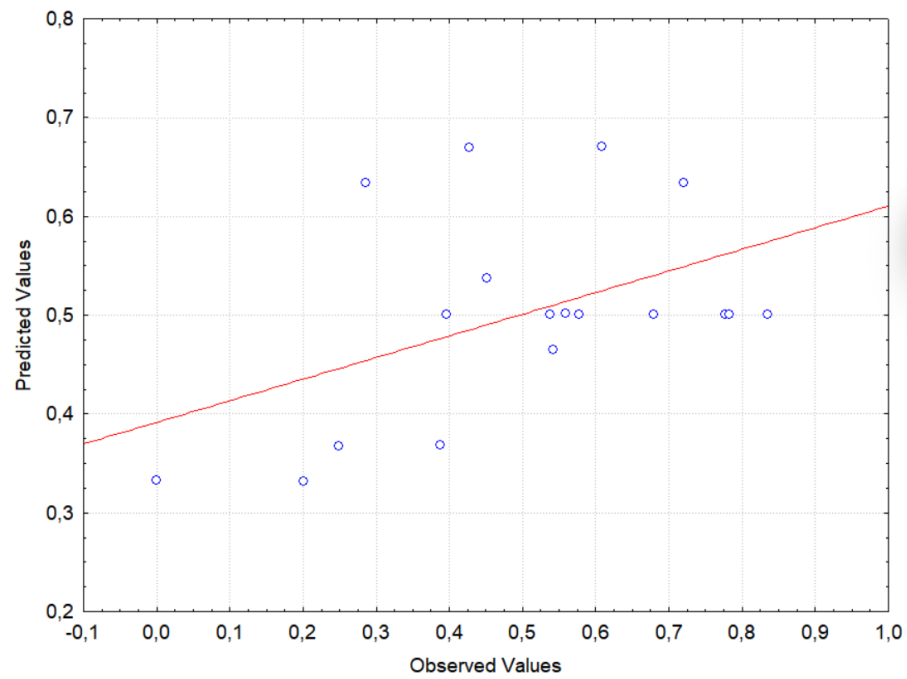
$$D = \sqrt[3]{d_{Fe} \times d_{Mn} \times d_{Zn}}$$

Em que D é a desejabilidade global.

Usando-se a técnica de ajuste por mínimos quadrados aos dados da Tabela 1 foram geradas as funções que descrevem o comportamento da resposta (a desejabilidade global). Ambas as funções não apresentaram falta de ajuste apresentando valor de p igual a 0,4507 e 0,5323 para os modelos linear e quadrático respectivamente. Porém o modelo quadrático descreve melhor o comportamento dos dados como pode ser observado nos gráficos de valores preditos versus valores observados (Figura 1) e pelos gráficos de resíduos (Figura 2).

O modelo quadrático apresenta uma melhor correlação entre os valores preditos pelo modelo matemático e os valores obtidos experimentalmente demonstrando a sua superioridade em relação ao modelo linear. Os gráficos de resíduos também reforçam a decisão pela escolha do modelo quadrático. Nota-se que o modelo linear deixa resíduos muito grandes em relação ao eixo central do gráfico. Além disso, os resíduos deixados pelo modelo linear mostram tendências indicando a sua inadequação. Dessa forma, o modelo linear foi descartado e utilizou-se o quadrático na determinação das condições experimentais ótimas.

a)



b)

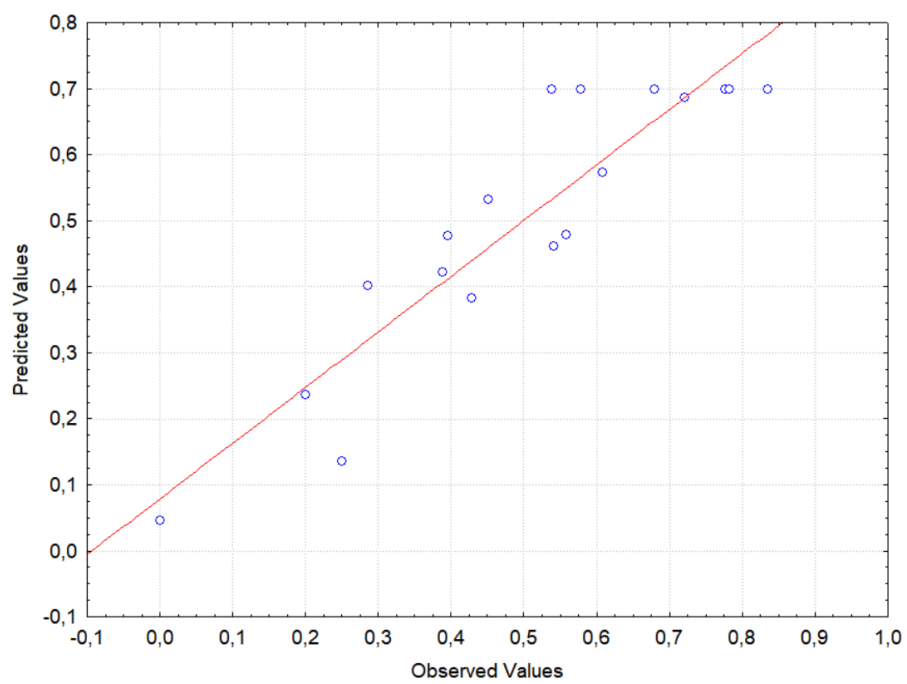
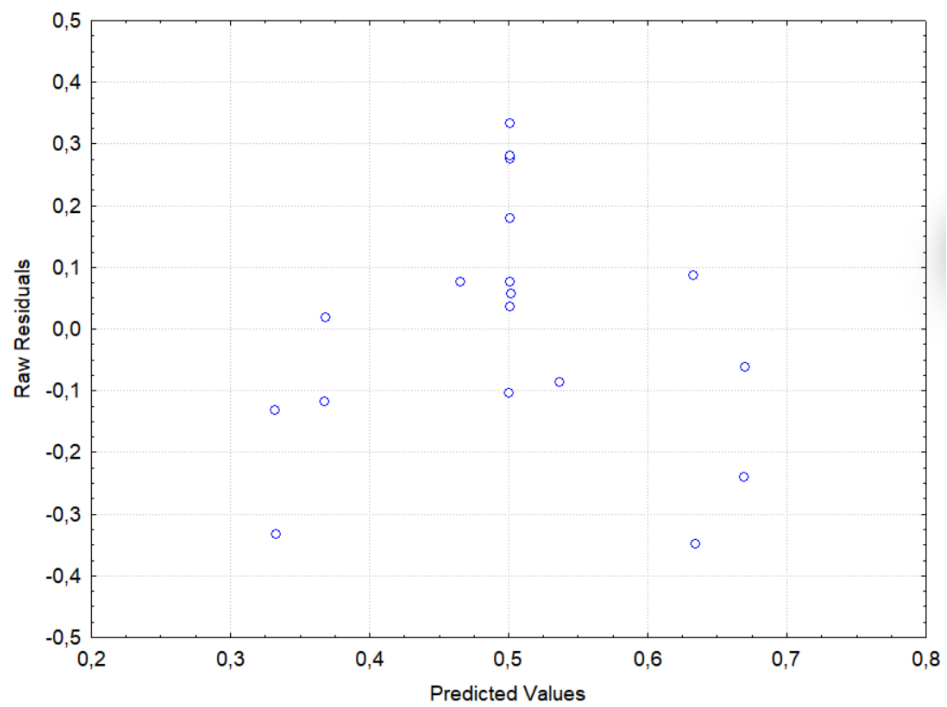


Figura 2. Gráficos de Valores predito versus valores observados para (a) modelo linear e (b) modelo quadrático

a)



b)

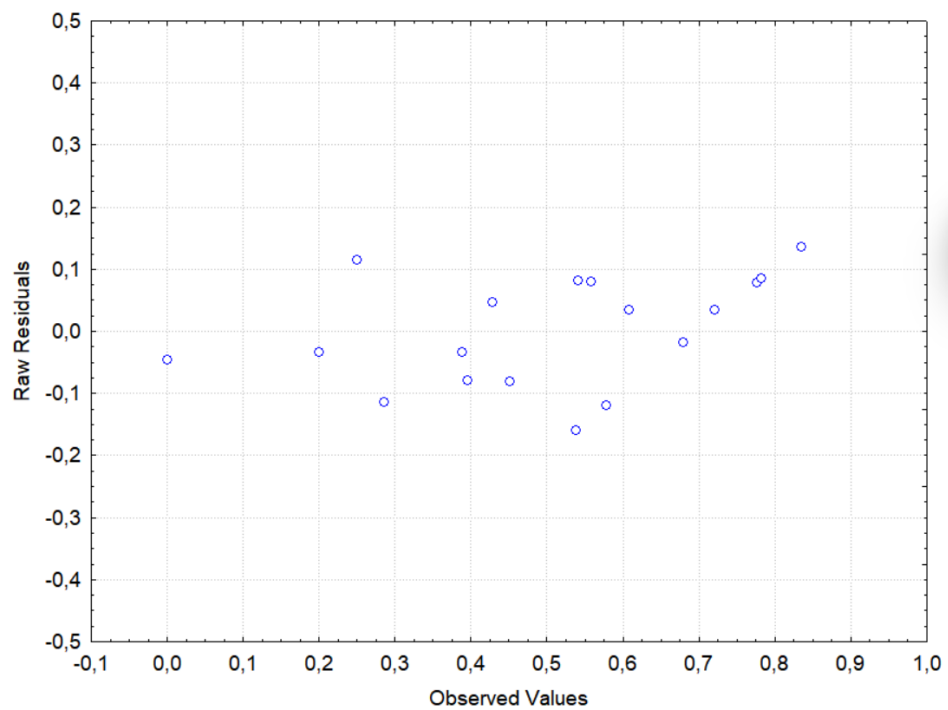


Figura 3. Gráficos de resíduos para (a) modelo linear e (b) modelo quadrático

Este modelo descreve as superfícies parciais apresentadas na Figura 3. Estas superfícies são caracterizadas como superfícies de máximo. Os perfis de desejabilidade individuais e global são apresentados na Figura 4. Neste perfil, as três primeiras linhas se referem às desejabilidades individuais de cada metal. Na última, tem-se a desejabilidade global. Nota-se que o valor máximo de desejabilidade global atingido apresenta valor de aproximadamente 0,76. Quanto mais próximo da unidade for este valor, isto significa que há uma região de intersecção entre os valores ótimos de cada resposta considerada.

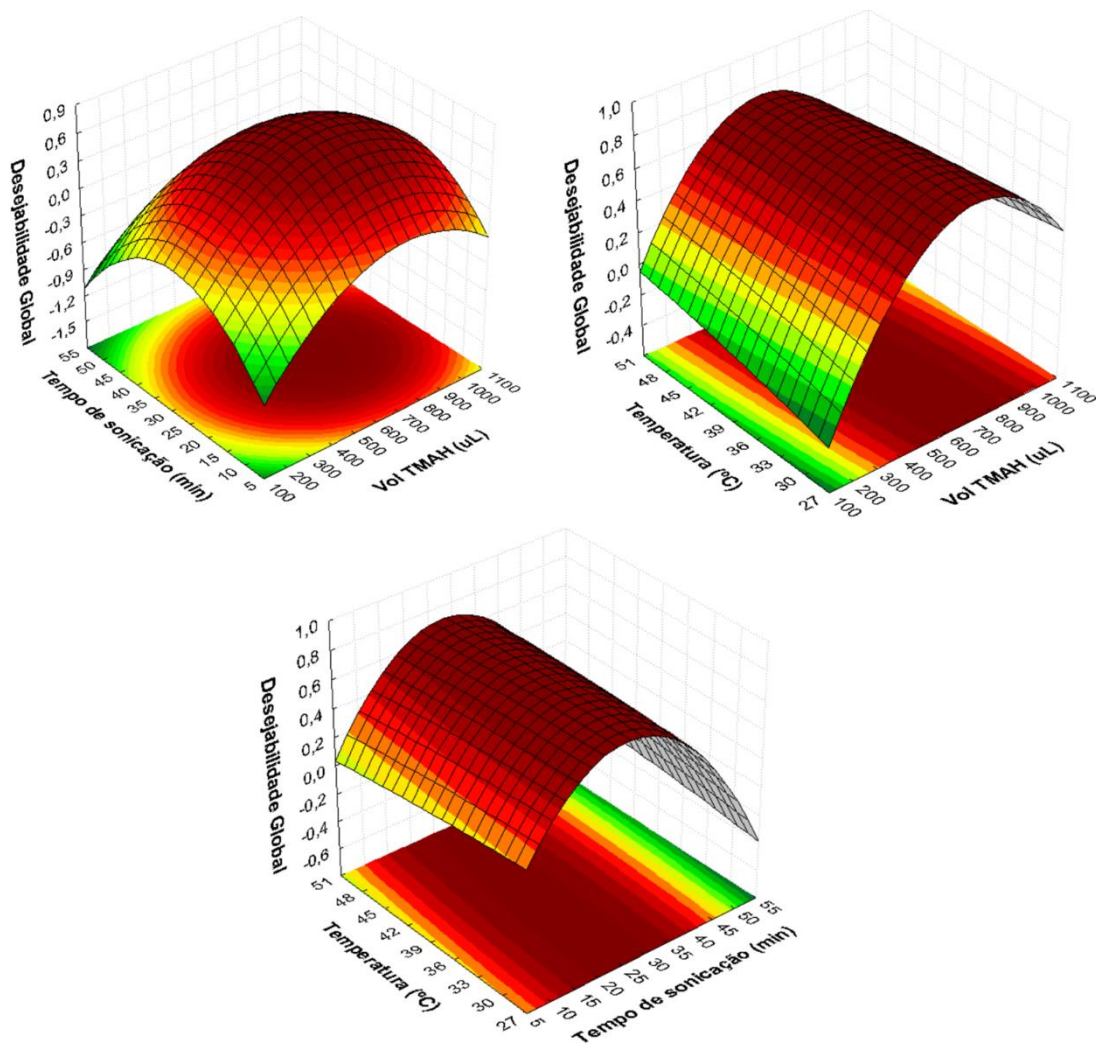


Figura 4. Três superfícies de respostas parciais obtidas por ajuste de uma função quadrática aos valores de desejabilidade global

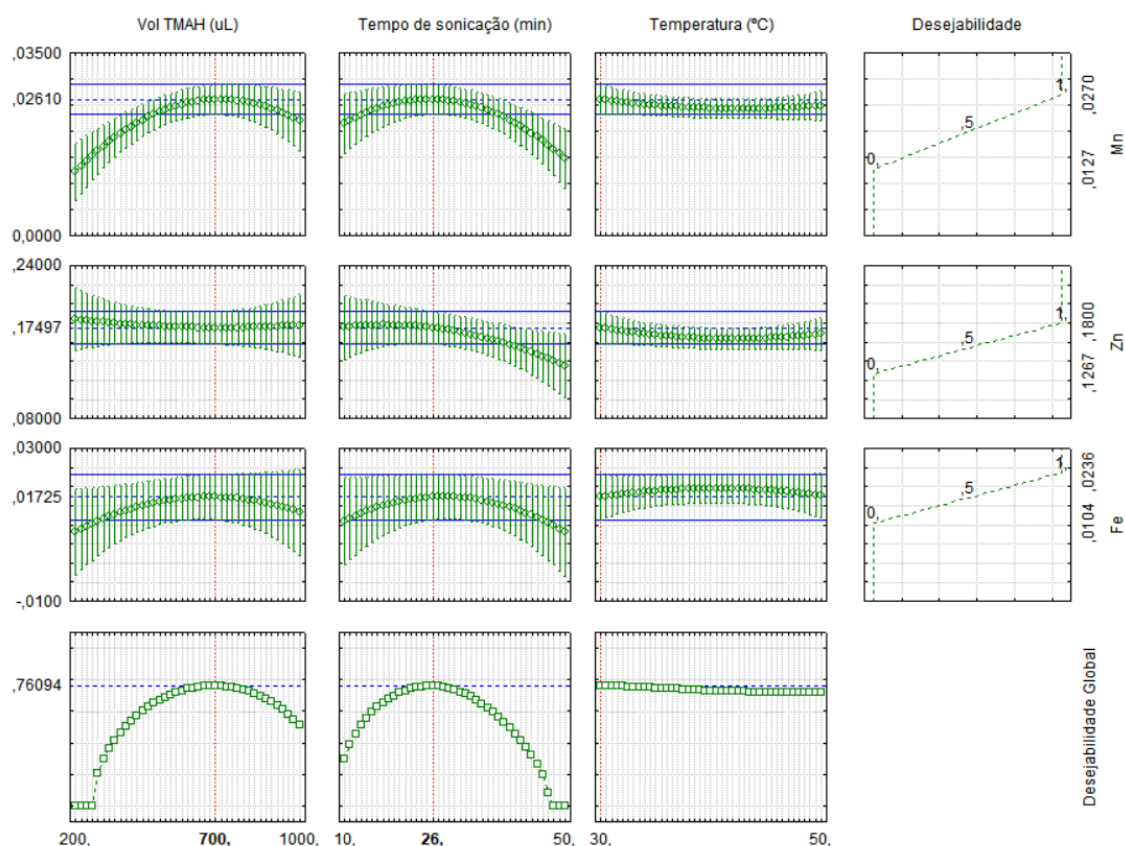


Figura 5. Perfis de desejabilidade individual e global para o modelo quadrático na otimização do procedimento para dissolução da amostra de leite de soja com destaque para os valores ótimos

Conforme os perfis de desejabilidade, se obtém a máxima resposta possível realizando-se o procedimento nas seguintes condições experimentais: volume de TMAH entre 600 e 800 μL (adotou-se 700 μL) com um tempo de sonicação entre 20 e 30 min (adotou-se 26 min). A temperatura não apresentou efeito significativo na resposta no intervalo estudado. Desta forma, adotou-se a temperatura ambiente para se realizar as dissoluções. Verificou-se que a adoção da temperatura ambiente também não causou variação da resposta obtida.

A turbidez da solução final também foi avaliada como resposta no processo de otimização. Considerou-se que a diminuição da turbidez reflete a melhoria na dissolução da

amostra pois torna a solução mais transparente deixando passar mais radiação. Desta forma, adotou-se $-\log T$, onde T é a transmitância da solução determinada em espectrofotômetro.

Para descrever o comportamento da turbidez de acordo com os tratamentos aplicados, ajustou-se uma função matemática quadrática. Embora a função tenha apresentado falta de ajuste significativa, ela foi utilizada para descrever tendências. As superfícies parciais geradas são apresentadas na Figura 5.

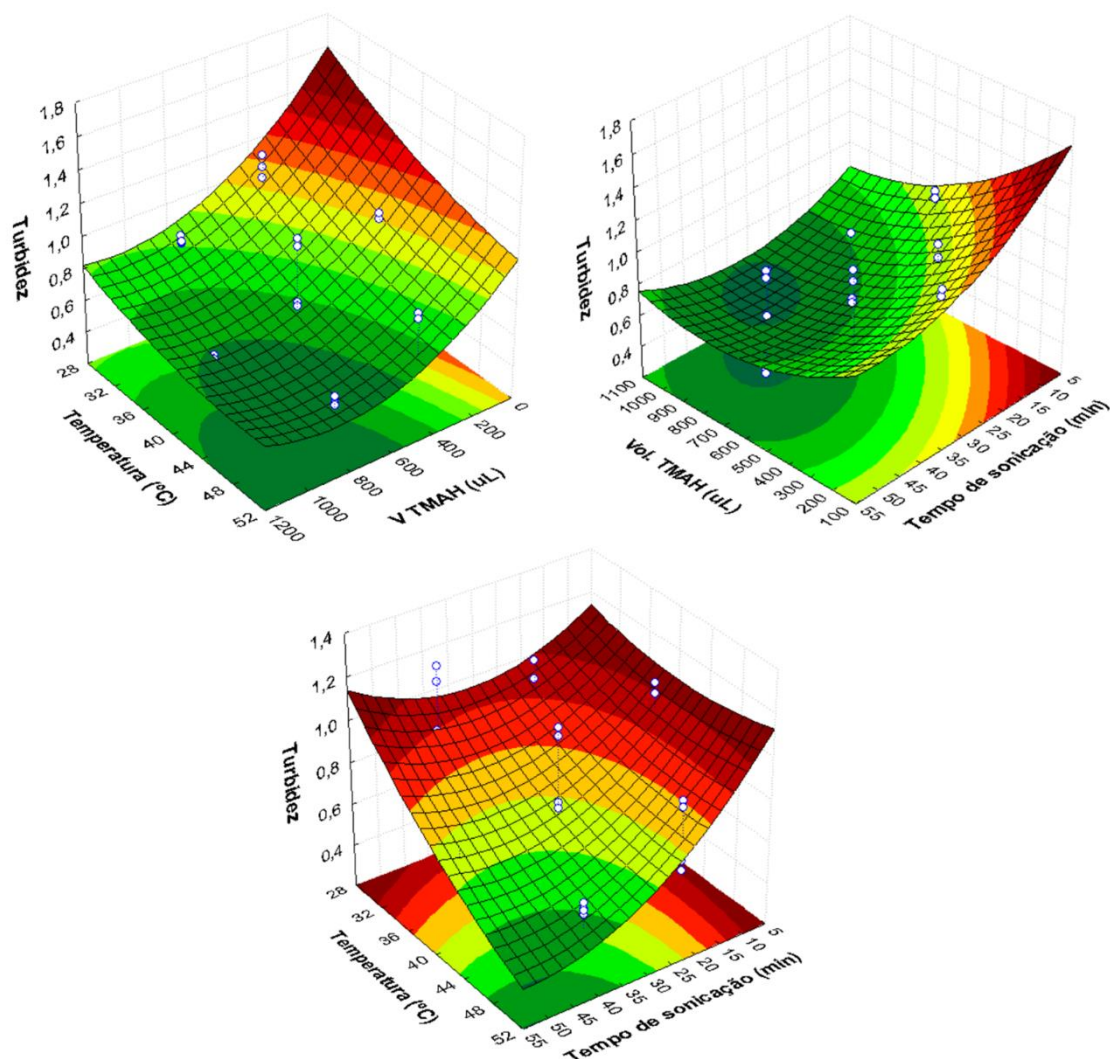


Figura 6. Três superfícies de respostas parciais obtidas por ajuste de uma função quadrática aos valores de turbidez

Analisando-se as superfícies de respostas, constata-se que as condições que geram menor turbidez são obtidas quando se utiliza volumes de TMAH entre 800 e 1000 μL , tempos de sonicação maiores que 30 min e temperaturas maiores que 40°C. Como estas condições foram próximas àquelas encontradas no estudo dos sinais dos três metais, as condições anteriores foram mantidas.

3.2. Estudo da massa da amostra

Este estudo foi realizado com as amostras pulverizadas. A massa da amostra foi estudada no intervalo de 0,05 a 0,3 g. Avaliou-se neste estudo, o aumento do sinal analítico dos três metais estudados, a dissolução da amostra (ausência de material particulado). Os resultados são apresentados nos gráficos da Figura 6.

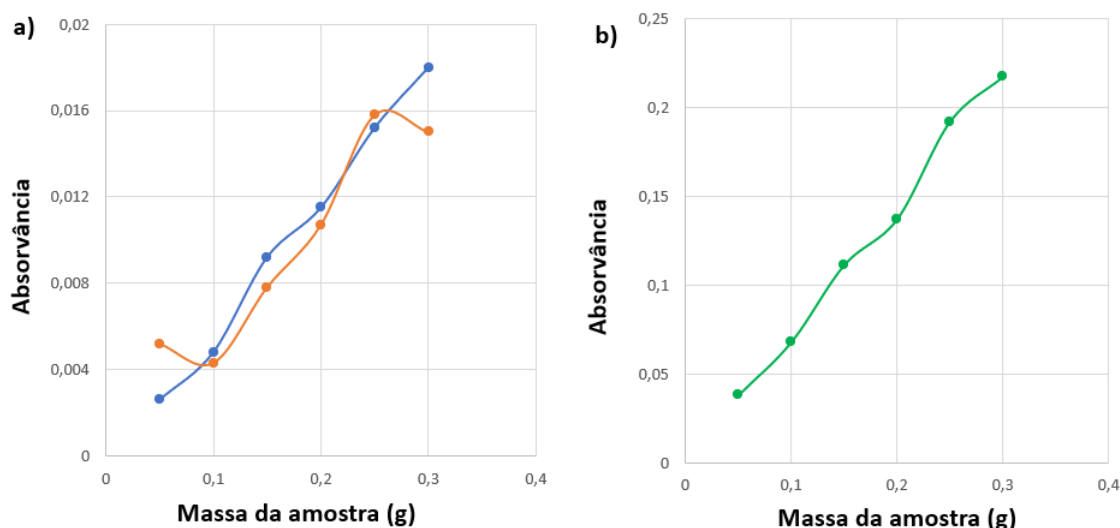


Figura 7. Estudo da massa da amostra de leite de soja para (a) Mn (x) e Fe (x) e (b) Zn (x). Condições experimentais: Volume de TMAH: 700 μL , tempo de sonicação: 26 min e temperatura ambiente.

Nota-se que, dentro dos valores de massa estudados e para os metais Mn e Zn, o sinal de absorvância tende a aumentar à medida que a massa aumenta. Este comportamento não foi observado para o Fe nos valores extremos do intervalo de massa estudado. Foi também observado que usando-se uma massa de 0,3 g ocorreu maior frequência de entupimento do

sistema de nebulização do FAAS. Dessa forma, escolheu-se a massa de 0,25 g para a realização dos futuros experimentos.

3.3. Avaliação de existência de efeitos de matriz

O tratamento da amostra com hidróxido de tetrametilamônio gera uma solução final (ou suspensão) muito alcalina que pode modificar as condições de determinação dos analitos estudados. A maior parte dos hidróxidos metálicos apresenta solubilidade muito baixa convertendo-se em um coloide que permanece suspenso na fase aquosa. Isto faz com que os analitos possam apresentar eficiências de atomização que são diferentes daquelas que eles apresentam em solução aquosa acidificada, gerando interferências na determinação devido ao efeito de matriz. As interferências de transporte, como aquelas relacionadas à geração de aerossóis para nebulização da amostra em FAAS, são corrigidas pela correspondência matricial entre os padrões de calibração e amostras (matrix matched) ou pela aplicação do método de adição padrão à própria amostra.

Para avaliação do efeito de matriz, foram estudadas as inclinações de curvas analíticas construídas em meio de TMAH (700 μ L) e as curvas analíticas construídas por adição padrão dos metais estudados (Fe, Mn e Zn) na própria amostra após tratamento com TMAH e sonicação nas condições otimizadas (Tabela 2). Considera-se que não há efeito de matriz quando os intervalos de confiança, em um nível de confiança de 95%, das inclinações das curvas apresentem intersecção. Observa-se que os coeficientes angulares das equações das curvas analíticas não são estatisticamente diferentes adotando-se este critério e que, portanto, não há efeito de matriz. Desta forma, para simplificar o processo de calibração, recomenda-se adotar a calibração externa construindo-se os padrões da curva analítica em meio de TMAH.

Tabela 2. Parâmetros das curvas analíticas para Fe, Mn e Zn obtidas em meio aquoso de TMAH e por adição padrão às suspensões de leite de soja em TMAH

	Curva analítica	IC (NC=95%)	R ²
Fe			
Em meio TMAH	$y = 0,0211 C_{Fe} + 0,007$	0,0185 – 0,0237	0,9920
Adição padrão	$y = 0,0206 C_{Fe} + 0,0112$	0,0198 – 0,0214	0,9986
Mn			
Em meio TMAH	$y = 0,0605 C_{Mn} + 0,001$	0,0584 – 0,0618	0,9986
Adição padrão	$y = 0,0589 C_{Mn} + 0,0206$	0,0554 – 0,0625	0,9963
Zn			
Em meio TMAH	$y = 0,187 C_{Zn} + 0,0056$	0,161 – 0,213	0,9943
Adição padrão	$y = 0,206 C_{Zn} + 0,2047$	0,146 – 0,299	0,9909

y é a absorvância de cada metal estudado.

3.4. Características analíticas e aplicação do método

As características analíticas do método com base na dissolução da amostra em TMAH foram obtidas utilizando-se as condições experimentais otimizadas. Calculou-se o limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) com base no desvio padrão amostral de dez medidas do branco da solução da curva analítica dividindo-se o resultado pelo coeficiente angular da curva analítica e multiplicando-se por 3 e 10 respectivamente. Os LODs encontrados em mg L⁻¹ foram 0,053; 0,018 e 0,0028, e em mg Kg⁻¹ foram 4,3; 1,4 e 0,22. Os LOQs, em mg L⁻¹, foram 0,18; 0,061 e 0,0092, e em mg Kg⁻¹ foram 14,2; 4,7 e 0,73 para Fe, Mn e Zn, respectivamente.

A precisão, em termos de repetibilidade, foi calculada com base em dez medidas das soluções padrão dos metais estudados em 0,5 e 2,0 mg L⁻¹ e expressa como % RSD. Os valores encontrados para repetibilidade foram 5,3; 2,3 e 1,3 % para 0,5 mg L⁻¹ e 1,5; 1,3 e 0,95 % para 2,0 mg L⁻¹ para Fe, Mn, e Zn, respectivamente. A sensibilidade analítica foi calculada através do coeficiente angular encontrando-se os seguintes valores 0,0219, 0,0605 e 0,205 Abs L mg⁻¹.

Para avaliar a exatidão, utilizou-se três técnicas: (i) testes de adição/recuperação (testes spikes), (ii) comparação dos resultados obtidos pelo método proposto com um método padrão (decomposição em meio ácido usando bloco digestor) e (iii) análise de uma amostra certificada.

Os resultados dos testes spikes são apresentados na Tabela 3. As recuperações variaram de 92 a 104%. Estes valores são indícios de que o método desenvolvido é exato para estes metais.

Tabela 3. Resultados dos testes Spike para dois níveis de concentração em uma amostra de leite de soja líquido.

Metal	Adicionado (mg L ⁻¹)	Encontrado (mg L ⁻¹)	Rec (%)
Fe	0	2,54 ± 0,21	-
	0,5	3,06 ± 0,32	104
	2,0	4,48 ± 0,25	97
Mn	0	1,40 ± 0,15	-
	0,5	1,86 ± 0,24	92
	2,0	3,42 ± 0,21	101
Zn	0	3,02 ± 0,11	-
	0,5	3,54 ± 0,08	104
	1,5	4,49 ± 0,12	98

A comparação dos resultados obtidos com a dissolução em TMAH e com a digestão das amostras em meio ácido são mostrados na Tabela 4 para duas amostras líquidas de leite de soja e na Tabela 5 para duas amostras sólidas (extrato de soja).

Tabela 4. Resultados (mg L^{-1}) para determinação de Fe, Mn e Zn, ($N=3$) em amostras de leite de soja líquido e comparação de duas metodologias

Metal	Amostra	Método TMAH	Método Digestão Ácida	Valor t
Fe	1	$12,3 \pm 2,1$	$11,1 \pm 1,8$	1,52
	2	$7,86 \pm 1,4$	$7,46 \pm 0,57$	-
Mn	1	$1,42 \pm 0,18$	$1,58 \pm 0,24$	-
	2	$1,38 \pm 0,28$	$1,48 \pm 0,67$	-
Zn	1	$8,24 \pm 0,12$	$8,35 \pm 1,0$	-
	2	$4,05 \pm 0,51$	$3,00 \pm 1,3$	-

(média $\pm$ desvio padrão), t-crítico: 2,57

Tabela 5. Resultados (mg Kg^{-1}) para determinação de Fe, Mn e Zn, ($N=3$) em amostras de extrato de soja pulverizadas

Metal	Amostra	Método TMAH	Método Digestão Ácida	Valor t
Fe	3	1860 ± 14	1932 ± 83	0,335
	4	2302 ± 21	2251 ± 48	-
Mn	3	2142 ± 88	2024 ± 85	-
	4	2051 ± 67	1968 ± 50	-
Zn	3	4986 ± 10	5252 ± 58	-
	4	5542 ± 14	5315 ± 13	-

(média $\pm$ desvio padrão), t-crítico: 2,57

Aplicando-se o teste t-pareado, obtêm-se os valores de t iguais a 1,52 e 0,335 respectivamente. Como os módulos destes valores estão abaixo do valor crítico (adotando-se um nível de confiança de 95%) considera-se que os resultados gerados pelas duas metodologias não são estatisticamente diferentes e, portanto, a exatidão é considerada adequada.

Uma amostra certificada de referência que foi analisada se constituiu em leite em pó desnatado (Trace elements in Skimmed Powdered Milk, ERM-BD150). Os resultados para o

Mn e Zn são apresentados na Tabela 6. Ferro não foi detectado usando a metodologia desenvolvida. Os valores encontrados pela análise da amostra de leite estão muito próximos daqueles informados em seu certificado.

Tabela 6. Determinação de Mn e Zn (N=3) em uma amostra de material de referência certificado de leite desnatado em pó (ERM-BD150)

Analito	Valor certificado (mg Kg ⁻¹)	Valor encontrado (mg Kg ⁻¹)
Mn	18,0 ± 1,8	19,1 ± 2,1
Zn	44,9 ± 2,3	45,3 ± 3,2
Fe	4,6	Não detectado

Na pesquisa realizada por Iolanda et al, 2020 foram avaliados os níveis de concentrações de alguns metais entre eles Mn em leite de vaca e soja. As concentrações nas amostras analisadas variaram de 0,00023 a 0,00264 mg Kg⁻¹. A média de Mn nas amostras de soja em grãos foi de 0,00094 mg Kg⁻¹, enquanto que nos derivados de soja, como tofu e leite de soja, as médias foram de 0,00152 e 0,00126 mg Kg⁻¹, respectivamente. Essas concentrações são consistentes com os dados disponíveis na literatura, confirmando que produtos de soja são fontes relevantes de manganês na dieta."[48]. Em relação ao zinco, Ayca Karasaka, 2020 realizou as análises de alguns metais em leite de soja e fez a comparação de leite de soja determinado e certificado (NIST 3235 SRM) após digestão ácida por micro-ondas resultando em 2.58 ± 0.19 mg Kg⁻¹[49]. O Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, National Academies, Washington, DC, EUA, definiu valores de Ingestão Dietética Recomendada (RDI) para alguns elementos como Mn recomenda-se 5 mg diariamente e Fe e Zn ambos 15 mg [49]. Na resolução-RDC n° 269 a Anvisa recomenda ingestão diária Manganês 2,3 mg, Ferro 14 mg e zinco 7 mg diariamente [50].

4. Conclusões

A aplicação de planejamento Doehlert aliado à otimização de multirespostas por função de desejabilidade permitiu o desenvolvimento eficiente, rápido e de baixo custo de um procedimento para tratamento de amostras de leite de soja usando hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) e energia de ultrassom. A análise de metais é um indicador importante da qualidade dos alimentos. A presença de certos metais pode ser um sinal de contaminação durante a produção, processamento ou armazenamento dos alimentos. O procedimento desenvolvido permite a determinação de Fe, Mn e Zn em amostras de leite de soja e em extrato de soja usando espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) com limites de quantificação de 0,18; 0,061 e 0,0092 mg L⁻¹, precisão (como repetibilidade, %RSD) de 5,3; 2,3 e 1,3%. A avaliação da exatidão por três diferentes técnicas, comprovou que o procedimento desenvolvido apresenta capacidade adequada para determinação desses metais com confiança.

Referências

- [1] Aluizio Borém, Felipe Silva, Tuneo Sedyama, Gil Camara Soja: do plantio à colheita. São Paulo: Oficina de texto, 2022. E-book (312p.)
- [2] Hirakuri & Lazzarotto Casé, Deliza, e Rosenthal, “Produção de ‘leite’ de soja enriquecido com cálcio”. O agronegócio da soja nos contextos mundial e brasileiro, 2014. Embrapa Soja Londrina, V. 1º, n. 349, p. 43-44, 2014.
- [3] Embrapa, Embrapa soja dados econômicos. Empresa Brasileira de agropecuária, 2020.
- [4] CONAB, Acompanhamento da Safra Brasileira Safra 2020/21, V.8, n. 1, p. 11-15, 2020.
- [5] Embrapa. Embrapa soja dados econômicos. Empresa Brasileira de agropecuária, 2014
- [6] Vieira, R.F.; Vieira, C.; Vieira, R.F. Leguminosas e gramíneas. Viçosa: UFV, p. 9- 206, 2001.
- [7] Fehr & Caviness, C.E. Estágios de soja desenvolvimento. Iowa: Ames, Estado Universidade de Ciência e Tecnologia, 1977. 11p. (Relatório especial, 80)
- [8] Ávila, M. R., Braccini, A. de L. e., Scapim, C. A., Mandarino, J. M. G., Albrecht, L. P., & Vidigal Filho, P. S. (2007). Componentes do rendimento, teores de isoflavonas, proteínas, óleo e qualidade de sementes de soja. *Revista brasileira de sementes [Brazilian seed journal]*, 29(3), 111–127.
- [9] Wolf e Cowan, Corn meal/soy flour blends: Characteristics and food applications. Journal of Food Science, Chicago, V. 36, n. 5, p. 1026-1032, 1971.
- [10] Sgarbieri et al. Soybeans as an extender of common beans. Journal of the American Oil Chemist’s Society, Chicago, V. 58, n.3, p. 522-526, 1981.
- [11] Nawar, 1985 Food chemistry. New York: Marcel Dekker, 139- 244, 1985.
- [12] Franco, Tabela de composição química de alimentos. 7ª ed. Rio de Janeiro: Ed. Livraria Atheneu, 1986.
- [13] Lui, M. C. Y., Aguiar, C. L., Alencar, S. M. de, Scamparini, A. R. P., & Park, Y. K. (2003). Isoflavonas em isolados e concentrados protéicos de soja. *Food Science and Technology*, 23, 206–212.
- [14] Rodrigues e Moretti, Caracterização Físico-química de bebida proteica elaborada com extrato de soja e polpa de pêssegos. B. CEPPA, Curitiba, V. 26, n. 01, p. 101-110, 2008.
- [15] Sedyama et al. Melhoramento Genético da Soja. Editora Mecnas, p. 352, 2015.

-
- [16] Shun-Tang, G., Ono, T., & Mikami, M. (1997). Interaction between protein and lipid in soybean milk at elevated temperature. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(12), 4601–4605.
- [17] S. Camara, G. M Soja; produção, pré processamento e transformação agroindustrial; São Paulo: Secretária da Industria, Comércio, ciência e tecnologia; FEALQ, 1982. P. 53-99. (Série Extensão Agroindustrial,7)
- [18] Mollakhalili-Meybodi, N., Arab, M., & Zare, L. (2022). Harmful compounds of soy milk: characterization and reduction strategies. *Journal of Food Science and Technology*, 59(10), 3723–3732.
- [19] Kuiper, G. G. J. M., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Häggblad, J., Nilsson, S., & Gustafsson, J.-A. (1997). Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β . *Endocrinology*, 138(3), 863–870.
- [20] Kuiper, G. G. J. M., Lemmen, J. G., Carlsson, B., Corton, J. C., Safe, S. H., van der Saag, P. T., van der Burg, B., & Gustafsson, J.-Å. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β . *Endocrinology*, 139(10), 4252–4263.
- [21] Arromba, R., Campos S.N, Orlando. Preparação de amostras para análise elementar, 2017. Apostila de apoio- Programa de pós-graduação em química. Universidade de Juiz de Fora, Juiz de fora, 2017.
- [22] Nóbrega, J. A., Santos, M. C., de Sousa, R. A., Cadore, S., Barnes, R. M., & Tatro, M. (2006). Sample preparation in alkaline media. *Spectrochimica Acta. Part B: Atomic Spectroscopy*, 61(5), 465–495.
- [23] Butik, M. Comparação entre métodos de solubilização alcalina e digestão ácida de tecido animal para determinação de metais usando espectrometria de absorção atômica em chama. *Revista Virtual de Química*, V. 10, n. 4, p. 1039-1055, jul. 2018.
- [24] Murthy. Determinação da absorção atômica de zinco, cobre, cádmio e chumbo em tecidos solubilizados por hidróxido de tetrametilamônio aquoso. *Anal Biochem* 53:365–372, 1973
- [25] Julshamn e Andersen. Um estudo sobre a digestão de biópsias musculares humanas para análise de metais traço usando um solubilizador de tecido orgânico. *Anal Biochem* 98:315–318.

-
- [26] Assis, R. S., Silva, U. N., Santos, L. B., Silva Melo, A., Coutinho, J. J., Cerqueira, U. M. F. M., Lemos, V. A., & Bezerra, M. A. (2024). Sample preparation strategies alternative to mineralization for elemental analysis in foods by spectroanalytical techniques – A review. *Microchemical Journal, Devoted to the Application of Microtechniques in All Branches of Science*, 199(110059), 110059.
- [27] Spellmer, J.G. Desenvolvimento de métodos de preparo de amostras para posterior determinação de As, Cd e Pb em carne e produtos cárneos. 2011. 123 p. Dissertação de Mestrado. Pós-graduação em Química Analítica. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011
- [28] Butik, M. Comparação entre métodos de solubilização alcalina e digestão ácida de tecido animal para determinação de metais usando espectrometria de absorção atômica em chama. *Revista Virtual de Química*, V. 10, n. 4, p. 1039-1055, jul. 2018.
- [29] Casé, Deliza, e Rosenthal, “Produção de ‘leite’ de soja enriquecido com cálcio”.
<https://doi.org/10.1590/S0101-20612005000100014>
- [30] Anti-nutrients in soybeans at different stages of soy milk production, *Journal of Food Science and Technology-Mysore* 44 (2007) 378-380
- [31] Protein Profile of Mature Soybean Seeds and Prepared Soybean Milk, *J. Agric. Food Chem.* 2014, 62, 40, 9893–9899
- [32] J.P. Santos Alves, U.M.F. Mata Cerqueira, C.G. Novaes, J.A. Barreto, J.S. Trindade, S.A. Araújo, M.A. Bezerra, An alkaline dissolution-based method using tetramethylammonium hydroxide for metals determination in cow milk samples, *Food Chem.* 334 (2021) 127559.
- [33] J.P. Santos Alves, U.M.F. Mata Cerqueira, C.G. Novaes, W.N.L. Santos, S.A. Araújo, M.A. Bezerra, Multivariate optimization of a goat meat alkaline solubilization procedure using tetramethylammonium hydroxide for metals determination using FAAS, *Food Chem.* 362 (2021) 130176.
- [34] M.S. Lemos, A.S. Cruz, K.G.F. Dantas, Sample preparation using TMAH and nitric acid for multielement determination in crustacean samples by MIP OES, *J. Braz. Chem. Soc.* 32 (2021) 455–461.

-
- [35] B.H. Chen, S.J. Jiang, A.C. Sahayam, Determination of Cr(VI) in rice using ion chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry, *Food Chem.* 324 (2020) 126698.
- [36] D.S. Silva, C.S. Santos, L.A. Pando, M.S.R. Gomes, C.G. Novaes, W.N.L. Santos, M.A. Bezerra, Doehlert design in the optimization of ultrasound assisted dissolution of fish fillet samples with tetramethyl ammonium hydroxide for metals determination using FAAS, *Food Chem.* 273 (2019) 71–76.
- [37] R. Manjusha, R. Shekhar, S.J. Kumar, Ultrasound-assisted extraction of Pb, Cd, Cr, Mn, Fe, Cu, Zn from edible oils with tetramethylammonium hydroxide and EDTA followed by determination using graphite furnace atomic absorption spectrometer, *Food Chem.* 294 (2019) 384–389.
- [38] N.S. Campos, M.A.L. de Oliveira, C.M.S. Izumi, R.A. de Sousa, Alkaline solubilization of chicken tissues monitored by raman spectroscopy followed by Pb determination by GF AAS, *J. Braz. Chem. Soc.* 29 (2018) 353–362.
- [39] J. Hwang, J.Y. Park, S.Y. Kim, N.E. Song, M. Yoo, Y. Choi, J.S. Nam, D. Seo, Determination of Iodine in Foods by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry After Tetramethylammonium Hydroxide Extraction, *J. Anal. Chem.* 75 (2020) 1399–1403.
- [40] M. Jiménez-Moreno, M.A. Lominchar, M.J. Sierra, R. Millán, R.C.R. Martín-Doimeadios, Fast method for the simultaneous determination of monomethylmercury and inorganic mercury in rice and aquatic plants, *Talanta.* 176 (2018) 102–107.
- [41] N.J. Clark, R. Clough, D. Boyle, R.D. Handy, Development of a suitable detection method for silver nanoparticles in fish tissue using single particle ICP-MS, *Environ. Sci. Nano.* 6 (2019) 3388–3400.
- [42] Y. Sun, Y. Yang, F.Y. Tou, Z.S. Niu, X.P. Guo, C. Liu, J. Yan, J.Y. Wu, M. Xu, L.J. Hou, M. Liu, Extraction and quantification of metal-containing nanoparticles in marine shellfish based on single particle inductively coupled plasma-mass spectrometry technique, *J. Hazard. Mater.* 424 (2022) 127383.

-
- [48] Iolanda de Jesus Ribeiro. Avaliação das concentrações dos metais chumbo, manganês e cádmio em leite de vaca e Bebidas de soja existentes no mercado português, 2020.
- [49] Ayca Karasaka. Determination of Trace and Major Elements in Vegan Milk and Oils by ICP-OES After Microwave Digestion.
- [50] Anvisa. Resolução- RDC N° 91, de 18 de outubro de 2000. Ministério da saúde