**Instituto de Química
Universidade de São Paulo**

**Determinação de alguns nutrientes e contaminantes e
avaliação da distribuição de alguns elementos em
amostras de soja transgênica e convencional, através do
acoplamento HPLC – ICP OES.**

Kalil Hussein Charanek

Tese de Doutorado

Orientadora: Profa. Dra. Elisabeth de Oliveira

São Paulo

2006

*À mulher mais importante do mundo,
Fariza,
a quem devo tudo nesta vida
e que me orgulho em chamar de Mãe,
dedico.*

*Aos meus queridos avós,
Remédios e Hussein,
que sempre cuidaram tão bem de mim
e a quem só pretendo orgulhar,
dedico.*

Agradecimentos

À minha orientadora e amiga, Profa. Dra. Elisabeth de Oliveira, para mim mais do que uma “mãe científica”, sempre ao meu lado em todas as decisões importantes, apoiando-me, aconselhando-me e, até mesmo, cobrando-me, mas com um sorriso, uma generosidade e uma bondade que nunca vi iguais.

Ao Prof. Dr. Roberto Tokoro, que sempre esteve disposto a me auxiliar, aconselhar, ouvir e apoiar, em momentos de muita dúvida e angústia.

À Profa. Dra. Wanda de Oliveira, sempre tão gentil e atenciosa.

Ao Prof. Dr. Pedro Vitoriano de Oliveira, pelo apoio e amizade durante esses anos.

Às Profas. Silvia Cozzolino e Célia Colli, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP (FCF – USP), por serem tão receptivas em seus laboratórios e estarem dispostas a contribuir para o andamento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Ralf Greiner, do Federal Research Centre for Nutrition and Food, Alemanha, pela imprescindível contribuição na determinação de ácido fítico nas amostras de soja e pelas valiosas discussões virtuais e pessoais, durante o Simpósio de Transgênicos da FCF – USP.

À Profa. Dra. Marina F. M. Tavares, pelas ricas contribuições no exame de qualificação e na defesa de tese e, principalmente, por ter cedido seu equipamento.

Ao Dr. Fernando G. Tonin, por todo o auxílio, apoio, sugestões e ricas contribuições, sem o qual este trabalho não teria se desenvolvido.

À Profa. Dra. Maria Teresa. M. de Miranda, pelas ricas contribuições no exame de qualificação e na defesa de tese.

Aos Profs. Drs. Joaquim de A. Nóbrega e Marco Aurélio Zezzi Arruda pelas contribuições para a edição final deste exemplar.

À Profa. Dra. Maria Encarnación V. Suárez-Iha, pela amizade incondicional e apoio, durante esses anos de pós-graduação.

Ao Prof. Dr. Érico Marlon de Moraes Flores, por ter disponibilizado amostras de soja transgênica para a execução deste trabalho.

À amiga Helena Chiebao, pelos conselhos, companheirismo e apoio na finalização deste trabalho.

Aos meus amigos Erasmo, Rita, Maria da Rosa, Daniela, Dari, Cíntia, por todo o apoio e amizade irrestrita durante minha passagem pelo laboratório e, com certeza, fora dele também.

Aos meus amigos de graduação, Enio, Leonardo, Patrícia, Vanessa, Lúcia, Mafê, Gisele, Cris e Lilian, por estarem sempre ao meu lado, especialmente nos momentos mais conturbados.

Aos colegas do Laboratório de Espectrometria de Emissão e Absorção Atômica, pela amizade e companheirismo durante esses anos.

À Laila Dassouki, que sempre me apoiou, em todos os momentos da minha vida.

À Mona Dassouki, por todo o apoio e carinho, apesar da distância que nos separa.

Ao Carlos Augusto Pessoa Machado, pela revisão formal do texto, pela amizade, carinho e apoio nesses últimos meses e nesta nova etapa da minha vida.

Às minhas amigas Ana, Letícia, Cícera, Carol e Josie, pelos momentos divertidos e amizade.

Ao Iuri Vovchenko Cabral, pela amizade irrestrita que perdura há tantos anos.

A toda minha família, que sempre me apoiou e incentivou.

À CAPES e FAPESP, pelo apoio financeiro.

A todos que, de alguma forma, ajudaram-me a enfrentar todos esses anos e realizar um bom trabalho.

Lista de Siglas

AGM	Alimento geneticamente modificado
AOAC	do inglês, The Association of Analytical Communities
CTNBio	Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
ES	Equivalência Substancial
ESI – MS	do inglês, Electrospray Ionisation Mass Spectrometry
FAO	do inglês, Food and Agriculture Organization
FAAS	do inglês, Flame Atomic Absorption Spectrometry
GFAAS	do inglês, Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry
HPLC	do inglês, High Performance Liquid Chromatography
ICP OES	do inglês, Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry
ICP – MS	do inglês, Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry
IQ – USP	Instituto de Química da Universidade de São Paulo
MALDI – TOF – MS ...	do inglês, Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionisation Time-Of-Flight Mass Spectrometry
OECD	do inglês, Organisation for Economic Co-operation and Development
OGM	Organismo Geneticamente Modificado
PCR	do inglês, Polymerase Chain Reaction
TRIS	Tri-hidroximetil-aminometano
WHO	do inglês, World Health Organization

Índice

Lista de Siglas	vi
Lista de Figuras	ix
Lista de Tabelas	xi
Resumo	xiii
Abstract	xiv
1. Introdução	1
1.1. Alimentos Transgênicos: Definição e Produção	2
1.2. Rotulagem de Transgênicos	7
1.3. Princípios da avaliação de segurança dos alimentos geneticamente modificados	10
1.4. Objetivos	14
2. Revisão Bibliográfica	15
2.1. Determinação do conteúdo mineral de amostras de soja	15
2.2. Acoplamento HPLC – ICP OES / ICP-MS / AAS	18
2.3. Acoplamento HPLC – ICP OES / ICP-MS para fracionamento de amostras de soja	25
2.4. Determinação da biodisponibilidade de nutrientes	26
2.5. Determinação de ácido fólico em amostras de alimentos	27
3. Materiais e métodos	29
3.1. Preparação das soluções analíticas de referência	33
3.2. Calibração do ICP OES	34
3.3. Testes de recuperação	36

3.4. Preparação do TRIS	36
3.5. Fractogel® EMD BioSEC	36
3.6. Superdex 200	37
3.7. Empacotamento das colunas	37
4. Desenvolvimento do método de solubilização das amostras de soja	40
5. Extrações e acoplamento HPLC-ICP OES	58
6. Avaliação de fatores nutricionais e anti-nutricionais das amostras de soja	81
6.1. Determinação da Análise Centesimal	81
6.2. Determinação da biodisponibilidade dos nutrientes	82
6.3. Determinação do teor de ácido fítico	84
7. Conclusões	87
8. Trabalhos Futuros	89
9. Referências	90

Lista de Figuras

Figura 1	Fluxo da informação genética	2
Figura 2	Esquema de modificação genética do milho	4
Figura 3	Bombardeamento com partículas de W recobertas com DNA	5
Figura 4	Inserção agrobacteriana, como no exemplo mostrado na figura 2	5
Figura 5	Representação esquemática do teste ELISA	9
Figura 6	Esquema do acoplamento HPLC – ICP OES, sendo necessário apenas um capilar de PTFE para conectar a saída do detector do HPLC à entrada do nebulizador do ICP OES	20
Figura 7	Representação esquemática do interior da coluna	21
Figura 8	Exemplificação da ordem de eluição	22
Figura 9	Acoplamento HPLC – ICP OES	30
Figura 10	Coluna Tricorn 10x600 mm	31
Figura 11	Distribuição hierárquica das amostras	54
Figura 12	Distribuição hierárquica dos elementos	55
Figura 13	Diferenciação do processo de centrifugação (linha azul escuro) e filtração (linha azul claro)	59
Figura 14	Separação das espécies utilizando-se fluxo de 1,0 mL min ⁻¹	60
Figura 15	Separação das espécies utilizando-se fluxo de 2,0 mL min ⁻¹	61
Figura 16	Calibração coluna Fractogel®	62
Figura 17	Perfil de separação da amostra convencional, coluna Fractogel® ...	66
Figura 18	Perfil de separação da amostra transgênica, coluna Fractogel®	67

Figura 19	Perfil de separação da amostra convencional, coluna Superdex 200	68
Figura 20	Perfil de separação da amostra transgênica, coluna Superdex 200	69
Figura 21	Perfil de distribuição de P nos dois tipos de soja (Fractogel®)	70
Figura 22	Perfil de distribuição de Mg nos dois tipos de soja (Fractogel®)	70
Figura 23	Perfil de distribuição de Zn nos dois tipos de soja (Fractogel®)	71
Figura 24	Perfil de distribuição de Zn nos dois tipos de soja (Superdex)	71
Figura 25	Perfil de distribuição de Cu nos dois tipos de soja (Fractogel®)	72
Figura 26	Perfil de distribuição de Cu nos dois tipos de soja (Superdex)	72
Figura 27	Perfil de distribuição de Mo nos dois tipos de soja (Fractogel®)	73
Figura 28	Perfil de distribuição de Mo nos dois tipos de soja (Superdex)	73
Figura 29	Perfil de distribuição de Mn nos dois tipos de soja (Fractogel®)	74
Figura 30	Perfil de distribuição de Mn nos dois tipos de soja (Superdex)	74
Figura 31	Perfil de distribuição de Fe nos dois tipos de soja (Fractogel®)	75
Figura 32	Perfil de distribuição de Fe nos dois tipos de soja (Superdex)	75
Figura 33	Perfil de distribuição de S nos dois tipos de soja (Fractogel®)	76
Figura 34	Perfil de distribuição de S nos dois tipos de soja (Superdex)	76

Lista de Tabelas

Tabela 1	Características nutricionais das amostras de soja obtidas comercialmente	33
Tabela 2	Comprimentos de onda, faixas analíticas e limites de quantificação (em solução e na massa seca) dos elementos avaliados	35
Tabela 3	Parâmetros instrumentais do ICP-OES	36
Tabela 4	Condições experimentais dos diversos métodos de digestão das amostras de soja	40
Tabela 5	Médias e desvios-padrão para os 21 elementos inorgânicos determinados na amostra A de soja (n=6)	42
Tabela 6	Médias e desvios-padrão para os elementos inorgânicos determinados na amostra de soja A, pelo método de cinzas (n=6)	43
Tabela 7	Recuperação dos elementos para os diversos métodos avaliados	44
Tabela 8	Descrição do método de digestão em microondas com cavidade	46
Tabela 9	Médias e desvios padrão para os 21 elementos inorgânicos determinados nas amostras de soja para os sistemas de microondas com cavidade (c) e focalizadas (f) (n=4)	47
Tabela 10	Teores de carbono residual para as 4 amostras, para os sistemas de microondas com cavidade(c) e focalizadas(f) (n=4)	49
Tabela 11	Faixas de concentração dos elementos analisados na literatura ($\mu\text{g g}^{-1}$)	50
Tabela 12	Médias e desvios-padrão (em $\mu\text{g g}^{-1}$) para os 15 elementos	

	inorgânicos determinados nas amostras de soja usando	
	forno com microondas focalizadas e com cavidade (n=4)	52
Tabela 13	Padrões de peso molecular e tempos de retenção para	
	a coluna Fractogel®	63
Tabela 14	Análise Centesimal (%) para amostras convencional e	
	transgênicas (n=3)	82
Tabela 15	Biodisponibilidade percentual dos elementos (n=3)	83
Tabela 16	Concentração de ácido fítico nas amostras ($\mu\text{mol g}^{-1}$, n=4)	84

Resumo

O presente trabalho realizou uma investigação da composição total dos nutrientes e alguns contaminantes presentes em amostras de soja, transgênicas e convencionais, provenientes de diferentes regiões do Brasil. Observou-se com esse estudo que, levando em conta somente o teor total dos elementos, nada pode ser afirmado em relação à modificação genética. Porém, com estes resultados, pôde ser feita uma separação das amostras por região, indicando a utilidade do método no rastreamento e certificação de origem das amostras.

Na segunda etapa, extrações da fase protéica foram realizadas, utilizando-se tampão TRIS-HNO₃ (pH 7,5), para estabilização dos complexos organo-metálicos. As espécies presentes nos extratos foram separadas e seu conteúdo mineral analisado, utilizando um sistema de acoplamento HPLC - ICP OES, valendo-se de dois tipos de fase estacionária (Fractogel® EMD BioSEC, Merck, e Superdex 200, Amershan Biosciences), a fim de se verificar como tais elementos e espécies se comportam nos dois tipos de coluna e nos dois tipos de soja, convencional e transgênica.

Pode-se observar diferença na distribuição dos elementos em relação à faixa de tamanho das proteínas, permitindo um reconhecimento entre a soja convencional e a geneticamente modificada. Contudo, testes de biodisponibilidade realizados *in vitro* mostraram que a modificação não altera a disponibilidade dos elementos, e nem o teor de ácido fítico, que é um dos principais antinutrientes presentes na soja.

Abstract

The total composition of the nutrients and some contaminants present in transgenic and conventional soybean samples from different regions of Brazil was evaluated. Considering the total content of the elements, this study showed that nothing can be affirmed in relation to the genetic modification. However, these results indicate that the tracking and geographical origin of the samples can be verified.

The extractions of the protein phase have been carried through, using TRIS- HNO_3 buffer (pH 7,5), for stabilization of the organo-metallic complexes. The species present in extracts have been separated and its mineral content has been analyzed, using HPLC - ICP OES coupled system. Two kinds of stationary phases (Fractogel® EMD BioSEC, Merck, and Superdex 200, Amershan Biosciences) were used, in order to verify the elements and species behavior in the conventional and genetically modified soybean samples.

Difference in the distribution of the elements in relation to the molecular size of proteins could be observed, allowing a recognition pattern between conventional and genetically modified soy. However, *in vitro* bioavailability experiments have shown that the modification does not affect the availability of the elements neither the phytic acid content, which is one of the main antinutrients presents in soybean.

1. Introdução

A biotecnologia consiste na aplicação dos avanços científicos e tecnológicos resultantes de pesquisas em ciências biológicas, a fim de satisfazer necessidades práticas. O desdobramento da terminologia a define como sendo o uso de organismos vivos, ou então de suas células e/ou moléculas, para a produção de substâncias de interesse comercial.^{1,2}

Embora tenha sido usada pela primeira vez em 1919 por um engenheiro agrícola da Hungria, as aplicações biotecnológicas são tão antigas quanto plantar e fabricar queijos, vinhos e pães através do uso de leveduras.¹

Durante milhares de anos, o homem foi selecionando, empiricamente, para uso alimentar, plantas que apresentassem maior rendimento, maior resistência a pragas e maior qualidade alimentar. Nas últimas décadas, com base em conhecimentos científicos, desenvolveram-se variedades de trigo, arroz, milho e soja com altos rendimentos agrícolas, necessárias para suprir as necessidades de uma população mundial crescente e urbanizada.³

Essas novas variedades foram produzidas a partir de técnicas tradicionais de cruzamento e melhoramento, envolvendo transferência de genes através de reprodução normal ou metodologias que alteram cromossomos, como a mutagênese química e a irradiação.³

A partir da década de 70, o desenvolvimento da engenharia genética e a descoberta da tecnologia do DNA recombinante permitiram ultrapassar a barreira das espécies. Estes conceitos têm definido e delimitado o que se denomina Biotecnologia Moderna.¹⁻³

1.1 Alimentos Transgênicos: Definição e Produção

Transgênico pode ser definido como todo organismo que recebe um gene de um outro, podendo ser de espécies diferentes ou não, sem o emprego de um processo de reprodução normal. Esse gene transferido pode conferir suas propriedades ao organismo que o recebe.^{1,3}

A Figura 1 representa esquematicamente como ocorre a expressão gênica em nível molecular.³

Figura 1. Fluxo da informação genética. Modificado de Transgênicos – Bases científicas da sua segurança, Lajolo e Nutti, 2003.

Na Figura 1, podem ser observadas as etapas de Transcrição do DNA (separação da dupla fita e produção do RNA mensageiro, que carrega a informação genética para a síntese de proteínas) e Tradução (a informação contida no RNA mensageiro é decodificada pelo RNA ribossômico, que é responsável pela síntese da proteína correspondente às informações traduzidas).^{1,2}

A técnica comumente empregada para a realização da inserção do gene é a tecnologia do DNA recombinante, que segue os principais passos: ¹⁻³

- Localização do gene de interesse;
- Isolamento do mesmo através do uso de endonucleases de seqüências específicas, ou uso de gene sintético;
- Ligação do fragmento a vetores de clonagem, responsáveis pela replicação do segmento;
- Inserção na célula a ser transformada;
- Regeneração da célula.

A Figura 2 apresenta as etapas da modificação do milho, resistente ao ataque de larvas de insetos. ³

Figura 2. Esquema de modificação genética do milho. Modificado de Transgênicos – Bases científicas da sua segurança, Lajolo e Nutti, 2003.

A inserção pode ser feita de duas maneiras distintas: através da infecção bacteriana, onde uma bactéria insere o gene de interesse na célula hospedeira, ou através da inserção biobalística, onde partículas de tungstênio são recobertas com fragmentos de DNA e bombardeadas para dentro da célula.^{1,3} Os dois tipos são apresentados nas Figuras 3 e 4.

Figura 3. Bombardeamento com partículas de W recobertas com DNA. Modificado de Folha de São Paulo, agosto/2000.

Figura 4. Inserção agrobacteriana, como no exemplo mostrado na figura 2. Modificado de Folha de São Paulo, agosto/2000.

A tecnologia dos organismos geneticamente modificados (OGMs), os transgênicos, é um conhecido científico recente, que data de 1973. A partir deste marco, tornou-se possível, através de um conjunto de técnicas, intercambiar genes entre espécies vivas que nunca se relacionariam de maneira natural. A introdução, eliminação e/ou remanejamento desses genes podem alterar o mecanismo de produção de proteínas no organismo geneticamente modificado,

fazendo com que ele passe a sintetizar novas substâncias, deixe de produzir proteínas que, antes da modificação genética, eram expressas; ou, até mesmo, sintetize maiores quantidades de substâncias já presentes nesse organismo.³

Entre os muitos exemplos de substâncias, produtos e organismos que têm sido obtidos, estão:

- Interferon humano (substância natural sintetizada no organismo humano para defesa contra vírus);
- Insulina humana;
- Hormônios de crescimento;
- Plantas resistentes a vírus, insetos e herbicidas;
- Plantas capazes de sintetizar substâncias de interesse farmacêutico, resistentes a condições climáticas adversas;
- Bactérias geneticamente modificadas capazes de degradar resíduos oleosos da indústria do petróleo e lixos tóxicos.^{1,3,4,5}

Na agricultura, por exemplo, a tecnologia de modificação genética pode ser benéfica no sentido de tornar as plantas resistentes a pragas, obtenção de colheitas mais abundantes, aumentar a tolerância a pressões bióticas e abióticas, possibilitar o uso de terras marginalizadas, promover suplementação nutricional, entre outros.^{1,3-7}

1.2 Rotulagem de transgênicos.

As sementes geneticamente modificadas surgiram em 1983, porém sua comercialização só tornou-se realidade 11 anos depois.^{1,3}

Nos EUA, onde 70% dos produtos alimentícios derivam de organismos modificados, e na Europa, que se opôs fortemente a essa tecnologia, as discussões em torno do tema estão avançadas. O número de pesquisas na área é considerável, e os testes de segurança ambiental e alimentar, mesmo que insuficientes, já apresentam resultados importantes.^{1,3,8}

No Brasil, somente em 1996 foram autorizados os primeiros plantios experimentais das sementes modificadas. As notícias sobre transgênicos só começaram a aparecer na mídia em 1998, com a suspensão do plantio comercial da soja modificada, produzida pela Monsanto. Os anos seguintes foram marcados por intensa disputa judicial em torno da liberação comercial do plantio de OGMs. E estas discussões se intensificaram, à medida que o Brasil foi se transformando em peça-chave no comércio mundial de sementes, já que era o único grande fornecedor que apresentava culturas isentas de modificação.^{1,3,6}

À medida que a discussão sobre os alimentos modificados e sobre as questões de comércio internacional relacionadas à biotecnologia se intensifica, observa-se a crescente tendência de distinguir, pela rotulagem, tais alimentos daqueles que não são modificados. Em vários países, a legislação para a rotulagem destes alimentos estabelece limites permissíveis de OGMs (chamados threshold levels). Logo, alimentos que contenham ingredientes geneticamente

modificados em níveis acima do permitido devem ser rotulados como “geneticamente modificados”. ^{1,3,6,8}

Na União Européia, esse limite é de 1%. No Japão, 5% para a soja. Na Austrália e Nova Zelândia, 1%, para qualquer alimento modificado geneticamente. Nos Estados Unidos não existe nenhum requerimento obrigatório para a rotulagem, pois, segundo a FDA (Food and Drug Administration), os alimentos GMs são substancialmente equivalentes aos seus análogos convencionais, não requerendo nenhum tipo de rotulagem específica, a não ser nos casos em que o conteúdo nutricional tenha sido alterado ou o produto contenha alérgenos conhecidos. ³

No Brasil, o limite permitido é de 1 %, e tanto os produtos embalados, como os vendidos a granel, que contenham ou são produzidos a partir de OGMs, deverão ser rotulados, e o consumidor deverá ser informado sobre a espécie doadora do gene no local reservado para a identificação dos ingredientes (Decreto 4680, de 24 de abril de 2003). ^{3,6}

No mercado brasileiro, o custo da implementação de rotulagem pode ser estimado em US\$ 483,585 milhões para um limite zero de tolerância, US\$ 349,935 milhões para o limite de 1% de tolerância e US\$ 262,540 milhões para o limite de 5% de tolerância. ³

A rotulagem de alimentos e ingredientes geneticamente modificados tem sido objeto de discussão no comitê do *Codex Alimentarius* para rotulagem de alimentos desde 1997, porém a questão está longe de atingir um consenso em nível mundial. ^{3,9,10,11}

Os métodos comumente empregados para detecção de OGMs são os métodos imunológicos, como o teste ELISA, apresentado esquematicamente na Figura 5, e a técnica de amplificação por PCR.^{1,3,12, 13, 14}

Figura 5. Representação esquemática do teste ELISA. Modificado de Transgênicos – Bases científicas da sua segurança, Lajolo e Nutti, 2003

Neste esquema, 1 é o anticorpo específico que se liga a proteína-alvo (no caso da soja, a proteína que confere a resistência ao herbicida), 2 é a proteína-alvo a ser identificada, e 3 é a enzima indicadora conjugada ao anticorpo específico, que catalisa uma reação de formação de cor, revelando a presença da proteína.¹⁻³

1.3 Princípios da avaliação de segurança dos alimentos geneticamente modificados.

As técnicas de produção de OGMs têm potenciais de aplicação que vão da produção de alimentos até áreas da medicina. Estas aplicações, que parecem fascinar aqueles que acreditam num futuro revolucionado pela ciência, trazem, também, preocupações para aqueles que temem suas conseqüências, que podem ser imprevisíveis e irreversíveis. ¹

As alterações genéticas envolvem efeitos intencionais, relacionados à característica do gene introduzido (como o gene que confere à soja resistência ao herbicida), e efeitos não-intencionais (previsíveis ou não), decorrentes dessa inserção ou da manipulação genética conduzida (alteração de uma via metabólica ou de um composto químico). Logo, os riscos potenciais estão associados ao novo DNA introduzido, ao produto de expressão deste DNA ou a efeitos não-intencionais. ^{1,3}

No tocante ao impacto ambiental, pode-se dizer que a agricultura moderna é intrinsecamente nociva ao meio ambiente, especialmente quando praticada com recursos ineficientes, ou quando se aplicam tecnologias que não são adaptadas às características do meio ambiente (solo, relevo, clima). A aplicação de pesticidas, fertilizantes, aração, têm resultado em severos danos ao meio ambiente, sendo que os riscos das novas tecnologias GM têm que ser considerados à luz dos riscos decorrentes do uso das tecnologias convencionais utilizadas na agricultura. ^{4,5}

A avaliação da segurança dos alimentos geneticamente modificados (AGMs) não é diferente daquela dos alimentos convencionais, baseando-se na metodologia da avaliação de risco, já usada para a avaliação da segurança dos aditivos, pesticidas, das contaminações químicas e microbiológicas em alimentos, adaptada aos riscos potenciais específicos. ^{1,3,4,5,6,8}

Comissões responsáveis pelo controle de alimentos e também pela biossegurança (FAO, WHO, CTNBio, Royal Society of London, etc.), desenvolveram protocolos de análise com o propósito de avaliar tais organismos, a fim de se determinar os níveis de risco que os mesmos podem causar quando introduzidos em uma dieta ou os possíveis impactos no ambiente.

A avaliação de segurança se fundamenta em dois princípios básicos: o de equivalência substancial e o da precaução. ^{1,3,15}

O princípio da precaução, que expressa extrema prudência, mas cuja definição e aplicação tem gerado polêmicas, trata de uma medida de gerenciamento de risco, originado na área de segurança ambiental, mas que extrapolou esse domínio. ^{1,3,15}

No Brasil, o princípio da precaução, que provém do Direito Internacional, foi adotado durante a Conferência das Nações Unidas para o Meio Ambiente e o Desenvolvimento (ECO-92), no Rio de Janeiro.

Tal princípio fundamenta-se na tomada de medidas de prevenção. A adoção de ações preventivas se justifica por várias razões, entre elas:

- A visão da vida como um complexo sistema, no qual interagem organismos e outros subsistemas;

- A consciência de que alguns danos ao ecossistema podem ser irreversíveis;
- A ocorrência de experimentos danosos, para os quais não se previu consequência negativa;
- A evidência de que sistemas naturais não geram destruição.

Ele é prudente, em sua essência. Entretanto, na prática, muitas vezes se usa o conceito de forma absoluta e, conseqüentemente, distorcida. A aplicação à segurança de alimentos implicaria exigir ausência de efeito adverso com "certeza absoluta", o que tornaria impossível a aprovação de qualquer alimento natural ou industrializado; não existe risco zero ou segurança absoluta.^{1,3,15}

Em 1993, a Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) formulou o conceito de equivalência substancial (ES) como uma ferramenta-guia na avaliação de segurança de AGMs, ferramenta que tem sido aperfeiçoada ao longo dos anos.

O conceito de ES faz parte de uma estrutura de avaliação que se norteia pela idéia de que alimentos já existentes podem servir como base para a comparação do AGM com o análogo convencional apropriado.

Nos protocolos de avaliação propostos, os fatores a serem considerados incluem a identidade, fonte e composição do OGM, o processo de transformação, o produto de expressão do novo DNA (avaliação da função e potenciais de toxicidade e alergenicidade da nova proteína), a ingestão em potencial, efeitos do processamento/cozimento, impacto da introdução do alimento na dieta e os possíveis efeitos secundários da expressão do gene (que incluem a composição em macro e

microconstituintes críticos, antinutrientes, fatores tóxicos endógenos, alérgenos e substâncias fisiologicamente ativas).^{3,10,11,16}

É com base nesse último conjunto de fatores que este trabalho se torna necessário, no sentido de realizar um estudo mais aprofundado no tocante aos valores nutricionais e os efeitos da modificação genética nestes valores.

Hoje começam a ser criados os primeiros cursos de pós-graduação no assunto, e os congressos, simpósios e cursos de atualização se tornam mais freqüentes. Mas grande parte da população ainda desconhece o que são esses organismos, quais suas vantagens e desvantagens, e qual a situação do Brasil nesse contexto.¹

Outro ponto fundamental é que grande importância vem sendo dada à modificação genética em si, porém, questões como a avaliação do conteúdo nutricional, teor de contaminantes, avaliação da biodisponibilidade dos nutrientes, ficam em segundo plano.

A determinação dos constituintes minerais nos alimentos é de fundamental importância, já que, de acordo com a quantidade em que eles são encontrados nos alimentos, é possível classificá-los quanto ao papel biológico, podendo ser considerados essenciais à nutrição humana ou tóxicos.^{17,18}

Além de quais elementos estão presentes, outra consideração a ser feita seria: a que tipos de compostos estes elementos estão ligados? Como isso afetaria suas biodisponibilidades? E mais ainda: A modificação genética também afetaria essa biodisponibilidade?

1.4 Objetivos

O presente trabalho tem como principais objetivos o desenvolvimento de método analítico para a determinação de nutrientes e contaminantes em amostras de soja, bem como o estudo da distribuição de algumas espécies minerais e elementos traço presentes nestas amostras, através do acoplamento HPLC – ICP OES. Testes de biodisponibilidade de nutrientes e determinação dos teores de ácido fítico presentes nas amostras, com o intuito de avaliar possíveis alterações nas propriedades nutricionais causadas pela modificação genética, como efeito não intencional, também serão avaliados.

2. Revisão Bibliográfica

A soja é o componente principal da dieta de vários povos de países orientais, principalmente chineses e japoneses, devido ao seu alto teor nutricional e baixo custo. Além disso, seu consumo tem aumentado não só nestes países, como em diversas regiões do globo.

O valor nutricional da soja não é o único fator responsável pelo aumento de seu consumo. O grão em si e os produtos processados vêm sendo utilizados como fontes de ω -3, vitaminas lipossolúveis, polissacarídeos e fibras, que ajudam a reduzir problemas de coração, colesterol, obesidade, doenças gastrintestinais, diabetes e osteoporose.¹⁹⁻²²

A soja e seus derivados apresentam em sua constituição a maior parte dos minerais essenciais requeridos pelos seres humanos, embora suas biodisponibilidades dependam de fatores como a presença de inibidores (ácido fítico), pH, temperatura, processamento.^{19,23}

Baseado nesses fatos torna-se necessário o desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação do conteúdo nutricional, e também de contaminantes, deste alimento.

2.1 Determinação do conteúdo mineral de amostras de soja.

A escolha das condições experimentais e do método de análise depende da forma inicial da amostra e dos objetivos do estudo. Sistemas de digestão por via úmida e digestão por via seca são os mais empregados para o isolamento dos

minerais da matriz orgânica, para posterior análise do seu conteúdo por espectrometria de absorção atômica ou emissão atômica.^{19, 24-26}

Kashlan e colaboradores²⁷ utilizaram uma etapa de secagem das amostras a 105 °C seguida de redução a cinzas pelo método da AOAC²⁸, retomando-as em HCl 25% v/v. Neste trabalho, Na e K foram analisados por espectrofotometria de chama; Ca, Mg, Fe, Cu e Mn por FAAS e P por determinação colorimétrica. O estudo foi feito com amostras de suplementos infantis à base de leite e soja, comercializados no Kuwait.

No trabalho de Spehar²⁹, amostras de soja da região do cerrado brasileiro foram trituradas e transformadas em cinzas, numa temperatura de 450 °C, por 12 h. Depois de atingir a temperatura ambiente, as amostras foram retomadas em HCl 6 mol.L⁻¹ e o teor de minerais avaliado por ICP OES (P, K, Fe, Mn, Al, Zn, Ca, Mg e Cu).

Rham e colaboradores³⁰ realizaram a determinação de Na, K, Ca e Mg por absorção atômica, após extração aquosa de amostras de farinha de soja numa proporção 1:9 m/m (farinha:água). Como o teor de fitato também seria analisado, o pH foi ajustado para o valor desejado, e a suspensão deixada sob agitação por 30 min. Após o processo de centrifugação, o resíduo sólido foi transformado em cinzas a 550 °C por 24 h. Além dos minerais citados, também foi feita determinação de N pelo método micro-Kjeldahl.³¹

Zinco, cobre e níquel foram determinados por FAAS, em amostras de farinha de soja, por Dunemann e colaboradores³², após a extração das amostras com tampão Tris-glicina (pH 8,3) a 60 °C por 2 h. Neste trabalho, os autores

fizeram a separação dos complexos metalo-protéicos por eletroforese e determinaram o teor metálico das frações por absorção atômica.

Gifford e colaboradores trabalharam com as amostras em suspensão, onde 20 mL de HCl concentrado eram adicionados às mesmas, deixando-se reagir por 20h. Após este período, as amostras eram digeridas pelo método micro-Kjeldahl e o teor de Zn e Ca determinados por FAAS.³³

Outro trabalho valendo-se do uso do método de cinzas foi realizado por Brink e colaboradores³⁴, onde as amostras eram oxidadas a 550 °C durante 16 h, e as cinzas retomadas em HCl 4 mol L⁻¹. Os teores de Mg, Ca, Zn, Cu e Fe foram determinados por absorção atômica, e Na e K por emissão atômica.

Em 1992, Dunemann e colaboradores³⁵ compararam diferentes sistemas de digestão, com o emprego de radiação microondas, em amostras ricas em gordura, e detecção por GFAAS e FAAS. Neste estudo, os autores compararam 4 métodos de preparo de amostra: digestão em microondas pressurizado (HNO₃ + H₂SO₄), microondas com frascos abertos (HNO₃ + H₂O₂), excitação com plasma a frio (HNO₃ + O₂ + N₂, 6-20 h) e digestão úmida sob pressão em autoclave (HNO₃, 4 h). Foram avaliados parâmetros como tempo de digestão, perda de analito, contaminação, precisão e teor de carbono residual.

Este último pode não afetar criticamente técnicas espectroanalíticas de determinação elementar³⁵⁻³⁷, apesar de ser um parâmetro importante para a avaliação da eficiência da digestão empregada; porém, em técnicas eletroanalíticas, que requerem destruição total do conteúdo orgânico presente na amostra, altos teores de carbono podem representar limitações na análise.^{36,38-40}

Dos métodos avaliados, o sistema de microondas pressurizado foi o que apresentou melhor desempenho, para as amostras analisadas ³⁵, porém a presença de sulfato remanescente pode ser um interferente na determinação de alguns elementos.

Outros trabalhos envolvendo digestão de amostras de soja foram publicados, porém sempre usando outro tipo de material de referência (folhas de espinafre) ⁴¹ ou avaliação de produtos derivados da mesma (óleo comestível). ⁴²

Considerando a inexistência de amostras de soja certificadas de referência para a validação de um método de análise, é necessário que esforços sejam direcionados nesse sentido.

2.2. Acoplamento HPLC – ICP OES / ICP- MS / AAS.

É impossível entender a importância nutricional de um elemento químico essencial, se não considerarmos a forma química em que os mesmos ocorrem nos alimentos. ^{19, 43,44,45}

Nutrição humana, processos bioquímicos e fisiológicos em plantas e animais, medicina e química do meio ambiente são exemplos de áreas em que a forma química, física ou biológica em que o elemento se apresenta pode identificar seus efeitos tóxicos ou benéficos.

Como a biodisponibilidade, a mobilidade e a toxicidade não são dependentes apenas da concentração total das espécies, informações sobre as formas ativas em que as mesmas estão ligadas à matriz é de suma importância; e

análises que permitem diferenciar essas formas, qualitativa ou quantitativamente, são denominadas especiação elementar.^{43,44,45, 46}

Análises de especiação elementar em matrizes orgânicas são feitas, na maior parte dos casos, com a hifenização de uma técnica de separação, como a cromatografia ou eletroforese, com uma técnica de detecção elementar, como AAS, ICP OES e ICP-MS, e, em alguns casos, uma técnica de identificação molecular (ESI-MS, MALDI-TOF-MS).^{19,43,47,48,49}

Grande parte dos trabalhos encontrados privilegia o acoplamento de cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) a um espectrômetro de emissão óptica (ICP OES), pois este oferece detecção multielementar, boa sensibilidade, além de ser facilmente acoplado ao cromatógrafo devido à similaridade das vazões empregadas (Figura 6).⁴⁸

Figura 6. Esquema do acoplamento HPLC – ICP OES, sendo necessário apenas um capilar de PTFE para conectar a saída do detector do HPLC à entrada do nebulizador do ICP OES. Modificado de Jones e Peters, Determination of Non-metals by High Performance Liquid Chromatography with Inductively Coupled Plasma Detection, *Applied Spectr. Reviews*, 38 (1), 71-99, 2003.

Existem duas maneiras de classificar os métodos de cromatografia líquida:

1. Baseando-se no mecanismo de retenção, incluindo adsorção, partição, exclusão por tamanho, afinidade e troca-iônica;
2. Baseando-se no princípio de separação, empregando-se técnicas de eluição ou substituição para remover os analitos de interesse da coluna.⁴⁸

Dentre os trabalhos que envolvem o acoplamento HPLC – ICP, grande parte deles utiliza a cromatografia de filtração em gel (exclusão por tamanho) para a separação de metaloproteínas presentes em diversos tipos de matriz.^{43-45,50,51}

Na cromatografia por exclusão, utiliza-se um suporte de gel ou similar, que fornece os poros através dos quais ocorre o mecanismo de distribuição do soluto

(entre a fase móvel dentro e fora dos poros), largamente utilizada na separação de complexos metalo-orgânicos.^{52,53}

As Figuras 7 e 8 representam o processo de separação, sendo que as moléculas menores percorrem um caminho maior dentro da coluna, já que conseguem penetrar nos poros. As moléculas maiores são eluídas primeiro, pois possuem menor opções de caminho.

Figura 7. Representação esquemática do interior da coluna. Modificado de Machado, Madari e Gerzabek, Fracionamento de substâncias húmicas do solo por cromatografia de exclusão em coluna, Comum. Téc. - Embrapa Solo, n. 3, novembro/2000, 1-8.

Figura 8. Exemplificação da ordem de eluição. Modificado de Machado, Madari e Gerzabek, Fracionamento de substâncias húmicas do solo por cromatografia de exclusão em coluna, Comum. Téc. - Embrapa Solo, n. 3, novembro/2000, 1-8.

Muitos trabalhos da literatura se dedicam a realizar estudos de especiação química de elementos tóxicos e essenciais à nutrição humana, presentes em amostras de alimentos. A grande maioria se concentra nas determinações de Hg^{43,54} e As^{43,55-58} em peixe, produtos marinhos e fluidos biológicos, e Se^{43,59-66} em plantas enriquecidas, castanhas ou suplementos alimentares.⁴³ Alguns trabalhos serão comentados a seguir.

Sur e Dunemann⁵⁵ desenvolveram um trabalho em que espécies de arsênio presentes em urina eram separadas por cromatografia de troca-aniônica, sofrendo redução para seus respectivos hidretos e analisadas por AAS, com uma interface de injeção em fluxo. As amostras avaliadas foram de urinas doadas por

voluntários após ingestão de alimentos de origem marinha. O teor do ácido dimetilarsênico aumentou cerca de seis vezes após ingestão de alimentos de origem marinha; as demais espécies encontraram-se abaixo do limite de detecção do método.

Prange e colaboradores realizaram um estudo sobre avaliação da distribuição de espécies de Ag, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Se e Zn em amostras de camarão, através do acoplamento SEC/HPLC – ICP-MS. Além dos estudos de distribuição dos elementos nas faixas moleculares dos complexos orgânicos, observou-se que As(III) é a espécie predominantemente encontrada nos extratos.⁵⁶

Outro trabalho envolvendo separação de espécies de As por cromatografia de troca iônica com determinação por ICP-MS foi desenvolvido por Coelho e colaboradores, para análise de amostras de bebidas. O método desenvolvido utilizou um pré-tratamento simples das amostras com degaseificação seguida por extração com fase sólida C18, apresentando boa recuperação para ácido arsenioso, ácido arsênico, ácido monometilarsenioso e ácido dimetilarsenico.⁵⁷

Sanz-Medel e colaboradores⁵⁹ realizaram estudo comparativo entre algumas técnicas de extração, visando determinar em qual delas ocorria maior recuperação de Se, a partir de amostras de músculo de bacalhau. Neste trabalho, uma comparação entre a separação por exclusão ou em sistema de fase-reversa foi feita, com quantificação on-line de Se por ICP-MS. Foi observado que a extração era mais eficiente quando se utilizava hidrólise enzimática (protease ou protease/lipase), e que selenometionina era o principal composto de Se identificado nestes extratos.

Ogra e colaboradores fizeram um estudo de especiação de Se e S em amostras de alho sem odor, enriquecidas com Se. As amostras foram extraídas em água desionizada e analisadas por SEC/HPLC-ICP OES. Os autores também fizeram estudos coletando as diferentes frações, com posterior etapa de pré-concentração e identificação das espécies químicas presentes em maior concentração por ESI-MS/MS.⁶⁰

Outro trabalho de alta relevância realizado por Sanz-Medel⁶⁷ e colaboradores foi a utilização do acoplamento HPLC - ICP-MS com célula de reação octopolar para a avaliação da distribuição de alguns elementos essenciais e tóxicos a nutrição humana, presentes em amostras de leite materno e leite comercial, especial para alimentação de recém nascidos. Foi observado que existe uma diferença significativa na distribuição dos dois tipos de leite, utilizados para o mesmo fim. Isto é preocupante, já que, como mencionado anteriormente^{19,23,43-46}, a biodisponibilidade dos elementos depende da forma química em que eles se apresentam nas amostras. Este fato é ainda mais relevante no caso de suplementos à base de leite para recém-nascidos, já que os mesmos não conseguem estocar alguns elementos essenciais durante seu desenvolvimento no útero.⁶⁷ Diferenças na distribuição dos elementos também foram observadas durante os diversos estágios de lactação.

Caruso e colaboradores⁶⁸ também utilizaram o acoplamento HPLC – ICP-MS para a análise de amostras de castanha provenientes do Brasil. Foi avaliado o uso de água quente, HCl e NaOH como extratores, chegando-se a conclusão que dependendo dos compostos de interesse, o sistema extrator deve ser otimizado.

2.3. Acoplamento HPLC – ICP OES / ICP- MS para fracionamento de amostras de soja.

Dunemann e colaboradores discutiram o uso das colunas de Nucleogel (Macherey-Nagel, Alemanha) e Superdex (Pharmacia) na separação das espécies presentes em amostra de soja, utilizando sistema on-line, com detecção elementar por ICP OES e ICP-MS. Foi verificado que o tipo de fase estacionária utilizada pode influenciar na separação das espécies e na recuperação dos elementos que percorrem a coluna. Foram analisados os perfis de Cu, Mn, P, S e Zn.⁶⁹

Koplik e colaboradores desenvolveram um método de separação das espécies presentes nas amostras de soja, usando uma coluna de Fractogel® EMD BioSEC (Merck), escala preparativa. Neste trabalho, a amostra era injetada na coluna cromatográfica, separada em 60 frações (recolhidas a cada 1 min), as quais eram analisadas posteriormente por ICP-MS e ICP OES para determinação do conteúdo metálico das mesmas. Foram obtidos os perfis de separação de elementos como Ca, Co, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Se e Zn.⁷⁰

Posteriormente, o mesmo grupo realizou uma comparação com o uso de uma coluna Fractogel® EMD BioSEC (Merck), separação e detecção dos elementos off-line, com o uso de duas colunas de escala analítica Superdex 75 e Superdex Peptide (de faixas de separação diferentes), desta vez realizando a separação e a detecção elementar num sistema on-line com o ICP-MS, para amostras de farinha de soja e feijão branco. Foi observado que os cromatogramas obtidos eram similares, porém a resolução era melhor no sistema on-line, já que

as determinações eram feitas em tempo real e com maior precisão. Foram obtidos os perfis de distribuição de Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, P, S, Se e Zn.⁷¹

O mesmo tipo de estudo foi realizado pelos autores para amostras de ervilhas⁷² e farinhas de centeio e milho.⁴³

2.4. Determinação da biodisponibilidade de nutrientes.

Cereais e legumes, em sua maioria, apresentam uma rica composição de fatores anti-nutricionais associados às fibras, que diminuem a biodisponibilidade dos minerais.⁷³

A biodisponibilidade de um nutriente é definida como sendo a proporção do conteúdo total do nutriente presente no alimento, refeição ou dieta que pode ser utilizado nas funções metabólicas normais. Muitos minerais e elementos traço são pouco absorvidos pelo organismo, dependendo do tipo de alimento, devido ao efeito de compostos que funcionam como “seqüestradores”, impedindo a assimilação dos mesmos. Por isso, uma dieta que combine várias classes de alimentos é recomendada.^{17,18,23,73,74}

Os métodos comumente empregados para a determinação da biodisponibilidade de nutrientes são:

1. Técnicas *in vitro*: vem sendo utilizadas desde meados de 1930 para estimar a biodisponibilidade de elementos inorgânicos essenciais, quantificando a quantidade dialisável do nutriente. Estas técnicas apresentam baixos custos e podem servir como controle de variáveis para estudos *in vivo*.

2. Balanço químico: quantificação da diferença entre ingestão e excreção de nutrientes, exigindo a coleta fecal total. Este método não permite avaliar interações dos nutrientes no organismo.
3. Depleção e repleção: usado apenas em animais, por questões de ética. Retira-se o nutriente em estudo por um determinado período de tempo, e realiza-se a determinação do mesmo quando ele é novamente adicionado à dieta.
4. Utilização de isótopos radioativos e estáveis: um dos melhores métodos para determinação da disponibilidade de nutrientes em humanos, funcionando como traçadores biológicos. Geralmente são realizados trabalhos de determinação de Ca, Zn, Fe, I e Cu. Nestes casos, são feitas análises de diversos materiais biológicos, como sangue, fezes, urina, para realizar a quantificação dos isótopos. As determinações são feitas por análise por ativação de nêutrons ou espectrometria de massa.^{23,74-76}

2.5. Determinação de ácido fítico em amostras de alimentos.

Como mencionado, o ácido fítico (myo-inositol hexafosfato), presente nas amostras de soja, é o principal responsável pela redução da biodisponibilidade dos nutrientes, devido ao seu alto potencial de complexação com os elementos (especialmente Fe e Zn).^{19,23,73,74} Ele também é a principal fonte de fósforo destas leguminosas.¹⁹

Os métodos descritos na literatura são baseados na extração da amostra com HCl. As mesmas são inseridas em uma coluna de troca iônica, para

separação dos fosfatos inorgânicos e possíveis interferentes. Os fosfatos orgânicos (ácido fítico) são determinados por métodos colorimétricos, por descoramento de solução do complexo Fe^{3+} -sulfosalicilato.⁷⁷

A separação total das frações dos myo-inositol fosfatos (com 1, 2, 3, 4, 5 e 6 grupos fosfato) pode ser realizada também por cromatografia líquida ou eletroforese capilar, como descrito na literatura.^{73,78,79}

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram analisadas amostras de soja provenientes de diferentes regiões do Brasil.

Neste trabalho foi utilizado um forno de microondas focalizadas Star 2 CEM (System) e um forno com cavidade Anton-Paar Multiwave 3000.

A determinação de elementos nutrientes e contaminantes foi feita por espectrometria de emissão óptica com plasma de Ar indutivamente acoplado (Ciros^{CCD} / Spectra Analytical Instruments) com detector simultâneo de estado sólido, faixa de comprimento de onda de 120 a 800 nm, permitindo a escolha de comprimentos de onda que apresentam sensibilidade adequada e sejam livres de interferência espectral e de matriz. O nebulizador empregado foi o de fluxo cruzado.

A separação das espécies foi feita por cromatografia líquida em escala preparativa. Foi utilizado o sistema Shimadzu de gradiente de baixa pressão equipado com bomba LC-10ADvp, sistema de controle SCL-10Avp, detector de arranjo de diodos SPD-M10Avp e injetor manual Rheodyne (alça de amostragem de 2,0 mL). O software de controle é o LC Workstation CLASS-VP. As medidas foram realizadas em 280 nm.

As análises foram realizadas em um sistema on-line (HPLC - ICP OES), através da hifenização dos instrumentos, como mostrado na Figura 9.

Figura 9. Acoplamento HPLC – ICP OES.

Pode-se observar que a conexão é muito simples de ser feita, sendo que uma tubulação de PTFE sai do detector UV/Vis do sistema HPLC e é conectada diretamente na entrada do sistema de nebulização do ICP OES, não gerando grandes mudanças na estrutura física de nenhum dos dois aparelhos. A bomba que leva a amostra até o nebulizador é mantida ligada, a fim de evitar o preenchimento da câmara de expansão e conseqüente apagamento do plasma.

A coluna utilizada foi de escala preparativa, pois inicialmente as análises seriam feitas com os equipamentos separados, recolhendo-se as frações em determinados intervalos de tempo e realizando a determinação elementar por ICP OES. A coluna é apresentada na Figura 10.

Figura 10. Coluna Tricorn 10x600 mm.

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Espectrometria de Emissão e Absorção Atômica do IQ-USP, e o cromatógrafo utilizado foi gentilmente cedido pela Profa. Dra. Marina Franco Maggi Tavares, do próprio Instituto. O trabalho contou com a ajuda do Dr. Fernando Gustavo Tonin.

A água utilizada nos experimentos foi destilada e desionizada em sistema de purificação MilliQ. Os ácidos utilizados na preparação das soluções de referência e digestão das amostras foram de grau analítico da Merck e purificado por destilação sub-boiling. O etanol utilizado (grau HPLC) bem como a fase estacionária Fractogel® EMD BioSEC são provenientes da Merck. As colunas de vidro Tricorn 10x600, o tampão TRIS e a fase estacionária Superdex 200 prep grade foram obtidos da Amershan Biosciences. Toda a vidraria e recipientes para armazenagem de soluções foram lavados com detergente, posteriormente imersos durante 24 h em solução 10% v/v de ácido nítrico e, logo antes do uso, lavados com água desionizada.

As amostras foram trituradas e peneiradas numa peneira de 290 μm de diâmetro. Foram realizados moagem em moinho de facas e moinho criogênico, com o objetivo de realizar uma comparação entre os dois sistemas.

Foram analisadas 31 amostras de diferentes regiões do Brasil (Dourados-MS, Anvio do Meio-RS, Rio Grande do Sul, Paraná, Mato Grosso, Goiás, Bahia) e Paraguai, sendo uma delas não modificada geneticamente, proveniente de São Paulo, e outras duas, modificadas, provenientes do Rio Grande do Sul. Em relação às outras 28 amostras, não se podia afirmar nada a respeito da transgenicidade.

Os dados das amostras comerciais são apresentados na Tabela 1 a seguir.

As amostras de soja transgênicas foram cedidas pelo Prof. Dr. Érico Marlon Flores, do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria – RS.

Tabela 1. Características nutricionais das amostras de soja obtidas comercialmente.

Amostra	Características	Região
Extrato de Soja Não Transgênica Mãe Terra	Em 100g:Calorias: 460 Kcal; Carboidratos: 26g; Proteína: 41g; Gordura Total: 21g; Gordura saturada: 3 g; Colesterol: 0mg; Fibra Alimentar: 10g; Ca:121mg; Fe:5mg; Na:0mg	São Paulo – SP
Proteína de Soja Texturizada Mais Vita	Em 50g:Calorias: 140 Kcal; Carboidratos: 10g; Proteína: 24g; Gordura Total: 0g; Gordura saturada: 0 g; Colesterol: 0mg; Fibra Alimentar:10g; Ca:142mg; Fe:4,9mg; Na:0mg	Cambará - PR
Extrato de Soja Mais Vita	Em 30g:Calorias: 130 Kcal; Carboidratos: 8g; Proteína: 13g; Gordura Total: 6g; Gordura saturada: 1 g; Colesterol: 0mg; Fibra Alimentar:10g; Ca:83mg; Fe: 1,5mg; Na: 65mg	Cambará – PR

3.1. Preparação das soluções analíticas de referência

As soluções analíticas de referência foram preparadas por diluição adequada de soluções-padrão de 1000 mg L⁻¹ Titrisol, Merck. As concentrações destas soluções foram de 0,1, 1, 5, 10, 50, 100 e 500 mg L⁻¹. Foram preparadas soluções multielementares de acordo com a similaridade do comportamento dos cátions metálicos. Para evitar perda dos íons por hidrólise ou adsorção, as

soluções analíticas de referência foram preparadas em solução 1% v/v de HNO_3 , a qual é utilizada também como branco analítico. Tais soluções foram utilizadas para calibração do ICP-OES e para testes de recuperação.

Para a segunda etapa do trabalho, as soluções de referência foram preparadas em meio de TRIS, que é utilizado como extrator e como fase móvel no sistema de separação.

3.2. Calibração do ICP OES

Após a solubilização e as respectivas diluições, as amostras foram analisadas pelo método da espectrometria de emissão óptica com plasma induzido de argônio (ICP OES). O mesmo foi calibrado com as soluções analíticas de referência. A Tabela 2 apresenta os comprimentos de onda escolhidos, sem interferência espectral e de matriz, as faixas analíticas, os limites de quantificação (L.Q. = 10 vezes o desvio padrão do branco expresso em concentração)⁸⁰ para cada elemento, para o método de análise com sistema de microondas focalizadas. Como será discutido mais adiante, o sistema de microondas com cavidade foi utilizado para a quantificação de Al e Fe.

A Tabela 3 apresenta os parâmetros instrumentais utilizados do espectrômetro Ciros^{CCD} / Spectra Analytical Instruments.

Tabela 2. Comprimentos de onda, faixas analíticas e limites de quantificação (em solução e na massa seca) dos elementos avaliados.

Elemento	λ (nm)	Faixa analítica (mg L ⁻¹)	Limite de quantificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Limite de quantificação ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Al	394,401	0,024 – 120	24	1,20
As	193,759	0,066 – 120	66	3,30
Ca	422,673	0,003 – 120	3	0,15
Cd	226,502	0,015 – 120	15	0,75
Co	228,615	0,036 – 120	36	1,80
Cr	284,325	0,087 – 120	87	4,35
Cu	324,754	0,012 – 120	12	0,60
Fé	261,187	0,072 – 120	72	3,60
K	766,490	0,006 – 600	6	0,30
Mg	279,079	0,063 – 120	63	3,15
Mn	293,930	0,015 – 120	15	0,75
Mo	203,844	0,027 – 120	27	1,35
Na	588,995	0,003 – 120	3	0,15
Ni	221,648	0,036 – 120	36	1,80
P	177,495	0,009 – 120	9	0,45
Pb	168,215	0,075 – 120	75	3,75
S	182,034	0,021 – 120	21	1,05
Sb	217,581	0,069 – 120	69	3,45
Se	206,279	0,087 – 120	87	4,35
Sn	189,991	0,051 – 120	51	2,55
Zn	213,856	0,015 – 120	15	0,75

Tabela 3. Parâmetros instrumentais do ICP OES.

Potência do plasma	Vazão de gás refrigerante	Vazão de gás auxiliar	Vazão do gás do nebulizador
1400 W	12 L min ⁻¹	1,2 L min ⁻¹	1,0 mL min ⁻¹

3.3. Testes de recuperação

Para comprovar a exatidão da metodologia de preparo da amostra e de determinação por ICP-OES dos elementos estudados em amostras de soja, foram realizados testes de recuperação, com adição de certo volume de uma solução de concentração conhecida antes da digestão, variando de acordo com a ordem de grandeza encontrada para cada elemento.

3.4. Preparação do TRIS⁸¹

A solução de TRIS foi preparada dissolvendo-se 24,228 g de TRIS em 900 mL de água. Procedeu-se então titulação com solução de ácido nítrico 1:1 v/v, até atingir pH 7,7. O volume então foi completado com água até 1 L, obtendo-se, assim, o tampão em pH 7,5 e concentração 0,2 mol L⁻¹, como o utilizado por Koplik e colaboradores.^{47,70,71}

3.5. Fractogel® EMD BioSEC

A estrutura das partículas do Fractogel® é consideravelmente diferente de outras resinas cromatográficas hidrofílicas. Ele é uma resina polimérica constituída de metacrilato sintético, garantindo uma excelente estabilidade de pressão,

resultando no uso de altas vazões de eluente. O meio consiste de grânulos de diâmetro de partícula entre 20 e 40 μm . Os poros que são formados entre os grãos aglomerados têm um tamanho de aproximadamente 800 Å, permitindo uma difusão livre das proteínas por entre eles. Toda a superfície é fortemente hidrofílica, devido a ligações etéreas presentes no polímero. A faixa de separação da resina é de 5 a 1000 kDa.⁸²

3.6. Superdex 200

A Superdex 200 é composta por matriz de dextran e agarose, combinando as propriedades de filtração em gel do primeiro, com a estabilidade física e química das ligações cruzadas presentes na agarose. A resina apresenta uma faixa de fracionamento de 10 a 600 kDa, com diâmetro de partículas dos grânulos variando entre 24 e 44 μm .⁸³

3.7. Empacotamento das colunas

A coluna foi empacotada de acordo com o sistema descrito no CD-ROM Column Packing – The Movie, da Amershan Biosciences⁸⁴ e também Packing a Column with Fractogel® Resins, obtido no *site* da Merck⁸⁵. O procedimento será resumidamente descrito a seguir.

A coluna de vidro deve ser primeiramente lavada com água desionizada/EtOH 20 % v/v, a fim de assegurar que as conexões e o interior estejam limpos.

A resina Fractogel® vem armazenada em uma solução de EtOH 20% v/v contendo 150 mmol L⁻¹ de NaCl, pH 7,0. Já a resina Superdex 200 vem

armazenada apenas em EtOH. Antes do empacotamento, essa solução deve ser removida, evitando assim o aumento da pressão interna da coluna devido à mistura etanol-água.

Para obter um leito empacotado estável, uma compressão de 25-30 % é considerada recomendada quando se utiliza resina Fractogel® EMD. Essa compressão se refere ao volume realmente reduzido da resina empacotada, comparado ao volume inicial adicionado. De acordo com as fórmulas apresentadas pelo *site* da Merck⁸⁵, para uma coluna de 10 mm de diâmetro e 600 mm de comprimento, 96,12 mL da solução inicial do gel são necessários.¹³ Para o empacotamento da resina Superdex, seguiu-se o guia que acompanha o produto, além da descrição do empacotamento do CD-ROM, chegando-se a 96,00 mL de resina.

Esse volume é filtrado num sistema a vácuo, obtendo-se então a resina sólida, que é lavada e retomada em água, e novamente filtrada. Esse processo é repetido de 3-4 vezes, realizando, assim, a troca do meio. Por fim, a resina é retomada no volume recomendado (96,12 mL), homogeneizada e transferida de uma só vez para o sistema montado.

Foram utilizadas duas colunas Tricorn 10x600 para realizar o empacotamento. Um mini filtro umedecido com água ou EtOH 20% v/v é colocado no fundo da coluna a ser empacotada, a fim de reter a fase móvel a ser adicionada. A solução foi transferida de uma vez para dentro das duas colunas ligadas através de uma conexão de empacotamento (simplesmente uma peça que liga uma coluna na outra). O sistema é alinhado e fechado por um adaptador. Uma conexão gota a gota é inserida no adaptador, iniciando assim o

empacotamento. Para a coluna e o gel utilizados, é recomendada vazão de 3,5 mL min⁻¹ para realizar o empacotamento, sempre obedecendo o limite máximo de pressão que a coluna suporta.

Quando o nível da resina estiver atingindo a coluna de baixo, a bomba é desligada, as colunas são desconectadas e 1 cm do gel da coluna de baixo é removido, adicionando-se água destilada para homogeneizar a parte de cima da coluna, e um mini-filtro umedecido é adicionado. A coluna é fechada e novamente a conexão gota a gota é inserida. Após 5 min, faz-se uma marca no nível de gel, trava-se a coluna e liga-se novamente a bomba, a fim de verificar se ainda ocorre movimento da fase estacionária. Em caso negativo, fecham-se as extremidades e a coluna está pronta para uso.

O desempenho da coluna pode ser testado injetando-se solução de acetona 1% v/v em água e registrando-se o sinal em 280 nm. Pôde-se, então, calcular a assimetria do pico obtido (0,98, em ambos os casos, considerado adequado para as análises).

A partir da página seguinte, serão discutidos os métodos utilizados em cada etapa do trabalho, bem como avaliação dos resultados obtidos durante o desenvolvimento das mesmas. O trabalho será dividido em três partes:

- Desenvolvimento do método de solubilização das amostras de soja.
- Extrações e acoplamento HPLC – ICP OES.
- Avaliação de fatores nutricionais e anti-nutricionais das amostras de soja.

4. Desenvolvimento do método de solubilização das amostras de soja.

Inicialmente, foram avaliados 4 métodos alternativos de digestão das amostras de soja, sendo que estes foram comparados entre si, com o método de cinzas e com a técnica de adição e recuperação de analito. As condições experimentais estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4. Condições experimentais dos diversos métodos de digestão das amostras de soja.

Método	M (g)	Reagente (mL)	T (°C)	P (W)	T (min)
1	1,00	Água	60	----	120
2	1,00	10 mL HNO ₃ conc	65 70	30 45	15 20
3	1,00	6 mL HNO ₃ conc + 4 mL H ₂ O ₂ (30%)	48 50 60 65 78	50 0 60 75 90	2 2 5 5 4
4	1,00	6 mL HNO ₃ conc + 4 mL H ₂ O ₂ (30%)	68 75	60 90	15 20

O método 1 foi uma simples extração em água a 60 °C por 2 h. Este método foi realizado para verificação dos teores dos elementos liberados durante a extração. Dunemann e colaboradores utilizaram este procedimento como método para extração da fase protéica para análise por HPLC-ICP OES.⁶⁹

Os métodos 2, 3 e 4 foram realizados em forno de microondas focalizadas Star CEM (System). Após as solubilizações, as amostras foram filtradas e avolumadas a 50 mL.

Escolheu-se uma amostra de soja para realizar os diversos tipos de solubilização e os testes de adição e recuperação dos analitos, a fim de se determinar o método mais adequado para o preparo das soluções para análise do conteúdo total. Os resultados para todos os métodos avaliados e para o de cinzas (oficial para análise de macroconstituintes em alimentos do Instituto Adolfo Lutz, onde a amostra é transformada em cinzas a 550 ° C, durante 5h)⁸⁶ estão apresentados nas Tabelas 5 e 6.

Tabela 5. Médias e desvios-padrão para os 21 elementos inorgânicos determinados na amostra A de soja (n=6).

	1	2	3	4
Al ($\mu\text{g g}^{-1}$)	$1,2 \pm 0,2$	$10,5 \pm 0,9$	$9,8 \pm 0,3$	$12,6 \pm 0,3$
As ($\mu\text{g g}^{-1}$)	< L.Q.	< L.Q.	< L.Q.	< L.Q.
Ca ($\mu\text{g g}^{-1}$)	1274 ± 39	2537 ± 19	2552 ± 26	2549 ± 50
Cd($\mu\text{g g}^{-1}$)	< L.Q.	< L.Q.	< L.Q.	< L.Q.
Co ($\mu\text{g g}^{-1}$)	< L.Q.	< L.Q.	< L.Q.	< L.Q.
Cr ($\mu\text{g g}^{-1}$)	< L.Q.	< L.Q.	< L.Q.	< L.Q.
Cu($\mu\text{g g}^{-1}$)	$4,0 \pm 0,1$	$8,5 \pm 0,2$	$8,4 \pm 0,2$	$8,5 \pm 0,1$
Fe ($\mu\text{g g}^{-1}$)	< L.Q.	117 ± 1	125 ± 7	109 ± 3
K (mg g^{-1})	$15,4 \pm 0,2$	$14,8 \pm 0,1$	$15,0 \pm 0,1$	$15,0 \pm 0,1$
Mg($\mu\text{g g}^{-1}$)	1443 ± 18	1499 ± 27	1531 ± 22	1609 ± 12
Mn($\mu\text{g g}^{-1}$)	$15,8 \pm 0,2$	$19,6 \pm 0,2$	$19,9 \pm 0,2$	$20,2 \pm 0,1$
Mo($\mu\text{g g}^{-1}$)	$1,6 \pm 0,3$	$5,9 \pm 0,2$	$5,9 \pm 0,1$	$3,8 \pm 0,5$
Na($\mu\text{g g}^{-1}$)	848 ± 49	999 ± 22	1034 ± 1	1021 ± 22
Ni ($\mu\text{g g}^{-1}$)	< L.Q.	$2,5 \pm 0,2$	$2,5 \pm 0,1$	$2,6 \pm 0,2$
P ($\mu\text{g g}^{-1}$)	2247 ± 27	2438 ± 100	2540 ± 22	2531 ± 10
Pb($\mu\text{g g}^{-1}$)	< L.Q.	< L.Q.	< L.Q.	< L.Q.
S ($\mu\text{g g}^{-1}$)	460 ± 3	1849 ± 11	1868 ± 22	2036 ± 46
Sb($\mu\text{g g}^{-1}$)	< L.Q.	< L.Q.	< L.Q.	< L.Q.
Se($\mu\text{g g}^{-1}$)	< L.Q.	< L.Q.	< L.Q.	< L.Q.
Sn($\mu\text{g g}^{-1}$)	< L.Q.	< L.Q.	< L.Q.	< L.Q.
Zn($\mu\text{g g}^{-1}$)	$16,9 \pm 0,5$	$21,4 \pm 0,9$	$22,3 \pm 0,3$	$22,8 \pm 0,9$

Tabela 6. Médias e desvios-padrão para os elementos inorgânicos determinados na amostra de soja A, pelo método de cinzas (n=6)

	Ca ($\mu\text{g g}^{-1}$)	K (mg g^{-1})	Mg ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Na ($\mu\text{g g}^{-1}$)	P ($\mu\text{g g}^{-1}$)
A	2520 ± 80	$15,0 \pm 0,3$	1750 ± 57	833 ± 11	2892 ± 72

Para finalizar o estudo do método mais apropriado, foram realizados também testes de adição e recuperação de analito. Os valores estão presentes na Tabela 7.

Tabela 7. Recuperação dos elementos para os diversos métodos avaliados.

	1	2	3	4
Al	62,1	86,0	62,2	61,9
As	82,4	88,1	82,9	83,5
Cd	75,3	93,2	58,4	82,9
Co	92,3	85,0	82,2	81,0
Cr	109,9	101	104,7	103,2
Cu	63,0	105	68,5	75,3
Fe	53,0	95,9	58,3	75,0
Mn	77,6	99,8	72,1	68,1
Mo	25,8	92,3	52,5	58,5
Ni	90,1	84,3	82,4	80,0
Pb	83,8	98,8	62,1	75,4
S	172	106	109	120
Sb	69,1	83,5	81,7	80,0
Se	57,3	98,4	63,2	57,8
Sn	138	99,5	150	16,5
Z n	72,4	99,7	67,4	64,3

De acordo com os valores de recuperação apresentados na Tabela 7, pode-se observar que o método 2 é o mais adequado para a análise, pois apresenta as melhores recuperações para todos os analitos em estudo. Além disso, a solubilização é realizada apenas com ácido nítrico concentrado, diminuindo o número de reagentes utilizados e, por consequência, o branco analítico.

Para os métodos 3 e 4, pode-se observar que a recuperação é baixa para vários dos elementos em estudo. Isto pode ser corroborado pelo fato de que a presença de água oxigenada no processo de digestão eleva a temperatura a ponto de volatilizar alguns dos elementos de interesse. Durante o estudo, foi observado que o volume final do digerido após digestão com o forno de microondas era menor do que o observado para o método 2.

O primeiro método claramente não seria o escolhido, pois vários elementos estão fortemente ligados à matriz orgânica, havendo a necessidade de sistemas mais drásticos de digestão para a liberação dos mesmos.^{19,46}

Uma observação importante é que o valor da recuperação de S é o maior dentre todos os elementos, e para todos os sistemas avaliados, principalmente no sistema aquoso. Isto pode explicado pela liberação de S proveniente das ligações presentes nas proteínas, que sofrem desnaturação quando submetidas a aumento de temperatura.

Os valores dos macronutrientes para o método de cinzas (Tabela 6) e o método 2 (Tabela 5) foram concordantes num intervalo de 95 % de confiança (teste t).⁸⁷

Depois de estabelecido este como o melhor método (2), foi realizado um estudo comparativo entre o mesmo e um método alternativo de solubilização em forno de microondas com cavidade Anton-Paar Multiwave 3000. As etapas estão descritas na Tabela 8.

Tabela 8. Descrição do método de digestão em microondas com cavidade.

M (g)	Reagente (mL)	T (°C)	T (min)
0,100	10 mL HNO ₃ (1:1)	60	7
		100	10
		140	20
		25	20

Neste caso, as amostras ficaram visualmente mais límpidas do que no sistema de microondas focalizadas, mas, a título de se acompanhar um protocolo, as mesmas foram filtradas. Como a massa de soja digerida foi menor, avolumou-se as soluções a 25 mL.

Para essa comparação, foram realizadas a abertura de 4 amostras de soja diferentes para ambos os sistemas (microondas focalizadas e com cavidade). Os resultados estão apresentados na Tabela 9. Também foram avaliados os teores de carbono residual para ambos os métodos, sendo os resultados apresentados na Tabela 10. A determinação de carbono residual foi efetuada por espectrometria de emissão atômica com plasma de argônio indutivamente acoplado, usando-se solução analítica de referência na faixa de 0,1 a 2,5 % preparadas a partir de EDTA bissódico. As condições instrumentais foram as mesmas apresentadas na tabela 2, com comprimento de onda de 247,857 nm para o carbono.

Tabela 9. Médias e desvios-padrão para os 21 elementos inorgânicos determinados nas amostras de soja para os sistemas de microondas com cavidade (c) e focalizadas (f). (n=4).

	Ac	Af	Bc	Bf	Cc	Cf	Dc	Df
Al ($\mu\text{g g}^{-1}$)	19 $\pm$ 1	13 $\pm$ 1	31 $\pm$ 3	20 $\pm$ 2	< L.Q.	3,3 $\pm$ 0,1	< L.Q.	< L.Q.
As ($\mu\text{g g}^{-1}$)	< L.Q.	< L.Q.	< L.Q.	< L.Q.	< L.Q.	< L.Q.	< L.Q.	< L.Q.
Ca ($\mu\text{g g}^{-1}$)	3167 $\pm$ 353	2991 $\pm$ 13	3363 $\pm$ 28	3152 $\pm$ 31	2517 $\pm$ 288	2719 $\pm$ 31	2259 $\pm$ 49	2660 $\pm$ 53
Cd ($\mu\text{g g}^{-1}$)	< L.Q.	< L.Q.	< L.Q.	< L.Q.	< L.Q.	< L.Q.	< L.Q.	< L.Q.
Co ($\mu\text{g g}^{-1}$)	< L.Q.	< L.Q.	< L.Q.	< L.Q.	< L.Q.	< L.Q.	< L.Q.	< L.Q.
Cr ($\mu\text{g g}^{-1}$)	< L.Q.	< L.Q.	< L.Q.	< L.Q.	< L.Q.	< L.Q.	< L.Q.	< L.Q.
Cu ($\mu\text{g g}^{-1}$)	15,3 $\pm$ 0,6	15,6 $\pm$ 0,4	22,3 $\pm$ 0,7	23,2 $\pm$ 0,4	19,7 $\pm$ 0,2	22,2 $\pm$ 0,2	18,8 $\pm$ 0,1	19,3 $\pm$ 0,6
Fe ($\mu\text{g g}^{-1}$)	188 $\pm$ 23	173 $\pm$ 5	105 $\pm$ 6	86 $\pm$ 3	56 $\pm$ 3	44 $\pm$ 3	67 $\pm$ 2	41 $\pm$ 3
K (mg g^{-1})	19,1 $\pm$ 0,8	15,2 $\pm$ 0,1	27,4 $\pm$ 0,1	25,1 $\pm$ 0,1	25,1 $\pm$ 0,3	23,1 $\pm$ 0,1	21,0 $\pm$ 0,1	21,8 $\pm$ 0,3

Continuação Tabela 9

	Ac	Af	Bc	Bf	Cc	Cf	Dc	Df
Mg ($\mu\text{g g}^{-1}$)	2197 $\pm$ 28	2021 $\pm$ 17	2916 $\pm$ 92	3067 $\pm$ 44	2913 $\pm$ 27	3083 $\pm$ 35	2296 $\pm$ 62	2477 $\pm$ 74
Mn ($\mu\text{g g}^{-1}$)	31,9 $\pm$ 0,9	33,4 $\pm$ 0,5	38,1 $\pm$ 0,6	38,6 $\pm$ 1,0	42,3 $\pm$ 0,4	43,1 $\pm$ 0,4	33,3 $\pm$ 1,1	31,0 $\pm$ 1,2
Mo ($\mu\text{g g}^{-1}$)	< L.Q.	< L.Q.	< L.Q.	< L.Q.	< L.Q.	< L.Q.	< L.Q.	< L.Q.
Na ($\mu\text{g g}^{-1}$)	1242 $\pm$ 68	1046 $\pm$ 30	482 $\pm$ 24	494 $\pm$ 27	698 $\pm$ 60	610 $\pm$ 68	448 $\pm$ 44	516 $\pm$ 49
Ni ($\mu\text{g g}^{-1}$)	< L.Q.	< L.Q.	2,2 $\pm$ 0,2	2,9 $\pm$ 0,2	< L.Q.	1,8 $\pm$ 0,4	2,5 $\pm$ 1,6	1,9 $\pm$ 0,2
P ($\mu\text{g g}^{-1}$)	2221 $\pm$ 38	2145 $\pm$ 10	3410 $\pm$ 55	3202 $\pm$ 33	2319 $\pm$ 31	2317 $\pm$ 40	2669 $\pm$ 6	2647 $\pm$ 77
Pb ($\mu\text{g g}^{-1}$)	< L.Q.	< L.Q.	< L.Q.	< L.Q.	< L.Q.	< L.Q.	< L.Q.	< L.Q.
S ($\mu\text{g g}^{-1}$)	1683 $\pm$ 33	1588 $\pm$ 9	2342 $\pm$ 45	2289 $\pm$ 21	2144 $\pm$ 14	2128 $\pm$ 45	1729 $\pm$ 10	1744 $\pm$ 63
Sb ($\mu\text{g g}^{-1}$)	< L.Q.	< L.Q.	< L.Q.	< L.Q.	< L.Q.	< L.Q.	< L.Q.	< L.Q.
Se ($\mu\text{g g}^{-1}$)	< L.Q.	< L.Q.	< L.Q.	< L.Q.	< L.Q.	< L.Q.	< L.Q.	< L.Q.
Sn ($\mu\text{g g}^{-1}$)	< L.Q.	< L.Q.	< L.Q.	< L.Q.	< L.Q.	< L.Q.	< L.Q.	< L.Q.
Zn ($\mu\text{g g}^{-1}$)	36,3 $\pm$ 0,4	34,9 $\pm$ 0,1	54,0 $\pm$ 2,8	55,2 $\pm$ 1,6	43,6 $\pm$ 5,0	43,1 $\pm$ 0,3	33,5 $\pm$ 1,0	36,7 $\pm$ 0,2

Tabela 10. Teores de carbono residual para as 4 amostras, para os sistemas de microondas com cavidade(c) e focalizadas(f) (n=4).

	Ac	Af	Bc	Bf	Cc	Cf	Dc	Df
C (%)	0,13 ± 0,01	0,62 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,63 ± 0,02	0,13 ± 0,01	0,80 ± 0,04	0,15 ± 0,02	0,66 ± 0,04

Os valores mostrados na Tabela 9, para as 4 amostras (A, B, C e D) e para os dois tipos de fornos de microondas (com cavidade e focalizadas), foram concordantes num intervalo de 95 % de confiança, com exceção a Al e Fe, que estão fortemente ligados à matriz orgânica, sendo o sistema com cavidade mais adequado para a digestão desses complexos, já que opera em condições mais enérgicas.

Observa-se também que os teores de carbono residual encontram-se ca. de 4 vezes maiores para as amostras digeridas no forno de microondas focalizadas em relação às aquelas em forno com cavidade. Contudo, observa-se pelos valores obtidos pelo teste t, que essa diferença em relação ao carbono presente na amostra, não diferencia significativamente os dois sistemas de digestão.

Pode-se observar também que para alguns elementos, apesar dos métodos concordarem entre si para a mesma amostra, existe uma variação dos teores encontrados. Esse fato pode ser atribuído à heterogeneidade da amostra. Observa-se também que no método com forno de microondas com cavidade a massa de amostra utilizada é pequena (100 mg), apresentando menor precisão, para grande parte dos elementos avaliados.

Os valores obtidos apresentaram-se semelhantes aos valores de Koplik e colaboradores^{70, 71}, para quase todos os elementos de estudo em comum,

mostrando mais uma vez a adequação do método de digestão selecionado. As faixas de concentração encontradas são apresentadas na Tabela 11 a seguir.

Tabela 11. Faixas de concentração dos elementos analisados na literatura ($\mu\text{g g}^{-1}$)

Elemento	Faixa de concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Mg	1610 - 2990
P	3850 - 7160
Ca	2806 - 3160
Fe	101 - 152
Mn	36,9 - 41,7
Cu	15,9 - 16,1
Zn	31,8 - 73,7
K	14100 - 24000
S	2530 - 3080
Se	0,60 - 0,73

Depois de definidos os métodos, foram realizadas as solubilizações de 31 amostras de diferentes regiões do Brasil (Dourados-MS, Anvio do Meio-RS, Rio Grande do Sul, Paraná, Mato Grosso, Goiás e Bahia) e Paraguai, sendo uma delas não modificada geneticamente, proveniente de São Paulo, e outras duas, modificadas, provenientes do Rio Grande do Sul. Em relação às outras 28 amostras, não se podia afirmar nada a respeito da transgenicidade. Dessa vez,

foram realizadas a digestão de 250 mg de amostra no sistema com cavidade, com o intuito de aumentar a representatividade do todo e diminuir a imprecisão.

Os resultados obtidos foram avaliados, e pôde-se observar que para Na, Ca, Cu, K, Mg, Mn, P, S e Zn, os dois métodos são concordantes num nível de 95 % de confiança. Porém os melhores resultados obtidos foram os do método com microondas focalizadas, já que a massa de amostra ainda é 4 vezes maior, gerando um desvio relativo menor.

Observa-se também que, como as condições de digestão são mais drásticas no sistema pressurizado (forno de microondas com cavidade), melhores resultados são obtidos para Al e Fe, que se apresentam fortemente ligados aos compostos orgânicos presentes na amostra ^{19,46}, sendo difícil a recuperação total destes elementos no forno com microondas focalizadas.

Nesta fase do trabalho, conseguiram-se os valores de consenso para a amostra padrão IAEA, que vinha sendo avaliada pelo Programa Interlaboratorial. Foi observado que os resultados para os métodos avaliados concordam num intervalo de 95 % de confiança com os valores de consenso.

Os valores apresentados na Tabela 12 a seguir correspondem aos melhores resultados obtidos para o forno com microondas focalizadas, com exceção de Al e Fe, que foram obtidos no forno de microondas com cavidade. Nesta mesma tabela, (n.a.) representa os elementos não avaliados na amostra de consenso.

Tabela 12. Médias e desvios-padrão (em $\mu\text{g g}^{-1}$) para os 15 elementos inorgânicos determinados nas amostras de soja usando forno com microondas focalizadas e com cavidade. (n=4).

	Al	Ca	Cr	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Mo	Na	P	Pb	S	Sn	Zn
Certif.	n.a.	2250 ± 340	n.a.	12,9 ± 1,5	182 ± 77	18210 ± 1370	2380 ± 220	35,4 ± 3,7	n.a.	435 ± 41	5050 ± 540	n.a.	n.a.	n.a.	36,4 ± 3,2
Padrão	23,6 ± 3,0	2278 ± 95	< L.Q.	12,2 ± 0,3	219 ± 7	15270 ± 238	2205 ± 6	29,1 ± 0,1	< L.Q.	453 ± 3	5165 ± 33	4,05 ± 0,65	2161 ± 12	5,52 ± 0,99	32,8 ± 1,5
A	118,0 ± 9,9	2422 ± 2	10,5 ± 0,3	12,2 ± 0,1	216 ± 3	16325 ± 20	2134 ± 15	24,8 ± 0,1	2,02 ± 0,01	335 ± 5	2881 ± 2	3,99 ± 0,13	2129 ± 6	4,32 ± 0,14	36,4 ± 1,0
B	140 ± 1	2896 ± 35	< L.Q.	16,6 ± 0,1	229 ± 7	19858 ± 27	2511 ± 18	34,1 ± 0,1	< L.Q.	398 ± 29	3761 ± 23	< L.Q.	2604 ± 35	3,38 ± 0,06	45,8 ± 3,7
C	318 ± 2	3315 ± 66	< L.Q.	16,0 ± 0,4	380 ± 2	20514 ± 287	2847 ± 57	35,3 ± 0,4	1,54 ± 0,22	940 ± 16	3797 ± 60	< L.Q.	2667 ± 43	3,52 ± 0,27	53,1 ± 2,5
D	267 ± 7	3385 ± 114	< L.Q.	15,7 ± 0,4	330 ± 2	21215 ± 414	2922 ± 85	38,4 ± 1,1	1,50 ± 0,11	1158 ± 50	3854 ± 83	< L.Q.	2685 ± 71	3,71 ± 0,08	53,5 ± 1,4
E	224 ± 20	3085 ± 32	< L.Q.	16,2 ± 0,1	519 ± 14	20263 ± 80	2581 ± 39	37,4 ± 0,4	< L.Q.	374 ± 9	3769 ± 34	< L.Q.	2508 ± 61	3,93 ± 1,17	42,5 ± 0,9
F	187 ± 21	3018 ± 3	< L.Q.	16,9 ± 0,1	293 ± 32	20095 ± 39	2587 ± 8	35,8 ± 0,3	< L.Q.	367 ± 39	3728 ± 36	< L.Q.	2566 ± 19	3,42 ± 1,12	42,1 ± 0,4
G	280 ± 61	3279 ± 65	< L.Q.	16,2 ± 0,4	331 ± 57	20377 ± 479	2818 ± 82	36,1 ± 0,7	2,03 ± 0,14	636 ± 11	3797 ± 69	3,85 ± 0,38	2652 ± 63	4,51 ± 0,82	47,0 ± 1,2
H	112 ± 17	3971 ± 25	11,0 ± 0,04	19,5 ± 0,05	371 ± 34	21651 ± 125	2883 ± 4	41,4 ± 0,3	< L.Q.	474 ± 30	3763 ± 6	< L.Q.	3157 ± 8	3,00 ± 0,07	52,2 ± 1,4
I	327 ± 23	3312 ± 81	< L.Q.	16,1 ± 0,5	391 ± 17	20862 ± 384	2887 ± 95	37,0 ± 1,6	1,72 ± 0,26	880 ± 64	3866 ± 7	< L.Q.	2710 ± 74	3,33 ± 0,64	52,8 ± 1,9
J	438 ± 11	3372 ± 55	< L.Q.	17,6 ± 0,2	431 ± 22	21069 ± 216	2896 ± 63	38,0 ± 1,0	1,58 ± 0,30	1328 ± 23	3939 ± 50	< L.Q.	2767 ± 95	3,75 ± 1,54	50,7 ± 1,7
K	78,7 ± 7,0	2650 ± 11	< L.Q.	14,6 ± 0,1	154 ± 12	17311 ± 141	2312 ± 49	28,5 ± 0,4	< L.Q.	392 ± 28	3254 ± 32	4,14 ± 0,79	2297 ± 45	4,14 ± 1,02	36,6 ± 1,8
L	138 ± 1	2863 ± 40	< L.Q.	18,7 ± 0,4	236 ± 2	20404 ± 192	2668 ± 23	36,4 ± 0,3	1,42 ± 0,01	415 ± 9	3989 ± 23	4,31 ± 0,37	2605 ± 2	4,67 ± 0,92	41,6 ± 0,9
M	180 ± 9	3045 ± 10	< L.Q.	17,0 ± 0,1	338 ± 16	20196 ± 21	2597 ± 21	35,8 ± 0,2	< L.Q.	385 ± 39	3668 ± 33	< L.Q.	2682 ± 14	< L.Q.	44,6 ± 0,9
N	64,0 ± 3,5	2652 ± 27	< L.Q.	13,8 ± 0,1	138 ± 4	17056 ± 189	2075 ± 32	27,3 ± 0,6	< L.Q.	379 ± 8	3370 ± 33	3,82 ± 0,20	2238 ± 60	5,01 ± 0,74	39,6 ± 1,1

Continuação Tabela 12

	Al	Ca	Cr	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Mo	Na	P	Pb	S	Sn	Zn
O	159 ± 5	3798 ± 72	< L.Q.	18,1 ± 0,2	287 ± 10	21041 ± 227	2923 ± 46	47,3 ± 2,5	< L.Q.	389 ± 4	3786 ± 76	< L.Q.	2897 ± 63	< L.Q.	50,7 ± 0,2
P	124 ± 30	8408 ± 447	< L.Q.	9,36 ± 0,17	260 ± 23	21616 ± 338	2989 ± 86	27,8 ± 0,9	4,05 ± 0,14	450 ± 43	3801 ± 58	< L.Q.	2797 ± 75	< L.Q.	53,1 ± 1,3
Q	130 ± 34	3264 ± 5	< L.Q.	17,2 ± 0,1	434 ± 254	21045 ± 55	2731 ± 5	36,4 ± 0,1	< L.Q.	394 ± 80	3817 ± 6	< L.Q.	2750 ± 2	2,58 ± 0,01	45,1 ± 0,8
R	111 ± 2,6	3536 ± 34	< L.Q.	13,3 ± 0,2	200 ± 6	20985 ± 96	3083 ± 14	30,7 ± 0,1	2,61 ± 0,06	458 ± 1	3695 ± 8	< L.Q.	2710 ± 18	< L.Q.	56,2 ± 0,5
S	128 ± 3	3219 ± 23	< L.Q.	17,8 ± 0,1	148 ± 1	20973 ± 12	2952 ± 17	34,2 ± 0,2	< L.Q.	407 ± 44	3964 ± 12	< L.Q.	2978 ± 3	< L.Q.	47,7 ± 0,1
T	144 ± 4	3515 ± 118	< L.Q.	17,8 ± 0,2	258 ± 21	21058 ± 269	2984 ± 44	35,0 ± 0,5	< L.Q.	445 ± 16	4033 ± 29	< L.Q.	2938 ± 26	< L.Q.	49,8 ± 3,3
U	111 ± 12	3240 ± 62	< L.Q.	16,5 ± 0,2	215 ± 24	20632 ± 226	2635 ± 18	37,6 ± 0,1	< L.Q.	412 ± 31	3691 ± 28	< L.Q.	2716 ± 18	2,84 ± 0,54	42,1 ± 0,7
V	170 ± 1	3038 ± 8	< L.Q.	17,2 ± 0,1	319 ± 4	21180 ± 1	2692 ± 14	37,1 ± 0,8	< L.Q.	422 ± 32	3921 ± 1	3,78 ± 0,80	2806 ± 44	3,01 ± 0,77	44,2 ± 0,4
W	179 ± 1	3096 ± 15	< L.Q.	16,5 ± 0,4	341 ± 37	20052 ± 60	2573 ± 16	34,6 ± 0,4	< L.Q.	420 ± 32	3597 ± 4	< L.Q.	2596 ± 33	< L.Q.	42,4 ± 0,6
X	654 ± 34	3484 ± 61	< L.Q.	16,1 ± 0,1	584 ± 31	20715 ± 166	2924 ± 3	40,4 ± 1,2	< L.Q.	1341 ± 37	3667 ± 21	< L.Q.	2708 ± 23	< L.Q.	52,2 ± 2,1
Y	86,9 ± 9,2	4279 ± 47	< L.Q.	19,0 ± 0,2	160 ± 16	22419 ± 513	3051 ± 62	42,4 ± 1,3	< L.Q.	433 ± 38	4232 ± 85	< L.Q.	3213 ± 67	< L.Q.	55,0 ± 1,5
Z	304 ± 48	3673 ± 129	< L.Q.	16,9 ± 0,6	325 ± 34	21674 ± 309	3072 ± 67	41,6 ± 2,0	1,42 ± 0,06	767 ± 10	3929 ± 56	< L.Q.	2878 ± 56	< L.Q.	51,2 ± 1,1
Conv	7,30 ± 0,22	2368 ± 12	< L.Q.	13,8 ± 0,2	61,3 ± 12,8	17727 ± 76	2228 ± 13	27,5 ± 0,1	< L.Q.	334 ± 70	3709 ± 29	3,82 ± 0,04	2333 ± 2	5,40 ± 0,40	35,6 ± 0,3
Prot	46,4 ± 3,7	2683 ± 34	< L.Q.	17,8 ± 0,5	126 ± 1	21141 ± 600	2645 ± 86	33,3 ± 1,0	1,46 ± 0,01	447 ± 2	4381 ± 86	< L.Q.	2890 ± 100	4,54 ± 1,55	46,6 ± 1,2
Trans1	5,43 ± 0,49	2717 ± 29	5,76 ± 0,46	9,84 ± 0,07	65,5 ± 3,9	15896 ± 194	2029 ± 47	33,2 ± 0,5	< L.Q.	1328 ± 115	4088 ± 64	< L.Q.	2048 ± 43	< L.Q.	31,0 ± 0,3
Trans2	2,23 ± 0,18	3083 ± 51	6,12 ± 0,20	10,1 ± 0,3	55,1 ± 4,00	15455 ± 152	2001 ± 24	31,8 ± 0,3	< L.Q.	1313 ± 80	3839 ± 75	< L.Q.	1967 ± 23	< L.Q.	36,3 ± 0,4

Com os dados obtidos, foi aplicado o programa SPSS⁸⁸ para construção dos dendogramas e verificação da distribuição hierárquica das amostras e dos elementos, apresentados nas Figuras 11 e 12, respectivamente.

Figura 11. Distribuição hierárquica das amostras.

Dendrograma: Método de Ward

Figura 12. Distribuição hierárquica dos elementos.

Através do dendrograma de distribuição das amostras (Figura 11), fica muito clara a separação das mesmas em 2 grupos, com menos de 75 % de similaridade. Entre os grupos, a similaridade entre as amostras se aproxima de 95%. Analisando-se os valores de concentração obtidos, pode-se observar que as amostras Trans1, Trans2, Ref, A, K, N e Conv estão separadas do grupo maior já que, em quase todos os casos, o teor dos elementos presentes nestas amostras é inferior ao de todas as outras, que apresentam, na maioria das vezes, composição semelhante. Observa-se que Al, Ca, Fe, K, P, S, e Zn estão em menor concentração nestas amostras. Outro fato importante é que, dentro deste pequeno grupo, as amostras transgênicas são diferenciadas em outro subgrupo, devido ao seu elevado teor de Na (em torno de $1,3 \text{ mg g}^{-1}$).

Para o grupo maior, as amostras também estão divididas em subgrupos, sendo que os dois subgrupos maiores correspondem ao conjunto de amostras provenientes de Dourados-MS e Anvio do Meio-RS. As amostras do Paraná e Paraguai estão reunidas em outro subgrupo, e a da Bahia está isolada das outras, devido ao elevado teor de Ca encontrado (ca. de $8,5 \text{ mg.g}^{-1}$).

Pode-se observar, a partir deste dendograma, que as amostras podem ser separadas por região, dependendo da sua composição total, funcionando como marcadores de origem e rastreabilidade.^{44,89}

Pelo dendograma dos elementos, Figura 12, observa-se que todos os nutrientes foram agrupados numa similaridade maior que 95%, com exceção do K, que está presente em maior concentração do que todos os outros ($15\text{-}20 \text{ mg.g}^{-1}$, aproximadamente). Os outros elementos estão divididos em dois subgrupos menores: Mg, S, P e Ca (macroconstituintes) e Mn, Zn, Cu, Al, Fe e Na (também nutrientes, mas presentes em menor concentrações, com exceção do Na em algumas das amostras).

Vale ressaltar que o teor de Na rotulado para as amostras Prot e Conv, apresentados na Tabela 1 (Proteína de Soja Texturizada e Extrato de Soja Não Transgênica, respectivamente) é de 0 mg, bem diferente dos valores encontrados durante os experimentos.

Os valores de Pb, Sn, Mo e Cr não foram considerados na construção do dendograma por estarem presentes em baixa concentração nas amostras, sendo os teores apresentados na Tabela 12 próximos aos limites de quantificação do método, para a maior parte dos casos.

Para Pb, os valores obtidos foram maiores do que o controlado pela legislação brasileira para cereais ($0,50 \mu\text{g g}^{-1}$)²³, com exceção às duas amostras transgênicas, que apresentaram valores abaixo dos limites do método. Este fato pode ser entendido como possíveis contaminações ambientais no solo e nas folhas de soja.

Para Cr, os valores obtidos também são maiores do que o permitido pela legislação ($0,10 \mu\text{g g}^{-1}$)²³, chegando a ultrapassar o valor de $5 \mu\text{g g}^{-1}$ para as amostras transgênicas e $10 \mu\text{g g}^{-1}$ para uma amostra do Rio Grande do Sul e outra de Goiás. A quantidade de Cr varia consideravelmente entre diferentes lotes de alimentos, já que a mesma pode ser influenciada por fatores biogeoquímicos.

Os teores de As, Cd, Co, Sb e Se, estavam abaixo do limite de determinação, indicados na tabela 2. Alternativas para proceder à determinação destes elementos seria a utilização do sistema de geração de hidretos acoplado ao ICP OES, ou então análise por ETAAS.

Os valores encontrados para Se na literatura também se apresentam acima dos valores controlados por nossa legislação ($0,30 \mu\text{g g}^{-1}$).^{23,71}

Cabe lembrar também que os valores controlados pela legislação são para as amostras na forma de consumo (após algum processo, como cozimento, por exemplo), não tendo sido esse o objetivo principal do presente estudo.

5. Extrações e acoplamento HPLC-ICP OES

Nesta etapa do trabalho foram realizados os testes de extração com solução de TRIS.

A princípio foram utilizados 5 g de amostra e 50 mL do TRIS para a preparação dos extratos. Após 1 h de extração a temperatura ambiente, os extratos foram centrifugados a 16000 g durante 20 min. Muitas vezes a etapa de centrifugação teve de ser repetida com o intuito de obter o extrato mais límpido possível, evitando problemas de entupimento da coluna. Apesar de tedioso, é o método mais adequado, já que filtração dos extratos à vácuo foi realizada, porém observou-se perda dos metais e das proteínas, provavelmente retidos no filtro utilizado. As diferenças nos perfis cromatográficos podem ser vistas na Figura 13.

A fase móvel utilizada também foi o TRIS 0,2 mol L⁻¹, pH = 7,5, considerado o extrator mais adequado para assegurar a estabilidade das moléculas de proteína e não introduzindo nenhum íon metálico na amostra. O pH do extrator e da fase móvel deve ser maior que 7, a fim de evitar a precipitação das proteínas (a maior parte das proteínas da soja são globulinas 7S e 11S, que apresentam ponto isoelétrico de 4,8 e 6,4, respectivamente).^{19,70,71,72}

Foram realizados testes utilizando 2,0 mL de amostra e vazões de 1,0, 1,5 e 2,0 mL min⁻¹. Não houve significativa melhoria na resolução das bandas, tendo sido escolhido então o fluxo de 2,0 mL min⁻¹. As Figuras 14 e 15 apresentam os cromatogramas das separações realizadas em 1,0 e 2,0 mL min⁻¹, respectivamente, para a resina Fractogel®; os resultados foram semelhantes para a resina Superdex .

Figura 13. Diferenciação do processo de centrifugação (linha azul escuro) e filtração (linha azul claro).

Figura 14. Separação das espécies utilizando-se vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$.

Figura 15. Separação das espécies utilizando-se vazão de $2,0 \text{ mL min}^{-1}$.

Com os padrões de proteína adquiridos pela Sigma-Aldrich foi possível realizar a calibração das duas colunas. A seguir serão mostrados os cromatogramas de calibração da coluna Fractogel®, que foi semelhante ao da coluna Superdex 200. Os padrões, bem como os tempos de retenção, obtidos através da Figura 16, encontram-se listados na Tabela 13.

Figura 16. Calibração coluna Fractogel ®

Tabela 13. Padrões de peso molecular e tempos de retenção para a coluna Fractogel®.

	Peso Molecular (Da)	tr (min)
Blue Dextran	2000000	7,55
Tiroglubulina	669000	8,19
Apoferitina	443000	8,51
β -amilase	200000	9,27
Álcool desidrogenase	150000	9,70
Albumina	66000	10,17
Anidrase carbônica	29000	12,10
Citocromo C	12400	14,45
Aprotinina	6500	19,78

Quando se realizou o acoplamento, foi observado que para Ca, K, Na e P os picos de concentração saturaram o detector em determinados pontos da análise. Tentou-se então preparar extratos mais diluídos, com 1,0 e 0,5 g de amostra. Porém, para Ca, K e P, mesmo com massa menor de amostra, em alguns pontos o sinal saturava o detector. Tentou-se então utilizar mais de um comprimento de onda para realizar as medidas dos mesmos, com exceção do K. Porém, não se obteve sucesso com os resultados de Ca, que ainda atingiam a saturação do detector do equipamento.

Uma alternativa para este problema seria o uso de alças de amostragem de volume menor, porém, quando são empregadas colunas de escala preparativa, não há sentido em usar volumes discretos de amostra na injeção, devido a problemas de dispersão durante a separação cromatográfica.

Para a coluna de Fractogel®, foram analisadas a amostra convencional e as transgênicas em 5 replicatas de cada. Para a coluna Superdex 200, 2 replicatas foram analisadas, sendo que neste caso efetuaram-se extrações de 5 g para todas

as amostras, já que foi visto que os testes com menor massa de amostra não foram relevantes.

Foram avaliadas também, na coluna de Fractogel®, uma amostra da Bahia, Paraguai e Paraná, estas em duplicata. Na coluna Superdex, foram analisadas amostras de Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Rio Grande do Sul.

Cabe ressaltar que esta é a primeira vez que se realiza este tipo de teste com a resina Fractogel®, com hifenização dos aparelhos. Até então a literatura descrevia apenas situações de análise off-line. É a primeira vez também que uma coluna de Superdex 200 vem sendo empregada na avaliação de amostras de soja.

Os cromatogramas de absorbância para a amostra convencional e uma das amostras transgênicas, são apresentados nas Figuras 17 - 20, para os dois tipos de coluna. Já os perfis de distribuição dos elementos nestas mesmas amostras estão apresentados no conjunto de Figuras 21 – 34. A amostra convencional é representada em rosa, e a transgênica em azul escuro.

Pode-se observar durante a análise que, quando se empregava a coluna Superdex, os valores de P e Mg saturavam o detector. Foi realizada a determinação em mais de um comprimento de onda, mas não foi possível realizar a construção de todo o perfil de concentração, para os dois elementos.

Os resultados obtidos mostraram que as duas colunas apresentam comportamento semelhante, mas não idêntico. Observou-se no uso da coluna Superdex uma melhora na resolução dos picos (tanto no perfil de concentração como no cromatograma). Isto corrobora o que já foi discutido por Dunemann e colaboradores ⁶⁹ e Koplik e colaboradores ⁷¹: o tipo de coluna empregada na análise influencia a resolução da mesma, já que a troca de fase estacionária

implica em mudança na interação da mesma com os compostos presentes no extrato.

Os perfis cromatográficos de absorbância e concentração das outras amostras não serão apresentados, para nenhuma das resinas, pois seguem exatamente o perfil da amostra convencional. O perfil da segunda amostra transgênica é exatamente igual ao da primeira, para as duas colunas empregadas.

Figura 17. Perfil de separação da amostra convencional, coluna Fractogel®.

Figura 18. Perfil de separação da amostra transgênica, coluna Fractogel®.

Figura 19. Perfil de separação da amostra convencional, coluna Superdex 200.

Figura 20: Perfil de separação da amostra transgênica, coluna Superdex 200.

Figura 21. Perfil de distribuição de P nos dois tipos de soja (Fractogel®)

Figura 22. Perfil de distribuição de Mg nos dois tipos de soja (Fractogel®)

Figura 23. Perfil de distribuição de Zn nos dois tipos de soja (Fractogel®)

Figura 24. Perfil de distribuição de Zn nos dois tipos de soja (Superdex).

Figura 25. Perfil de distribuição de Cu nos dois tipos de soja (Fractogel®)

Figura 26. Perfil de distribuição de Cu nos dois tipos de soja (Superdex).

Figura 27. Perfil de distribuição de Mo nos dois tipos de soja (Fractogel®)

Figura 28. Perfil de distribuição de Mo nos dois tipos de soja (Superdex).

Figura 29. Perfil de distribuição de Mn nos dois tipos de soja (Fractogel®)

Figura 30. Perfil de distribuição de Mn nos dois tipos de soja (Superdex).

Figura 31. Perfil de distribuição de Fe nos dois tipos de soja (Fractogel®)

Figura 32. Perfil de distribuição de Fe nos dois tipos de soja (Superdex).

Figura 33. Perfil de distribuição de S nos dois tipos de soja (Fractogel®)

Figura 34. Perfil de distribuição de S nos dois tipos de soja (Superdex).

Pode-se observar que a distribuição dos elementos nos dois tipos de soja (convencional e transgênica) se dá de maneira diferente em relação à faixa de tamanho dos compostos fracionados, para os elementos analisados, com exceção de Mo.

Essa diferenciação às vezes acontece pela aparição de um novo pico que não existia na amostra convencional, como nos exemplos de Mn e S; às vezes pelo desaparecimento de um pico, como no caso do Mg; e por fim por uma inversão na quantidade de determinadas frações, como é visto no caso de Fe e P.

As amostras provenientes da Bahia, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Paraguai, Paraná e Rio Grande do Sul apresentam distribuição semelhante para todos os elementos, entre si, e também com a soja não modificada (nos dois tipos de colunas empregadas). Isto nos leva a crer que tais amostras também sejam convencionais, e que este método em estudo pode ser de grande importância na verificação da transgenicidade ou não de amostras desconhecidas, tendo em mãos padrões que sejam garantidamente convencionais e transgênicos, como base de comparação.

Como observado, com os perfis de concentração, observa-se que existe uma clara diferenciação entre as amostras convencionais e as geneticamente modificadas. Se pensarmos em termos bioquímicos, essa diferenciação deveria ser realmente esperada, já que a função de uma proteína é determinada principalmente por sua estrutura ². Quando ocorre a modificação, um novo gene é introduzido, e este expressará um novo tipo de proteína, com outra função e, por conseqüência, uma nova estrutura. É de se esperar que nesta nova estrutura, elementos metálicos, P e S (responsável pela formação das ligações de sulfeto),

estejam posicionados de maneira distinta ao análogo convencional, justificando a diferenciação na distribuição elementar observada.

As amostras analisadas apresentam a mesma idade, sendo este também um dos fatores que pode influenciar a mudança na alocação de elementos minerais e proteínas dentro da célula. Isto garante que as diferenças observadas não são relacionadas à diferença nos estágios de crescimento.

As amostras transgênicas provenientes do Rio Grande Sul apresentam perfis distintos das amostras não rotuladas, oriundas do mesmo Estado. Estas últimas apresentam perfil semelhante ao da amostra convencional, do Estado de São Paulo. Logo, a diferença de solo (ou região) parece não afetar também a distribuição das espécies.

Algumas limitações podem ser mencionadas sobre a técnica empregada:

- A separação nestes tipos de resinas é mais indicada para moléculas globulares, sendo que outros tipos de moléculas apresentam interação não-específica com a coluna;
- A precisão não é tão boa quanto em separações em fase reversa, já que muitos compostos de tamanhos próximos podem co-eluir em uma única banda, e a diferença de segundos no tempo de retenção entre uma separação e outra, gera uma diferença considerável na determinação dos tamanhos;
- Como observado, existe uma diferença muito grande entre uma coluna e outra, para alguns elementos, em determinadas faixas de tamanho. Isto pode ser relacionado à diferença no processo de

separação em cada tipo de resina, sendo que uma banda pode corresponder a mais de um composto e, quando a resolução destes compostos se altera, pode haver migração de uma banda para outra, justificando a diferença nas faixas de tamanho encontradas.^{69,71}

Vale também mencionar que em alguns casos, pode-se relacionar os complexos obtidos nos perfis cromatográficos de concentração, com alguns compostos já caracterizados na literatura, como por exemplo a presença de uma fração que contém Fe na região de 28 kDa relacionada à ascorbato peroxidase, que apresenta um cofator do grupo heme (presença de íons de Fe); ou então as frações de 33 - 35 kDa dos elementos S, Cu e Mn, presentes em proteínas de armazenamento em grãos de soja, nesta mesma faixa de tamanho.⁹⁰

Estudos de caracterização podem ser realizados de maneira mais precisa utilizando sistemas de separação como eletroforese bidimensional em gel, e posterior determinação do conteúdo metálico das frações obtidas através de ICP OES, ICP – MS ou AAS. Além disso, técnicas como MALDI – TOF – MS, ESI – MS e fluorescência de raio-X também podem ser aplicadas para este fim.^{49,91,92}

Como alimentos de origem vegetal, apesar de serem fontes significativas de proteínas, são considerados incompletos ou parcialmente incompletos em relação ao conteúdo de aminoácidos (as proteínas de origem animal são completas, em sua maioria), e constituem a totalidade de dietas vegetarianas,²³ a diferença nas distribuições destas espécies pode ser um fator preocupante, como no caso do trabalho de Sanz-Medel e colaboradores, que apresenta diferenças significativas

na distribuição de alguns nutrientes em amostras de leite materno e fórmulas comerciais, que são utilizados para o mesmo fim.⁶⁷

Além de serem consideradas incompletas, as proteínas vegetais geralmente são acompanhadas por fatores antinutricionais, como fibras, fitatos e inibidores enzimáticos. Ferro, zinco e cálcio são os elementos mais afetados pela redução de biodisponibilidade em dietas vegetarianas, devido às características especiais das mesmas.^{19,23}

6. Avaliação de fatores nutricionais e anti-nutricionais das amostras de soja.

6.1. Determinação da Análise Centesimal.

Esta etapa do trabalho foi realizada em conjunto com a Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, contando com apoio das professoras Silvia Cozzolino e Célia Colli. A Análise centesimal é a determinação dos teores de umidade, gordura, lipídeos, minerais fixos e carboidratos presentes na amostra de interesse. Os métodos utilizados são de uso corriqueiro, e estão vastamente descritos na literatura de análises de alimentos e livros de química analítica.^{86,93,94}

Os experimentos realizados foram os seguintes:

- Determinação de umidade ou voláteis através de aquecimento à 105 °C até peso constante da amostra (ca. de 8 h);
- Determinação de lipídios através de extração etérea, como uso do extrator Soxhlet, com posterior evaporação do solvente;
- Cinzas ou resíduo mineral fixo, com aquecimento à 550 °C;
- Determinação de proteínas (nitrogênio de Kjeldahl);
- Carboidratos totais (carboidratos e fibras), por diferença.

Os resultados estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14. Análise Centesimal (%) para amostras convencional e transgênicas (n=3).

	Umidade	Lipídios	Proteínas	Cinzas	Carboidratos Totais
Convencional	7,91 ± 0,02	27,94 ± 0,95	41,40 ± 0,84	4,80 ± 0,12	17,95 ± 0,68
Trans 1	10,03 ± 0,33	21,17 ± 1,32	36,26 ± 0,77	4,57 ± 0,05	27,97 ± 1,09
Trans 2	10,19 ± 0,05	22,48 ± 1,10	36,44 ± 0,06	4,64 ± 0,12	26,25 ± 0,86

6.2. Determinação da biodisponibilidade dos nutrientes

Esta etapa do trabalho foi realizada em conjunto com o laboratório da Profa. Dra. Célia Colli, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

Para tanto, seguiu-se como base o trabalho de Miller e colaboradores⁷⁶, o qual desenvolveu um método para estimar a quantidade de ferro disponível em diversos tipos de alimento, simulando a digestão gastrointestinal (*in vitro*). Apesar do trabalho ser destinado a análise de ferro apenas, foi feita a avaliação dos outros elementos de interesse, já que o trabalho estava sendo desenvolvido com uma técnica de análise multielementar.

O procedimento experimental foi o seguinte:

- Amostra triturada e homogeneizada é exposta à pepsina (pH = 2), num banho de agitação horizontal, por 2 h, a 37 °C. Mede-se a acidez após esse período;
- Uma alíquota do digerido é retirada, transferida para outro frasco, e neste se adiciona uma vesícula de diálise, contendo solução de bicarbonato de sódio equivalente para titular a acidez encontrada na etapa anterior;
- Selam-se os frascos com parafilme, e retorna-se à incubação a 37 °C, por 30 min, aproximadamente, até que o pH atinja valor 5;
- Término da digestão é realizado após a adição de pancreatina e sais biliares, e incubação por 2 h;
- O Fe proveniente da digestão atravessa a membrana semipermeável (baixo peso molecular), sendo utilizado como indicador da biodisponibilidade.

Os resultados encontram-se na Tabela 15.

Tabela 15. Biodisponibilidade percentual dos elementos (n=3).

	Cu	Fe	Mg	Mn	P	S	Zn
Conv	39,63 ±	2,56 ±	22,53 ±	15,44 ±	23,08 ±	11,04 ±	10,13 ±
	0,49	0,48	0,21	0,84	0,86	0,33	0,08
Trans 1	38,72 ±	2,24 ±	25,77 ±	14,75 ±	17,13 ±	10,33 ±	18,74 ±
	0,86	0,04	0,73	0,89	0,63	0,49	0,96
Trans 2	41,16 ±	2,96 ±	27,95 ±	19,10 ±	19,49 ±	10,98 ±	17,98 ±
	1,12	0,71	0,20	0,76	0,62	0,06	1,01

6.3. Determinação do teor de ácido fítico

A determinação do ácido fítico presente nas amostras foi realizada pelo Prof. Dr. Ralf Greiner, do Federal Research Centre for Nutrition and Food - Centre for Molecular Biology, da Alemanha. Este professor já havia sido convidado pela Profa. Celia Colli, para realizar práticas e ministrar palestras sobre seu trabalho, no ano de 1999. Em maio de 2006 ele esteve de volta ao Brasil, com o mesmo objetivo.

Para a determinação dos fitatos, a amostra é seca, liofilizada, triturada e peneirada. Adiciona-se 20 mL de HCl (2,4 %) a 1g da mesma, deixando-se agitar por 3 h a 20 °C, em agitador horizontal. A amostra então é centrifugada a 16000 rpm, por 30 min, e o sobrenadante é recolhido e armazenado congelado. A amostra é descongelada e centrifugada novamente, até a obtenção de um extrato límpido. 2,0 mL do extrato são levados a 50 mL, com água bidestilada. Os fosfatos inorgânicos são removidos através de uma coluna BIORAD de troca iônica. As varias frações dos fosfatos orgânicos são separadas por cromatografia de fase reversa, sendo medidos num detector de índice de refração.⁷⁹ Os resultados obtidos para as mesmas amostras analisadas nas Seções 6.1 e 6.2 anteriores, são apresentados na Tabela 16.

Tabela 16. Concentração de ácido fítico nas amostras ($\mu\text{mol g}^{-1}$, n=4)

Convencional	21,51 $\pm$ 0,74
Transgênica 1	21,07 $\pm$ 0,45
Transgênica 2	17,98 $\pm$ 0,40

Com os três conjuntos de resultados mostrados nas Tabelas 14,15 e 16, pode-se perceber que a modificação genética parece influenciar pouco as características nutricionais da soja.

Com os dados de análise centesimal, observa-se que existe uma menor quantidade de proteínas e lipídios na soja modificada, que é contra-balanceada pelo teor de umidade e de carboidratos totais. Sabe-se que a soja é uma grande fonte vegetal de proteínas, sendo que sua composição encontra-se na faixa dos 40 %. ¹⁹ Este teor pôde ser encontrado nos dois tipos de soja avaliados.

Quanto a biodisponibilidade, sabe-se que o ácido fítico é um importante fator antinutricional presente na soja. Sua presença reduz a biodisponibilidade de alguns metais e fósforo, devido à formação de um quelato insolúvel que não consegue ser absorvido pelo intestino sob condições fisiológicas. Além disso, ele também inibe a ação de algumas proteínas importantes responsáveis pela digestão (em pH baixo), como α -amilase, pepsina e tripsina. ^{19,23}

Tendo isso em vista, pode-se observar que a soja convencional e a primeira soja transgênica (soja Trans 1) são as que apresentam menor biodisponibilidade para quase todos os elementos avaliados (Tabela 15), pois são as que apresentaram maior teor de ácido fítico (Tabela 16). Vale ressaltar também que a soja Trans 2 apresenta um menor teor de fitato e, por conseqüência, maior disponibilidade. Apesar de ter sido realizado um número reduzido de análises, esses resultados se repetem para amostras avaliadas pelo grupo do Departamento de Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, sendo plausível formular a hipótese de que a modificação genética não deve alterar a produção de fitatos pelo grão, já que temos duas sojas diferentes (Convencional e

Trans 1), com teores similares do quelante e biodisponibilidades próximas, para a maioria dos elementos; e duas sojas modificadas (Trans 1 e 2), com teores diferentes de fitato e de biodisponibilidade.

Pode-se concluir que a modificação, apesar de alterar a distribuição dos elementos nas diferentes frações protéicas, não altera a disponibilidade nutricional dos mesmos.

7. Conclusões

De acordo com os métodos avaliados, foi possível realizar as solubilizações de 31 amostras de soja, algumas comerciais e outras não. Duas destas amostras são transgênicas e uma delas não é modificada geneticamente. Não se sabia nada a respeito de modificação sobre as outras, que são provenientes de diferentes regiões do Brasil (MS, MT, RS, BA, PR) e Paraguai.

Pôde-se observar que as amostras puderam ser agrupadas de acordo com a região, na maioria dos casos. Isso corrobora o fato de que o conteúdo mineral total pode ser utilizado como um traçador de origem, além de indicativo de poluição, toxicidade e posição geográfica.

Recomenda-se para Na, Ca, Cu, K, Mg, Mn, P, S e Zn, o uso de forno com microondas focalizadas, já que maior massa de amostra é utilizada levando a um desvio relativo menor, implicando em menor problema de homogeneidade. E, para Al e Fe o uso de forno com cavidade, pois os mesmos se apresentam fortemente ligados aos compostos orgânicos presentes na amostra, sendo difícil a recuperação total sem uso de sistema pressurizado.

As duas amostras transgênicas analisadas se diferem claramente das outras por apresentarem, além do alto teor do elemento Na, valores baixos (na verdade, os menores dentre todas as amostras analisadas) de Al e Fe.

No tocante ao processo de extração e separação das espécies, conseguiu-se realizar o acoplamento dos instrumentos de maneira simples e eficiente, sem grandes mudanças nas estruturas físicas de nenhum deles.

As análises foram efetuadas sem grandes problemas, e os resultados obtidos foram de grande importância na verificação da distribuição dos elementos em relação aos compostos presentes na soja.

Conforme descrito na literatura, a interação dos complexos protéicos com a fase estacionária difere de coluna para coluna, sendo que a coluna Superdex 200 apresentou melhor resolução na separação dos picos.

Com o método descrito, pôde-se perceber uma clara diferença de distribuição dos elementos avaliados entre as amostras modificadas e a convencional, para os dois tipos de resina empregados.

As outras amostras analisadas seguiram o perfil de distribuição da não modificada, também para as duas resinas, sendo um forte indício de que estas também não sejam modificadas. Logo, o método utilizado pode ser um indicativo de transgenicidade da amostra e da composição de amostras de soja.

Ponto importante a ser salientado é que o empacotamento da coluna também é simples de ser realizado.

A etapa mais trabalhosa do estudo da separação das espécies é a centrifugação, que muitas vezes tem que ser repetida devido ao alto teor de gordura das amostras.

Foram realizadas as determinações dos teores de gordura, proteínas, umidade, minerais fixos e carboidratos totais, para amostras convencionais e transgênicas.

Os teores de ácido fítico e a biodisponibilidade de alguns minerais também foram avaliados, para as mesmas amostras. Com estes resultados, pode-se

concluir que a modificação genética não deve alterar os fatores nutricionais da soja, apesar dos minerais estarem distribuídos de maneira distinta.

A modificação da soja, pelo menos em curto prazo, parece ser um processo que não apresenta efeitos não-intencionais ligados à saúde humana.

O que se pode inferir deste trabalho é o que já foi discutido por Michael Marsh⁹⁵: as tecnologias de engenharia genética apresentam um futuro promissor, podendo trazer grandes benefícios à humanidade, desde que sejam usadas com precaução e de maneira ética.

8. Trabalhos Futuros

Como continuidade deste estudo, a identificação das proteínas presentes em cada uma das frações, associadas aos respectivos elementos minerais, pode ser feita em conjunto com algum grupo da bioquímica, especializado em separação e identificação de proteínas.

Além disso, outros estudos podem ser feitos para verificar a aplicação do acoplamento HPLC - ICP OES a outras matrizes.

9. Referências

1. *Transgênicos - Uma visão estratégica*, Rafaela Di Sabato Guerrante, Editora Interciência, 2003.
2. *Princípios de Bioquímica*, Albert Lehninger, David L. Nelson, Michael M. Cox, Editora Sarvier, Primeira Edição, 1202p., 2004.
3. *Transgênicos - Bases Científicas da sua segurança*, Franco Maria Lajolo e Marília Regini Nutti, Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição, 2003.
4. *Plantas Transgênicas na Agricultura*, Academia Brasileira de Ciências, 2003.
5. *Veja*, edição 1826, ano 36, nº43, 29/10/2003, Editora Abril.
6. www.agricultura.gov.br – Acessado em Setembro - 2006
7. www.ambientebrasil.com.br – Acessado em Setembro - 2006
8. Mayer, S., Stirling, A., Finding a precautionary approach to technological developments – Lessons for the evaluation of GM crops, *Journal of Agricultural and Environmental Ethics*, 15 (1), 57-71, 2002.
9. www.codexalimentarius.net – Acessado em Setembro - 2006
10. www.fao.org – Acessado em Setembro - 2006
11. www.who.int – Acessado em Setembro - 2006
12. Einspanier, R., Quantifying genetically modified material in food: searching for a reliable certification, *Eur. Food. Res. Technol.*, 213, 415-416, 2001.
13. Terry, C.F., Harris, N., Event-specific detection of Roundup Ready Soya using two different real time PCR, detection chemistries, *Eur. Food. Res. Technol.*, 213, 425-431, 2001.

14. Berdal, K.G., Jensen, A.H., Roundup Ready soybean event-specific real-time quantitative PCR assay and estimation of the practical detection and quantification limits in GMO analysis, *Eur. Food. Res. Technol.*, 213, 432-438, 2001.
15. Myhr, A.I., Traavik. T., The Precautionary Principle: scientific uncertainty and omitted research in the context of GMO use and release, *Journal of Agricultural and Environmental Ethics*, 15 (1), 73-86, 2002.
16. www.oecd.org – Acessado em Setembro - 2006
17. *Food Chemistry*, H. D. Belitz and W. Grosch, Berlin, New York: Springer, 1999.
18. *Food Chemistry*, O. W. Fennema, 3rd Edition, Dekker, 1996.
19. Garcia, M.C., Torre, M., Marina, M.L. and Laborda, F., Composition and Characterization of Soyabean and Related Products, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 37(4),361-391, 1997.
20. Fernando, S.M., Murphy, P.A., HPLC determination of thiamin and riboflavin in soybeans and tofu, *J. Agric. Food Chem.*, 38, 163-167, 1990.
21. Kuan, S.S., Wang, G., Francis, O.J., Ware, G.M., Carman, A.S., A simplified HPLC method for the determinations of phytoestrogens in soybean and its processed products, *J. Agric. Food Chem.*, 38, 185-190, 1990.
22. Barnes, S., Kirk, M., Coward, L., Isoflavones and their conjugates in soy foods: extraction condition and analysis by HPLC – Mass spectrometry, *J. Agric. Food Chem.*, 42, 2466-2474, 1994.

23. *Biodisponibilidade de Nutrientes*, Silvia M. F. Cozzolino, 878p., Ed. Manole, 2005.
24. Oliveira, E., Sample preparation for atomic spectroscopy: evolution and future trends, *J. Braz. Chem. Soc.*, 14(2), 174-182, 2003.
25. Krug, F.J., *Métodos de Decomposição de Amostras*, V Workshop sobre preparo de amostras, 2004.
26. www.sampleprep.duq.edu/sampleprep – Acessado em Setembro – 2006.
27. Kashlan, N.B., Hassan, A.S., Srivastava, V.P., Mohana, N.A., Shuber, K.M., Elemental contents of milk-based and soy-based infant formulas marketed in Kuwait, *Food Chemistry*, 42, 57-64, 1991.
28. www.aoac.org – Acessado em Setembro – 2006.
29. Spehar, C.R., Seed quality of soya bean based on mineral composition of seeds of 45 varieties grown in a Brazilian Savanna acid soil, *Euphytica*, 76 (1-2), 127-132, 1994.
30. Rham, O., Jost. T., Phytate-protein interactions in soybean extracts and low-phytate soy products, *Journal of Food Science*, 44 (2), 596-600, 1979.
31. Ferreira, F.N., Monteiro, M.I.C., Silva, L.I.D., Carneiro, M.C., Determinação de nitrogênio total em amostras de rocha petrolífera pelo método KJELDAHL / INDOFENOL, Série Anais da XII Jornada de Iniciação Científica, Centro de Tecnologia Mineral, 2004.
32. Dunemann, L., Hinkamp, S., Electrophoretic techniques in element species analysis. Comparison between flow-through and flat-bed techniques, *Anal. Chim. Acta*, 230, 1-7, 1990.

- 33.** Gifford, S., Clydesdale, F.M., Interactions among calcium, zinc and phytate with three protein sources, *Journal of Food Science*, 55 (6), 1720-1724, 1990.
- 34.** Brink, E.J., Dekker, P.R., van Beresteijn, E.C.H., Beynen, A.C., Inhibitor effect of dietary soybean protein vs. Casein on magnesium absorption in rats, *J. Nutr.*, 121, 1374-1381, 1991.
- 35.** Dunemann, L., Meinerlig, M., Comparison of different microwave-based digestion techniques in view of their application to fat-rich foods, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 342, 714-718, 1992.
- 36.** Nóbrega, J.A., Gouveia, S.T., Silva, F.V., Costa, L.M., Nogueira, A.R.A., Determination of residual carbon by inductively-coupled plasma optical emission spectrometry with axial and radial configurations, *Anal. Chim. Acta*, 445, 269-275, 2001.
- 37.** Mermet, J.M., Delaport, T., Mauras, Y., Jaunault, L., Allain, P., Signal enhancement of elements due to the presence of carbon-containing compounds in inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal. Chem.*, 63, 1497-1498, 1991.
- 38.** Mader, P., Száková, J., Curdová, E., Combination of classical dry ashing with stripping voltammetry in trace element analysis of biological materials: review of literature published after 1978, *Talanta*, 43, 521-534, 1996.
- 39.** Adeloju, S.B., Comparison of some wet digestion and dry ashing methods for voltammetric trace element analysis, *Analyst*, 114, 455-462, 1989

40. Jackwerth, E., Würfels, M., Residues from biological materials after pressure decomposition with nitric acid, *Anal. Chim. Acta*, 226, 31-41, 1989.
41. Koplik, R., Curdova, E., Suchanek, M., Trace element analysis in CRM of plant origin by inductively coupled plasma mass spectrometry, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 360, 449-451, 1998.
42. Allen, L.B., Siitonen, P.H., Thompson, H.C., Determination of Copper, Lead, and Nickel in Edible Oils by Plasma and Furnace Atomic Spectroscopies, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 75(4), 477-481, 1998.
43. Koplik, R., Borková, M., Bicanová, B., Polák, J., Mestek, O., Komínková, J., Speciation analysis of elements in cereal flours by liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry, *Food Chemistry*, 99, 158-167, 2006.
44. Gómez-Ariza, J.L., Arias-Borrego, A., García-Barrera, T., Multielemental fractionation in pine nuts (*Pinus pinea*) from different geographic origins by size-exclusion chromatography with UV and inductively coupled plasma mass spectrometry detection, *J. Chrom. A*, 1121, 191-199, 2006.
45. Shah, M., Caruso, J.A., Inductively coupled plasma mass spectrometry in separation techniques: Recent trends in phosphorus speciation, *J. Separation Science*, 28, 1969-1984, 2005.
46. Yoshida, S., Distribution of the molecular weight and chemical form of intrinsic Iron compounds in soybeans, *Agric. Biol. Chem.*, 53(4), 1071-1075, 1989.

47. Koplik, R., Borková, M., Mestek, O., Komínková, J., Suchánek, M., Application of size-exclusion chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry for fractionation of element species in seeds of legumes, *J. Chrom. B*, 775, 179-187, 2002.
48. Jones, B.T., Peters, H.L., Determination of Non-metals by High Performance Liquid Chromatography with Inductively Coupled Plasma Detection, *Applied Spectr. Reviews*, 38 (1), 71-99, 2003.
49. Arruda, M.A.Z., Magalhães, C.S., Garcia, J.S., Trends in metal-binding and metalloprotein analysis, *Talanta*, 69, 1-15, 2006.
50. Marshall, P.S., Leavens, B., Heudi, O., Ramirez-Molina, C., Liquid chromatography coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry in the pharmaceutical industry: selected examples, *J. Chrom. A*, 1056, 3-12, 2004.
51. Koplik, R., Borková, M., Mestek, O., Komínková, J., Suchánek, M., Kvasnicka, F., Effect of technological processing and maturity stage of seeds on the content and speciation of phosphorus and trace elements in peas, *Food Chemistry*, 87, 423-432, 2004.
52. Collins, R.N., Separation of low-molecular mass organic acid-metal complexes by high-performance liquid chromatography, *J. Chrom. A*, 1059, 1-12, 2004.
53. *Introdução a métodos cromatográficos*, Carol H. Collins, Gilberto L. Braga, Pierina S. Bonato, 7ª edição, Editora da UNICAMP, 1995.

54. Labat, L., Dumestre-Toulet, V., Goullé, J.P., Lhermitte, M., A fatal case of mercury cyanide poisoning, *Forensic Science International*, 143, 215-217, 2004.
55. Sur, R., Dunemann, L., Method for determination of five toxicologically relevant arsenic species in human urine by liquid-chromatography-hydride generation atomic absorption spectrometry, *J. Chromat. B*, 807, 169-176, 2004.
56. Prange, A., Leonhard, P., Lassen, S., Bergmann, J., Li, B., Distribution of elements binding to molecules with different molecular weights in aqueous extract of Antarctic krill by size-exclusion chromatography coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Chromat. B*, 814, 83-91, 2005.
57. Coelho, N.M.M., Coelho, L.M., Lima, E.S., Pastor, A., de la Guardiã, M., Determination of arsenic compounds in beverages by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry, *Talanta*, 66, 818-822, 2005.
58. Kohlmeier, U., Jakubik, S., Kuballa, J., Jantzen, E., Determination of arsenic species in fish oil after acid digestion, *Microchim. Acta*, 151, 249-255, 2005.
59. Sanz-Medel, A., Sanchez, M.L.F., Huerta, V.D., Quantitative selenium speciation in cod muscle by isotope dilution ICP-MS with a reaction cell: comparison of different reported extraction procedures, *J. Anal. Atom. Spectr.*, 19, 644-648, 2004.

60. Ogra, Y., Ishiwata, K., Iwashita, Y., Suzuki, K.T., Simultaneous speciation of selenium and sulphur species in selenized odorless garlic (*Allium sativum* L. Shiro) and shallot (*Allium ascalonicum*) by HPLC – inductively coupled plasma – (octopole reaction system) – mass spectrometry and electrospray ionization – tandem mass spectrometry, *J. Chromat. A*, 118-125, 2005.
61. Sanz-Medel, A., Montes-Bayón, M., Fodor, P., Gergely, V., Selenium species in aqueous extracts of alfalfa sprouts by two-dimensional liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry and electrospray mass spectrometry detection, *J. Agric. Food Chem.*, 54, 4524-4530, 2006.
62. Dumont, E., Vanhaecke, F., Cornelis, R., Hyphenated techniques for speciation of Se in in vitro gastrointestinal digests of *Saccharomyces cerevisiae*, *Anal. Bioanal. Chem.*, 379, 504-511, 2004.
63. Gómez-Ariza, J.L., Bernal-Daza, V., Villegas-Portero, M.J., Comparative study of the instrumental couplings of high performance liquid chromatography with microwave-assisted digestion hydride generation atomic fluorescence spectrometry and inductively coupled plasma mass spectrometry for chiral speciation of selenomethionine in breast and formula milk, *Anal. Chim. Acta*, 520, 229-235, 2004.
64. Ogra, Y., Ishiwata, K., Encinar, J.R., Lobinski, R., Suzuki, K.T., Speciation of selenium in selenium-enriched shiitake mushroom, *Lentinula edodes*, *Anal. Bioanal. Chem*, 379, 861-866, 2004.

65. Dumont, E., Vanhaecke, F., Cornelis, R, Pauw, L.D., Speciation of Se in *Bertholletia excelsa* (Brazil nut): a hard nut to crack?, *Food Chemistry*, 95, 684-692, 2006.
66. Ferri, T., Coccioli, F., de Luca, C., Callegari, C.V., Morabito, R., Distribution and speciation of selenium in *Lecythis ollaria* plant, *Microchem. Journal*, 78, 195-203, 2004
67. Sanz-Medel, A., Sanchez, M.L.F., Sastre, J.B.L., St. Remy, RR de la F., Multielemental distribution patterns in premature human milk wey and pre-term formula milk whey by size-exclusion chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry with octopole reaction cell, *J. Anal. Atom. Spectr.*, 19, 1104-1110, 2004.
68. Caruso, J.A., Wuilloud, R.G., Kannamkumarath, S.S., Studies of various elements of nutritional and toxicological interest associated with different molecular weight fractions in Brazil nuts, *J. Agric. Food Chem.*, 52, 5773-5780, 2004.
69. Dunneman, L., Nolte, J., Schoppenthau, J., High-performance liquid chromatography coupled with array inductively coupled plasma optical emission spectrometry for the separation and simultaneous detection of metal and non-metal species in soybean flour, *Analyst*, 121, 845-852, 1996.
70. Koplík, R., Fingerová, H., Study of minerals and trace element species in soybean flour, *Fresenius Journal of Anal Chem*, 363, 545-549, 1999.
71. Koplík, R., Pavelková, H., Cincibuchová, J., Mestek, O., Kvasnicka, F., Suchánek, M., Fractionation of phosphorus and trace elements species in soybean flour and common white bean seeds by size exclusion

- chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*, 770, 261-273, 2002.
72. Koplik, R., Borková, M., Mestek, O., Komínková, J., Suchánek, M., Effect of cooking on phosphorus and trace elements species in peas, *Food Chemistry*, 85, 31-39, 2004.
 73. Lestiene, I., Icard-Vernière, C., Mouquet, C., Picq, C., Trèche, S., Effects of soaking whole cereal and legume seeds on iron, zinc and phytate contents, *Food Chemistry*, 89, 421-425, 2005.
 74. Wiseman, J., Clarke, E.J., Developments in plant breeding for improved nutritional quality of soya beans II. Anti-nutritional factors, *J. Agric. Science, Cambridge*, 134, 125-136, 2000.
 75. Martins, B.A.B., Determinação da biodisponibilidade relativa de fósforo para frangos de corte em farelos de trigo, soja integral tostada e soja integral extrusada com e sem adição de fitase microbiana à dieta, *Tese de Doutorado*, Pirassununga, 2003.
 76. Miller, D.D., Schricker, B.P., Rasmussen, R.R., Van Campen, D., An in vitro method for estimation of iron availability from metals, *The Am. J. of Clinical Nutrition*, 34, 2248-2256, 1981.
 77. Eskin, M., Latta, M., A simple and rapid colorimetric method for phytate determination, *J. Agric. Food Chem.*, 28, 1313-1315, 1980.
 78. Grases, F., Valcárcel, M., Ríos, A., Simonet, B.M., Determination of myo-inositol phosphates in food samples by flow injection-capillary zone electrophoresis, *Electrophoresis*, 24, 2092-2098, 2003.

79. *Determinação de fitatos em alimentos*, Apostila do curso oferecido pela FCF-USP, Novembro-1999.
80. *Principles of Instrumental Analysis* (Saunders Golden Sunburst Series), Douglas A. Skoog, F. James Holler, Timothy A. Nieman, fifth edition, Brookes Cole, 1997.
81. <http://www.bi.umist.ac.uk/users/mjfrbn/buffers/makebuf.asp> - acessado em setembro de 2006
82. <http://www.chromatography.co.uk/Products/Bio/Fractoge.pdf> - acessado em setembro de 2006
83. [http://www5.amershambiosciences.com/aptrix/upp00919.nsf/\(FileDownload\)?OpenAgent&docid=1B522BAEDEE4F538C1256EB40044AA19&file=56119099AB.pdf](http://www5.amershambiosciences.com/aptrix/upp00919.nsf/(FileDownload)?OpenAgent&docid=1B522BAEDEE4F538C1256EB40044AA19&file=56119099AB.pdf) – acessado em setembro de 2006.
84. *Column Packing – The Movie*, Amersham Biosciences, CD-ROM, 2005.
85. <http://pb.merck.de/servlet/PB/menu/1228320/index.html> - acessado em setembro de 2006.
86. Instituto Adolfo Lutz, *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz – Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos*, Inst. Adolfo Lutz, 1976.
87. *Planejamento e otimização de experimentos*, Benício de Barros Neto, Ieda Spacino Scarminio, Roy Edward Bruns, 2ª edição, Editora da UNICAMP, 1995.
88. Norusis, N.J., *SPSS for Windows, Professional statistics*, release 6.0, SPSS-INC, USA, 1993.
89. Theocharis, C.R., Petrakis, P.V., Kokkinofa, R., Mavromoustakos, T., Authenticity of the traditional cypriot spirit “Zivania” on the basis of metal

- content using a combination of coupled plasma spectroscopy and statistical analysis, *J. Agric. Food Chem.*, 51, 6233-6239, 2003.
90. Ng, P.K.W., Trinh, D.T., Mujoo, R., Characterization of storage proteins in different soybean varieties and their relationship to tofu yield and texture, *Food Chemistry*, 82, 265-273, 2003.
91. Natarajan, S., Caperna, T.J., Sullivan, J., Garret, W.M., Xu, C., Separation and identification of soybean leaf proteins by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry, *Phytochemistry*, 67, 2431-2440, 2006.
92. Arruda, M.A.Z., Pérez, C.A., Flores, E.M.M., Moraes, D.P., Mesko, M.F., Garcia, J.S., Sussulini, A., Evaluation of soybean seed protein extraction focusing on metalloprotein analysis, *Microchimica Acta*, 2006.
93. Ohweiler, O.A., *Química Analítica Quantitativa*, LTC, Editora S.A., 1981.
94. The Association of Analytical Communities, *Official Methods of Analysis of AOAC*, Washington, Ass. Off. Agric. Chem, 1980.
95. Marsh, M., Steps needed to prevent ill-considered GMO releases, *BioScience*, 52 (1), 4, 2002.

Curriculum Vitae

Kalil Hussein Charanek

Local e data de nascimento: Rondonópolis-MT, 14/09/1981

Educação:

- Colégio XII de Outubro, São Paulo, 1998.
- Instituto de Química da Universidade de São Paulo: Bacharel em Química, 2002.
- Instituto de Química da Universidade de São Paulo: Licenciatura em Química, 2005.
- Instituto de Química da Universidade de São Paulo: Doutorado em Química, 2006.

Participações em Congressos:

- *“Estudo da Isomeria Conformacional e das Interações Eletrônicas em Alguns Compostos Alfa-EtilSulfonil Substituídos”*, 9º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP, novembro-2001;
- *“Determinação de Cl, P e S em amostras de soja, milho e arroz por ICP OES após solubilização por TMAH”*, XXVI Congresso Latino-americano de Química - 27ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2004, Salvador, 2004.
- *“Determinação de Alguns Nutrientes e Contaminantes em Amostras de Soja, após digestão em forno de microondas, por ICP OES”*, IX Encontro Nacional de Contaminantes Inorgânicos, setembro-2004;
- Supervisor do V Workshop de Preparo de Amostras, outubro-2004;
- *“Avaliação da distribuição de alguns elementos em amostras de soja transgênica e natural, através do acoplamento HPLC – ICP OES”*, 13º Encontro Nacional de Química Analítica, setembro-2005 (apresentação oral).

Trabalho Publicado

Charanek, K.H., Oliveira, E., Avaliação de nutrientes e alguns contaminantes em algumas amostras de algas comestíveis, comercializadas na cidade de São Paulo. *Revista Analytica*, 03, p. 29-33, 2003.

Trabalhos em redação

Da Veiga, M.A.M.S., Oliveira, E., Naozuka, J., Charanek, K.H., Focused microwave-assisted alkaline solubilization of rice, corn and soybean for the determination of major essential elements by ICP OES. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, em redação final, 2006.

Charanek, K.H., Oliveira, E., Evaluation of some microwave-assisted methods for determinations of mineral content in soybean samples.

Charanek, K.H., Oliveira, E., Tonin, F.G., Tavares, M.F.M., Assessment of the distribution of some species in conventional and transgenic soybean samples by HPLC - ICP OES.

Charanek, K.H., Oliveira, E., Chiebao, H., Colli, C., Evaluation of some non-intentional effects in genetically modified soybean samples.