



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO
SERTÃO PERNAMBUCANO, CAMPUS PETROLINA
CURSO DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS

REJANE FEITOSA NERY DE SÁ

VERIFICAÇÃO DA EFICIÊNCIA ANALÍTICA DE ALGUMAS
METODOLOGIAS DE ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS
ADAPTADAS

PETROLINA –PE

2015

REJANE FEITOSA NERY DE SÁ

**VERIFICAÇÃO DA EFICIÊNCIA ANALÍTICA DE ALGUMAS
METODOLOGIAS DE ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS
ADAPTADAS**

Trabalho de Conclusão de curso apresentado ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sertão Pernambucano, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Tecnólogo em Alimentos.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Luciana Cavalcanti de Azevêdo

PETROLINA-PE

2015

REJANE FEITOSA NERY DE SÁ

**VERIFICAÇÃO DA EFICIÊNCIA ANALÍTICA DE ALGUMAS
METODOLOGIAS DE ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS
ADAPTADAS**

Trabalho de Conclusão de curso apresentado ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sertão Pernambucano, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Tecnólogo em Alimentos.

Local, _____, de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dra. Luciana Cavalcanti de Azevêdo (orientadora)

Msc. Silvana Silva Martins (SENAI)

Prof. Dr. Robson de Jesus Mascarenhas (IF SERTÃO-PE)

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, pela saúde, fé e perseverança que tem me dado. A Antonio Gomes Barroso de Sá, marido fiel e companheiro na hora da tribulação. Aos meus filhos Sam e Caleb, que nos momentos de minha ausência dedicados ao estudo superior, sempre fizeram entender que o futuro é feito a partir da constante dedicação no presente.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Federal do Sertão Pernambucano, Campus Petrolina pelo ambiente criativo e amigável que proporciona, bem como ao corpo docente, em especial a professora Dr^a Luciana azevêdo e Dr. Robson pela orientação, apoio, confiança e dedicação na elaboração deste trabalho.

Ao Técnico do laboratório e marido dedicado, Antonio Barroso, pelas horas de acompanhamento no laboratório e compreensão nas tarefas de casa e incentivo nas horas de desânimo e cansaço.

A minha mãe Anisia, heroína que me deu apoio.

Aos alunos do 6º Período, que de forma direta fizeram parte da minha formação.

A estes, o meu muito obrigado.

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi verificar, entre quatro metodologias analíticas adaptadas de métodos oficiais e utilizadas no IF SERTÃO-PE Campus Petrolina, a precisão e exatidão em seus resultados. Essa verificação é também conhecida como validação, que segundo normas da ANVISA (Resolução RE nº 899, 2003), tem como objetivo garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Foram feitas análises, utilizando métodos adaptados para determinação de: carboidratos (Lane & Eynon), proteínas (micro kjeldahl), gorduras (Soxhlet) e fibras insolúveis (digestão ácida e básica) nos quais utilizou-se como amostra de referência a soja em grão, adquirida no mercado local, sendo a soja escolhida por apresentar quantidade significativa e conhecida de cada parâmetro analisado. Os resultados obtidos mostram que com a metodologia adaptada de Lane e Eynon para determinação de carboidratos não foi possível detectar glicídios redutores, somente glicídios não redutores em sacarose e amido, o que apresentou uma distância significativa ao valor de referência. Para a análise de proteína utilizando o método micro kjeldahl adaptado do Adolf Lutz (2008), os resultados foram precisos e exatos com relação ao padrão de soja. O mesmo ocorreu na análise de extração de gordura por Soxhlet, onde foi utilizado o método convencional variando-se os solventes. Neste caso, os valores obtidos entre os métodos não diferiram entre si, com valores próximos ao declarado para lipídios no grão de soja. No que diz respeito às fibras insolúveis utilizando o método convencional, apresentaram valores mais próximos ao padrão da soja, diferente do método adaptado que apresentaram valores 50% inferiores ao padrão para fibras.

Palavra-chave: precisão, exatidão, validação e métodos.

ABSTRACT

The aim of this study was to assess, among four adapted analytical methodologies and official methods used in IF SERTÃO-PE, Campus Petrolina the precision and accuracy in its results. This check is also known as validation, which according to norms of ANVISA (Resolution RE No. 899, 2003), aims to ensure through experimental studies, that the method meets the requirements of the analytical applications, ensuring the reliability of the results. Analyzes were performed using adapted methods for determination of: carbohydrates (Lane & Eynon), proteins (micro Kjeldahl), fats (Soxhlet) and insoluble fibers (acidic and basic digestion) in which was used as the standard sample soybeans, acquired in the local market, soybeans being chosen for having significant amount for each analyzed parameter. The results shows that with the adapted Lane and Eynon method for determination of carbohydrates has not been possible to detect reducing carbohydrates, only non-reducing carbohydrates as sucrose and starch, which showed a significant distance from the standard sample. For protein analysis using micro-Kjeldahl method adapted from Adolf Lutz (2008), the results were precise and accurate with respect to soybean standard. The same occurred in the extraction of fat by Soxhlet where it was used the conventional method with varying solvents. In this case, the values obtained among the methods were not different, with values close to the standard for lipids in soybean. Regarding the insoluble fibers using the conventional method showed closer to the soybean standard values, different from the adapted method that averaged 50% less than the standard for fibers.

Keywords: precision, accuracy, validation and methods

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.	Valores médios de macronutrientes da soja.....	4
TABELA 2.	Informação nutricional utilizada como valor de referência, declarada no rótulo da soja.....	19
TABELA 3.	Médias, desvio padrão e coeficiente de variação dos resultados das análises de gordura pelo método Soxhlet.....	22

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Pacote de soja integral.....	11
Figura 2.	Sachês contendo a farinha da soja.....	12
Figura 3.	Tubos micro Kjeldahl preparados antes da digestão.....	14
Figura 4.	Destilador de nitrogênio.....	14
Figura 5.	Sequência do ponto de viragem na titulação.....	15
Figura 6.	Tubos contendo a mistura catalítica mais o ácido sulfúrico.....	15
Figura 7.	a) Método utilizando papel filtro embrulhado e amarrado; b) Método utilizando papel filtro embrulhado e no cesto; c) Cartucho convencional.....	16
Figura 8.	Extrator de Soxhlet convencional.....	16
Figura 9.	Extrator de Soxhlet em bloco.....	17
Figura 10.	Comparação dos teores de carboidratos declarados e encontrados na amostra de referência.....	20
Figura 11.	Comparação dos teores de proteínas declarados e encontrados na amostra de referência pelos métodos micro Kjeldahl e do MAPA.....	21
Figura 12.	Resultado para determinação de gordura pelo método convencional (vidrarias) e instrumental (MÉTODOS 1 e 4) usando três solventes diferentes.....	23
Figura 13.	Resultado geral para determinação de gordura pelo método convencional (vidraria) e instrumental, utilizando o etanol, hexano e éter, como solvente.....	24
Figura 14.	Resultado para fibras pelo método adaptado, diferenciando a obtenção da amostra desengordurada, convencional e adaptado da análise de gordura.....	25

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	OBJETIVOS.....	2
2.1	OBJETIVO GERAL.....	2
2.2	OBJETIVO ESPECÍFICO.....	2
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
3.1	A SOJA.....	3
3.2	VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	5
3.2.1	Principais ferramentas de validação.....	6
3.2.2	Fundamentação de alguns métodos analíticos estudados.....	8
3.2.2.1	Método de determinação de carboidratos por Lane e Eynon.....	8
3.2.2.2	Método de determinação de proteína por micro Kjeldahl.....	8
3.2.2.3	Método de determinação de gordura por Soxhlet.....	9
3.2.2.4	Método de determinação do teor de fibra por hidrólise ácida e alcalina.....	9
4	MATERIAL E MÉTODO.....	11
4.1	LOCAL DE EXECUÇÃO DE EXPERIMENTO.....	11
4.2	MATÉRIA PRIMA.....	11
4.3	ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DA FARINHA DE SOJA.....	12
4.3.1	Método para determinação de carboidratos (Lane e Eynon).....	12
4.3.2	Método para determinação de proteína (micro Kjeldahl adaptado).....	13
4.3.3	Método para determinação de gordura (Soxhlet).....	16
4.3.4	Método para determinação do teor de fibras (Digestão ácida e alcalina).....	17
4.4	TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS.....	18
5	RESULTADO E DISCUSSÃO.....	19

6	CONCLUSÃO.....	26
	ANEXOS – METODOLOGIAS APLICADAS.....	27
	REFERÊNCIAS.....	41

1 INTRODUÇÃO

Toda análise laboratorial visa à obtenção de resultados compatíveis com a metodologia empregada. No entanto, diversos fatores podem provocar a aquisição de valores diferentes para determinada análise laboratorial de um mesmo material (MARTELLI, 2011).

Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação. A validação inclui especificação dos requisitos do método; determinação das características do método; verificação de que os requisitos podem ser atendidos com o uso do método e uma declaração sobre a validade do método (MAURER, 2007; SOARES, 2007; ROLIM, 2007).

A validação de métodos analíticos é o processo que fornece uma evidência de que o método é confiável ao que se aplica. Sendo assim o laboratório, ao empregar métodos de ensaio químico específico emitidos por organismos de normalização, organizações reconhecidas na sua área de atuação ou publicadas em livros e periódicos de grande credibilidade na comunidade científica necessita demonstrar que tem condições de operar de maneira adequada estes métodos normalizados, dentro das condições específicas existentes nas suas instalações antes de implementá-los (ESTEVES, 2007), não necessitando realizar os parâmetros referentes à seletividade, linearidade, faixa de trabalho e faixa linear e robustez. No entanto, alguns parâmetros como precisão e exatidão podem e devem ser frequentemente testados nas rotinas dos laboratórios.

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra, onde as duas formas mais comuns de expressá-las são por meio de repetitividade e reprodutividade (SILVA,2006).

Dentro desse contexto, o presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de identificar a eficiência analítica de algumas das metodologias utilizadas no IF SERTÃO-PE, *Campus Petrolina*, que sofreram modificações em relação ao método convencional, devido às necessidades práticas, visando verificar a precisão e exatidão em seus resultados. Para isso, foi utilizado material de referência não certificado, mas de composição bastante conhecida: o grão de soja.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificação da eficiência analítica dos métodos adaptados para determinação de proteína, carboidrato, gordura e fibra insolúvel, utilizados no Instituto Federal do Sertão Pernambucano – Campus Petrolina.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a precisão para cada método aplicado, com relação a amostra de referência não certificada;
- Comparar os resultados com a amostra de referência, conforme composição declarada no rótulo;
- Averiguar a eficiência dos métodos adaptados.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A SOJA

A soja (*Glycine max (L.) Merr.*) é uma oleaginosa originária da Ásia Oriental. Contudo, em função das condições edofoclimáticas, foi cultivada com objetivos comerciais, a partir do final da década de 1960, no Rio Grande do Sul (EMBRAPA, 2011).

A soja foi introduzida no Brasil através dos EUA em 1882. A Escola de Agronomia da Bahia foi o primeiro local a realizar estudos, inicialmente como forragem, sobre o cultivo desta leguminosa pelo professor Gustavo Dutra. Mais tarde, em 1891, o Instituto Agrônomo de Campinas, em São Paulo também realizou esses estudos e já em 1900 distribuiu sementes de soja para os produtores paulistas, o Rio Grande do sul também cultiva com bastante sucesso a soja devido a semelhança climática com os EUA, ecossistema de origem (YAGO, 2014).

Com o passar do tempo e a produção da soja aumentando, tal leguminosa sofreu transformações genéticas a fim de se tornarem fortes e resistentes a pragas, são os famosos transgênicos. O Brasil, os Estados Unidos e a Argentina são responsáveis por aproximadamente 81% da produção mundial de soja (PASTORE, 2013).

O Brasil é considerado um dos maiores produtores mundiais de soja, a estimativa de produção de soja para safra 2013/14 é de 89,72 milhões de toneladas em comparação a 81,46 milhões de toneladas em 2012/13. A colheita do grão irá contribuir para uma safra de grãos recorde no país, estimada em 191,91 milhões a 195,5 milhões de toneladas, com um crescimento de até 4,5% (CONAB, 2013).

Nota-se que a ascensão da produção da soja em grãos proporcionou a exploração de terras antes não cultivadas, o abastecimento do mercado interno, o aumento das exportações e, por fim, a geração de emprego e renda (BATISTA; GIUSTE 2013).

Por ser tão completa, tanto quimicamente quanto nutricionalmente, não é de se admirar os seus diversos usos. Na alimentação humana, em virtude do elevado potencial de

produção, do baixo custo e do alto valor nutricional, a soja tem se destacado como importante fonte proteica vegetal, sendo seus principais produtos: a farinha, o isolado e o concentrado proteico de soja, os quais são utilizados principalmente como melhoradores tecnológicos de alimentos industrializados (LIU, 2005).

A farinha também é eficaz no controle e redução do colesterol, no combate aos tumores intestinais induzidos por carcinógenos específicos e na prevenção de lesões gástricas induzidas por diferentes agentes ulcerogênicos (ASSIS, 2009).

Do ponto de vista de caracterização físico-química, elas possuem quantidades significativas de macronutrientes que poderão ser identificadas por meio de análises no laboratório utilizando metodologias para cada fim (Tabela 1).

Tabela 1. Valores médios de macronutrientes da soja

Macronutrientes	SILVA 2012	OLIVEIRA 2006	Tabela TACO 4 ^a Edição revisada e ampliada 2011
Carboidratos	34,06g	17,26g	38,00g
Proteínas	35,53g	40,04g	36,00g
Gorduras	25,60g	24,55g	14,6g
Fibras	2,49g	9,31g	20,2g

Hoje no país, graças a Embrapa e outros centros de pesquisas da iniciativa privada, há mais de 400 cultivares para comercialização, cada uma com suas particularidades e características que podem ser aproveitadas em muitos mercados de consumo. O alto valor comercial desse produto chega a valer muito quando se tem um conjunto de cultivares prontas para a comercialização, com características específicas para um mercado potencial (CAMARGO, 2008).

A cultivar BRS 267 pode contribuir para a maior estabilidade do óleo de soja durante o processamento, e colabora para obtenção de alimentos funcionais. Essa cultivar apresenta um teor Proteico e lipídico de aproximadamente 40,10% e 20,50%, respectivamente, já a cultivar BRS 257 contém em torno de 41,30% de teor de proteína e 22,60% de teor de óleo (EMBRAPA, 2014).

A soja possui maior conteúdo de proteína, em comparação com o feijão preto (21,3%), e a ervilha em vagem (7,5%). Com exceção do amendoim, que apresenta 43,9%

de teor de lipídeos, a soja também possui a maior percentagem lipídica entre essas leguminosas (TACO, 2011).

Os grãos de soja são também excelentes fontes de minerais por apresentarem elevados teores de ferro (Fe), cobre (Cu), magnésio (Mg), manganês (Mn), fósforo (P), potássio (K) e zinco (Zn) (CIABOTTI, 2006).

As propriedades funcionais, como o teor de isoflavonas e peptídeos bioativos, e as características tecnológicas destes produtos como: solubilidade, capacidade de geleificação, emulsificação, absorção de água e índice de solubilidade do nitrogênio podem ser modificadas em função das condições de processamento, como aplicação de calor, germinação e/ou fermentação, além das condições de armazenamento (MOURA et al., 2007; MACHADO et al., 2008; PAUCAR-MENACHO et al., 2010; SILVA et al., 2011).

O grão de soja e seus produtos vêm sendo estudados em razão de seu valor nutricional e funcional, assim como suas propriedades tecnológicas para a indústria de alimentos. Sua propriedade funcional é devido à ação moduladora em determinados mecanismos fisiológicos através de suas proteínas e isoflavonas (CIABOTTI, 2006).

O consumo da soja "in natura" ou mesmo processada na forma de derivados tem despertado um grande interesse da população, não só por ser considerada uma fonte importante de nutrientes, mas particularmente pela sua capacidade de diminuir o risco de doenças crônico-degenerativas (BEDANI et al., 2007) como por exemplo câncer, doenças cardiovasculares, osteoporose e diabetes além de reduzir os sintomas da tensão pré-menstrual e menopausa (MANDARINO et al., 2009).

3.2 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Estudos mostram que dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irreparáveis e que para garantir que um método analítico gere informações confiáveis e de fácil interpretação sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação (RIBANI, 2004).

A validação, segundo normas da ANVISA (Resolução RE nº 899, 2003), tem como objetivo garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados.

A validação deve ser efetuada para um novo método, métodos já existentes e revistos para incorporar melhorias ou resolver problemas analíticos e métodos estabelecidos e que passam a ser utilizados por novos analistas, equipamentos ou laboratórios. A extensão da validação depende da natureza da alteração (FERREIRA, 2008; ALMEIDA, 2008).

Na avaliação da exatidão utilizando um material de referência, os valores obtidos pelo laboratório (média e o desvio padrão de uma série de análises em replicata) devem ser comparados com os valores certificados do material de referência (FORTI, 2011; MACIVIERO, 2011).

De acordo com a resolução nº 475, do Ministério da Saúde/ANVISA, a metodologia analítica será considerada válida desde que sejam avaliados os parâmetros: Seletividade, linearidade e faixa linear de trabalho, precisão, entre outros.

3.2.1 Principais ferramentas de validação

Seletividade

O teste de seletividade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método instrumental. É aplicado quando desejamos saber se a metodologia analítica é capaz de produzir respostas para vários analitos e, além disso, se é possível distinguir a resposta de um analito da resposta de outros componentes que podem interferir na sua determinação (AZEVEDO, 2007).

O estudo de seletividade de um método sobre uma matriz complexa como os alimentos, na qual não é possível obter uma matriz isenta da substância de interesse, deve ser realizado através do método de adição-padrão (RIBANI et. AL., 2004). Devido a essas características, o teste de seletividade pode ser realizado comparando-se os valores das inclinações das duas curvas de regressão linear obtidas após a adição-padrão.

O método será considerado seletivo se as inclinações destas duas curvas de regressão linear forem as mesmas, ou muito próximas, indicando que o único efeito de matriz presente é a interferência natural causada pelo nível básico do analito (INMETRO, 2003).

Linearidade e faixa linear de trabalho

A quantificação de analitos requer o conhecimento da dependência entre a medida e a sua concentração. Através do estudo da linearidade é possível demonstrar se o método analítico é capaz de produzir uma resposta diretamente proporcional à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; RIBANI et. AL., 2004). A relação matemática entre o sinal (resposta) e a concentração do analito de interesse é expressa através das equações das retas (curvas analíticas) e seus respectivos coeficientes de correlação (R^2). Considera-se como evidência de um ajuste ideal dos dados para linha de regressão, valores de $R^2 > 0,9900$.

Muitas vezes, mesmo que o método analítico demonstre ser linear, torna-se necessário conhecer a faixa de concentração na qual a sensibilidade possa ser considerada constante, definindo o intervalo que possibilite a determinação da concentração do analito com a precisão, exatidão e linearidade necessários para o ensaio (INMETRO, 2003; SOARES, 2001).

Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, podendo ser considerada em três níveis: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutividade. A precisão pode ser expressa como o desvio padrão relativo (ou coeficiente de variação) de uma série de medidas, através da equação (1):

$$(Eq. 1) \quad DPR = \frac{s}{CMD} \times 100$$

Onde:

DPR = desvio padrão relativo;

s = desvio padrão;

CMD = concentração média determinada;

O valor máximo aceitável de DPR geralmente irá depender da metodologia empregada, da concentração do analito na amostra, do tipo de matriz e da finalidade do método, porém não deve ultrapassar 5% (SOARES, 2001). No entanto, em métodos de

análise de traços são aceitos DPR de até 20%, dependendo da complexidade da amostra (AZEVEDO, 2007).

Recuperação

O teste de recuperação se fundamenta na medição do teor do componente adicionado em uma porção analítica da amostra e na verificação da eficiência dessa medição pelo método proposto que normalmente são adicionadas concentrações conhecidas do analito a uma amostra e em seguida a amostra é analisada (SWARTZ; KRUUL, 1998).

3.2.2 Fundamentação de alguns métodos analíticos estudados

3.2.2.1 Método de determinação de carboidratos totais por Lane e Eynon

É um dos métodos quantitativos mais utilizados em alimentos para determinação de açúcares totais e de açúcares redutores. Esse método consiste na titulação da amostra filtrada, que é colocada dentro da bureta para ser titulada vagarosamente sob uma mistura em ebulição das duas soluções de Fehling. Estes reativos são específicos para açúcares redutores e se caracterizam por apresentar no Fehling A: uma solução de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) e no Fehling B: uma mistura alcalina de tartarato de sódio e potássio ($\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), dissolvidos em água e em uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 20%, apresentando uma cor azul-escuro, que possui um íon complexo de cobre II, que sob aquecimento e posterior titulação com a amostra de glicose a 1%, apresentará um precipitado de cor vermelho tijolo de óxido cuproso. O princípio do teste de Fehling também baseia-se na oxidação do aldeído a ácido carboxílico. O agente oxidante, no entanto, é o íon cobre II (Cu^{2+}), reduzido a cobre I, na forma de óxido cuproso, que se deposita no fundo do tubo, formando um precipitado vermelho (CECCHI, 2003).

3.2.2.2 Método de determinação de proteína por micro Kjeldahl

Este método foi proposto pelo químico dinamarquês Johan Gustav Kjeldahl na Dinamarca em 1883, quando este estudava proteína em grãos. Ele é o mais utilizado para determinação de proteína, sendo o método original modificado várias vezes. O fundamento deste método baseia-se na digestão da amostra por meio do aquecimento com o ácido sulfúrico na presença de catalisadores até que o carbono e o hidrogênio sejam oxidados, em seguida por uma destilação com NaOH (Hidróxido de sódio) e titulação com ácido sulfúrico de concentração a 0,1N (CECCHI,2003).

3.2.2.3 Método de determinação de gordura por Soxhlet

Metodologia de extração à quente, feita em equipamento tipo Soxhlet, construído em vidro temperado e utilizado para determinação de gorduras em amostras sólidas. O método foi desenvolvido por Franz Ritter von Soxhlet em 1879, químico agrícola de etnia alemã, que ressaltou a importância do grau de trituração da amostra quanto à duração e eficácia do processo. Consiste no tratamento sucessivo e intermitente da amostra imersa em um solvente puro (éter de petróleo, éter dietílico n-hexano, etanol, etc.), que condensa o solvente aquecido dentro do balão que está na base do aparelho (BRUM, 2004). O calor aplicado para o processo de evaporação é constante.

O método de Soxhlet apresenta uma vantagem no que diz respeito à amostra estar sempre em contato com o solvente, havendo sua constante renovação. É uma metodologia muito simples que não requer treinamento especializado e que possibilita a extração de uma quantidade maior de óleo em relação a outros métodos, sem a necessidade de filtração da miscela após o término da extração, pois a amostra esteve envolta no cartucho durante todo o procedimento (CASTRO; AYUSO, 1998).

3.2.2.4 Método de determinação do teor de fibra por hidrólise ácida e alcalina

A fibra alimentar é constituída pela soma de polissacarídeos e lignina de vegetais que não são digeridos pelas enzimas digestivas do homem. As fibras podem ser classificadas, quanto a sua solubilidade em água, em fibras solúveis e insolúveis. A fibra alimentar solúvel é composta por pectinas, beta-glicanas, gomas, mucilagens e algumas

hemiceluloses. Os componentes insolúveis são lignina, pectinas insolúveis, celulose e hemiceluloses. Esta classificação apresenta importância quanto à sua ação, pois os efeitos fisiológicos das fibras solúveis são diferentes das fibras insolúveis.

O princípio do método de fibras se baseia em uma digestão ácida seguida de uma digestão alcalina, pois o que era solúvel no ácido sai na 1ª digestão e o que era solúvel na base também é arrastado ficando a fibra insolúvel, é também considerada uma digestão muito drástica com perdas de alguns componentes, que é diferente, quando se usa as enzimas fisiológicas, pois seu método se baseia na determinação do resíduo orgânico, simulando as condições do intestino humano tendo uma menor perda e maior quantificação da fibra.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 LOCAL DE EXECUÇÃO DO EXPERIMENTO

As atividades foram desenvolvidas no Laboratório de análises físico-químicas e no Laboratório de Pesquisa, ambos do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Sertão Pernambucano (IF SERTÃO-PE) *Campus* Petrolina - situado a rodovia BR 407, km 8, Jardim São Paulo, Petrolina –PE.

4.2 MATÉRIA-PRIMA

Como amostra de referência (não certificada) para comparação dos valores de carboidratos, proteínas, gordura e fibra foi utilizada a soja integral de uma marca qualquer (Figura 1), sendo este em pacote de 500g utilizado em todo o experimento e adquirido no mercado local da cidade de Petrolina/PE. Esse vegetal foi escolhido por já possuir uma grande quantidade de estudos científicos que o referenciam, do ponto de vista de caracterização físico-química. Além disso, trata-se de um alimento cujos parâmetros a serem avaliados para carboidratos, proteínas, gorduras e fibra, encontram-se em concentrações significativas, facilitando sua quantificação.

Figura1. Pacote de soja integral



Os grãos foram triturados no liquidificador caseiro de marca Philips Walita, para a obtenção da farinha da soja, para posterior análise.

Após a trituração, a farinha foi armazenada em saquinhos (Figura 2) contendo aproximadamente 10g da farinha, sendo identificados e envolvidos com papel alumínio, para não haver a interferência de fatores externos que causassem alguma alteração no produto e colocados na geladeira até momento da análise.

Figura 2. Sachês contendo a farinha de soja



4.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DA FARINHA DE SOJA

As amostras de soja integral foram submetidas às análises físico-químicas em triplicatas, a fim de se verificar a eficiência dos métodos adaptados, nas seguintes análises: determinação de carboidrato, proteína, gordura e fibra insolúvel, realizadas no Laboratório de pesquisa do IF SERTÃO-PE de acordo com as metodologias descritas a seguir.

4.3.1 Método para determinação de carboidratos (Lane e Eynon)

Em uma balança analítica, marca Bell, modelo M214A, calibrada e estabilizada, foram pesados em um béquer cerca de 10,0g da farinha de soja que estava a temperatura ambiente, porém o laboratório se encontrava a temperatura de 20°C, pois a maioria das vidrarias são calibradas a essa temperatura, teve-se o cuidado de posicionar o béquer bem no centro da balança para não haver erro na pesagem que em seguida adicionou-se 50mL de água destilada, mais 2mL de acetato neutro de chumbo com o propósito de clarificar o meio e transferiu-se para um balão de 100mL adicionando o sulfato de sódio anidro para que precipite o chumbo adicionado anteriormente que em seguida foi filtrado a vácuo, e transferido para a bureta, sendo realizada a titulação com os reativos de Fehling A e B, previamente padronizadas com solução de glicose 1% e misturadas no momento da titulação para não haver reação com o oxigênio onde o ponto de viragem é uma cor vermelho tijolo. Logo após a titulação, o volume gasto foi anotado para realização dos cálculos.

A adaptação foi realizada na amostra, pois no método oficial aconselha ajustar o pH para 7, devido a reação ocorrer em meio básico, o que iria interferir se amostra estivesse ácida, neutralizando a reação, o que não foi feito no método adaptado,

Para fins de detecção de glicose, carboidrato presente em menor quantidade, foram feitas também análises a partir de 15g e 20g de material. Do mesmo modo procedeu para açúcares não redutores, com a diferença do aquecimento após diluição para que ocorresse a inversão da sacarose para glicídeos, e os reativos de Fehling pudesse detectar. O mesmo também procedeu para açúcares não redutores em amido, diferenciando apenas no uso da autoclave para que houvesse temperatura e pressão suficiente para haver a quebra em açúcares mais simples e assim haver a detecção e posterior quantificação.

4.3.2 Método para determinação de proteína (micro Kjeldah adaptado)

O método foi adaptado do manual de Adolfo Lutz para determinação de proteína, onde possuem algumas modificações devido às necessidades práticas, com o objetivo de agilizarem algumas análises utilizadas em aulas práticas e pesquisas. Essa análise acontece em 3 fases:

Fase 1 : Digestão

Adicionou-se nos tubos de Kjeldahl 1g da amostra, 0,2g de óxido de mercúrio que é um catalizador e irá atuar acelerando a reação, 7,0mL de ácido sulfúrico concentrado e posteriormente foram levados para o bloco digestor à temperatura de 350°C até completa digestão. Nesta fase o carbono e o hidrogênio são oxidados, o nitrogênio reduz e transforma-se em sulfato de amônia. O tempo de digestão irá depender da amostra, geralmente ela é finalizada quando a amostra contida no tubo se apresenta transparente. Esta fase foi realizada dentro da capela com o exaustor ligado.

Figura 3. Tubos micro kjedahl preparados antes da digestão



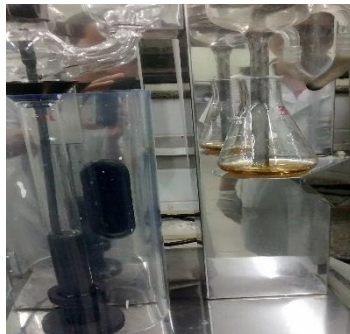
Foi nesta fase que houve a adaptação que foi a redução de 25mL de ácido sulfúrico para 7mL do ácido e a substituição da mistura catalítica para o óxido de mercúrio.

Fase 2: Destilação

Após a digestão, desligou-se o bloco e esperou esfriar, para adicionar dentro dos tubos 10mL de água destilada, mais 1mL de tiosulfato de sódio a 15% , para precipitar o mercúrio adicionado na digestão. Para a destilação foram preparados três erlenmeyers contendo 10mL de ácido bórico, cinco gotas de verde de bromocresol e cinco gotas de vermelho de metila. O sulfato de amônia produzido na fase anterior agora reage com o hidróxido de sódio e o nitrogênio é liberado em um volume conhecido de ácido bórico formando o borato de amônia, que na fase seguinte será titulada com o ácido sulfúrico. Na

destilação utilizou-se o destilador de nitrogênio de marca Tecnal, modelo, TE-0363, utilizado para a análise de proteína (Figura 4).

Figura 4. Destilador de nitrogênio



Fase 3 Titulação

Foi feito o enchimento da bureta com ácido sulfúrico a 0,1N que foi utilizada para titular a amostra, a substância contida no erlenmeyer passa da cor azul para amarelo alaranjado, identificando assim o ponto de viragem, como mostra a Figura 5. Após a viragem é feita a leitura do volume gasto na bureta.

Figura 5. Sequência do ponto de viragem na titulação



Em relação ao método original, as adaptações feitas estão relacionadas principalmente com a quantidade de ácido sulfúrico concentrado adicionado na fase de digestão (fase 1), que deve ser de 25mL para o método oficial e que no método adaptado foi de apenas 7mL, além da utilização da mistura catalítica indicada no método oficial (sulfato de cobre e de potássio, cerca de 6g por tubo), que foi substituída por apenas 0,2g de óxido de mercúrio (Figura 6).

Figura 6. Tubos contendo a mistura catalítica mais o ácido sulfúrico



4.3.3 Método para determinação de gordura (Soxhlet)

A metodologia de extração de gordura por Soxhlet baseia-se na extração contínua do material gorduroso presente na amostra, utilizando solvente conforme descrito no item 3.2.1.3.

Para o presente estudo, foi avaliada a eficiência de extração de três diferentes solventes, sendo eles: etanol, hexano e éter. Também foram avaliadas diferentes formas de acondicionamento da amostra na câmara de extração (em cartucho convencional, em papel de filtro e papel de filtro com cartucho) (Figura 7).

Figura 7. a) Método utilizando papel filtro embrulhado e amarrado; b) Método utilizando papel filtro embrulhado e no cesto; c) cartucho convencional



Houve também comparação entre o extrator individualizado (convencional), mostrado na Figura 8 e o extrator em bloco (Figura 9), marca Nova Ética, modelo 114.

Figura 8. Extrator de Soxhlet convencional



Figura 9. Extrator de Soxhlet em bloco



Para isso, pesou-se aproximadamente 5,0g da amostra, em seguida colocou-se no extrator de Soxhlet, adicionou-se no balão 150mL de solvente até atingir o sifão e este lavar a amostra por 5h com aquecimento, tendo o cuidado de controlar a temperatura uma vez que para cada solventes existe uma temperatura de ebulição, sendo para o etanol 80°C, hexano 60°C e éter, 40°C. Após a extração retirou-se o cartucho ou o papel filtro, e o solvente recuperado, o balão contendo o resíduo foi levado para estufa até evaporar o restante do solvente e assim quantificar a gordura presente na amostra.

4.3.4 Método para determinação do teor de fibras (Digestão ácida e alcalina)

Pesou-se aproximadamente 2,0g da amostra anteriormente desengordurada com etanol, hexano e éter de acordo com a metodologia descrita para extração de gordura. Em um recipiente, adicionou-se 200mL de ácido sulfúrico 0,255N e em seguida aqueceu-se até ebulição por 30 minutos, filtrou-se lavando a amostra com água fervendo até que o filtrado não se apresentasse mais ácido, transferiu-se o resíduo insolúvel para um erlenmeyer e adicionou-se 200mL de Hidróxido de sódio (NaOH) 0,313N quente, levou-se o erlenmeyer contendo a mistura para uma chapa aquecedora para ferver por 30 minutos, filtrou-se com auxílio de tecido de TNT, adicionando 50mL de água fervendo e 20mL de ácido clorídrico (HCL) a 1%, lavando-se a amostra com água fervendo até que este não apresente mais ácido. Em seguida lavou-se com 20mL de etanol e 20mL de éter. A parte insolúvel foi transferida para o cadinho previamente preparado e direcionado para a estufa para secagem por 1h, em temperatura de 105°C pesando até peso constante.

Neste método as fases de aquecimento da amostra ocorreram sem acoplamento dos recipientes a sistemas de resfriamento, como indica a metodologia oficial, devido à dificuldade operacional encontrada para isso. Os recipientes contendo as amostras foram, portanto, aquecidos em recipientes abertos, sendo monitorados para evitar derramamento e perda de amostra.

Outra adaptação do método ocorreu no sistema de filtração, que substituiu a filtração à vácuo com terra diatomácea como mostra o método do IAL 2005 para fibra insolúvel, pelo filtro produzido com TNT.

4.4 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS

Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA), e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a nível de 95% de confiança, utilizando o software ASSISTAT.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A Tabela 2 mostra a informação nutricional da amostra de referência (soja) declarada pelo fabricante em porção de 60g e esses valores convertidos para a porção de 100g, para facilitar na quantificação e comparação, uma vez que os resultados deste estudo foram expressos em g/100g.

Tabela 2. Informação nutricional utilizada como valor de referência, declarada no rótulo da soja.

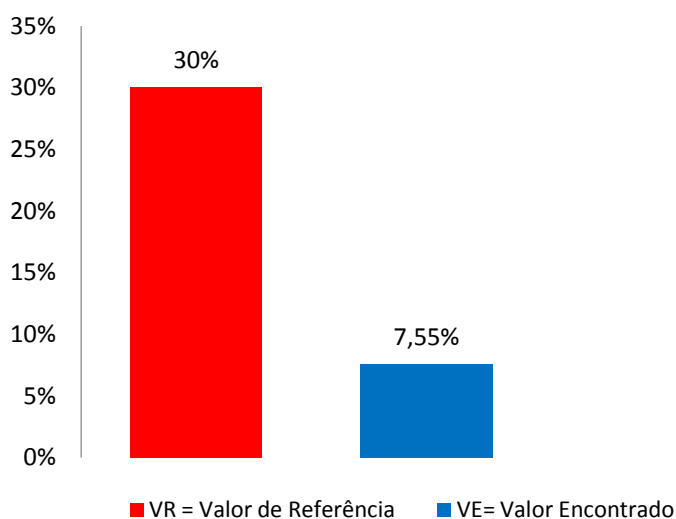
Componentes	Porção de 60g	Porção de 100g
Valor Energético	240Kcal = 1010Kj	400Kcal=1683,3Kj
Carboidratos	18g	30g
Gorduras totais	11g	18,33
Proteínas	22g	36,67g
Gorduras saturadas	2g	3,33g
Fibra bruta	10g	16,67g
Sódio	0mg	0mg
Cálcio	2mg	3,33mg

Ferro	10mg	16,67mg
--------------	------	---------

5.1 DETERMINAÇÃO DE CARBOIDRATOS

Ao serem realizadas as quantificações de carboidratos totais, representados pela soma das frações de açúcares redutores em glicose, não redutores em sacarose e não redutores em amido, foi possível observar que o valor encontrado (7,5555g) equivale a apenas 24% do valor real declarado para a amostra de soja (Figura 10). Desta forma, conclui-se que a metodologia para detecção de açúcares não é apropriada, especialmente nos casos nos quais os teores presentes na amostra são pequenos, uma vez que o método revelou-se com baixa sensibilidade analítica. A falta de eficiência analítica deste método pode também estar associada ao elevado teor de gordura e proteína presentes na amostra. Os dois componentes citados provocam formação de espuma, que dificulta a filtragem e reduz a quantidade de fluido titulante disponível para a análise, bem como não ter considerado o valor para as fibras que também é um tipo de carboidrato pode ter reduzido ainda mais o valor encontrado. Isso não quer dizer que o método não seja bom, porém para essa matéria-prima esse método não se mostrou eficaz.

Figura 10. Comparação dos teores de carboidrato declarados e encontrados na amostra de referencia



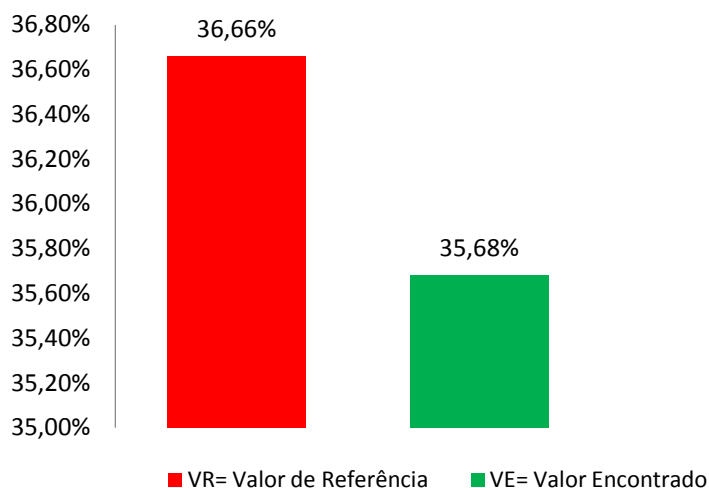
Ao analisar a farinha da soja integral adquiridos da empresa Brejeiro S/A – Orlandia-SP, Costa (2012), encontrou valores de 34,06% de carboidratos, na farinha de soja, determinado por diferença, sem considerar o teor de fibras que faz parte dos carboidratos. Papaleo (2004) informa que a composição média de carboidrato da farinha de soja integral é de 25,6%.

5.2 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA

Segundo Papaleo (2004), a farinha integral de soja é um produto obtido diretamente dos grãos de soja e contém, no mínimo, 40% de proteína e 20% de lipídios. E baseando-se nesta informação uma pesquisa foi feita para verificar o efeito da farinha de soja em massas de pasteis, onde foram encontrados nas análises de proteína cerca de 40,5%, sendo esta uma média para a composição da farinha de soja integral.

Estudos feitos com a farinha de soja integral, por Silva (2012) utilizando o método da AOAC (2000), revelaram valores de 35,53% de proteína, resultado este semelhante ao encontrado utilizando o método de micro kjedal adaptado que foram de 35,94% de proteína, cujo padrão utilizado foi de 36,6666% ou 36,67% relacionado a tabela exposta na própria embalagem, mostrando que o método de micro kjedal adaptado é preciso e exato (Figura 11).

Figura 11. Comparação dos teores de proteína declarados e encontrados na amostra de referencia pelo método de micro Kjedadl



O valor de proteína encontrado na amostra de soja pelo método micro kjedhal, utilizando óxido de mercúrio como catalisador, em substituição à mistura catalítica, foi de 35,95g/100g, bem próximo ao valor de referência de 36,67g/100g. O valor encontrado corresponde, portanto, a 98,04% do valor declarado, sendo considerado o coeficiente de variação menor que 5% e afirmando a eficiência analítica do método.

5.3 DETERMINAÇÃO DE GORDURA

Para a determinação de gordura foi feita a verificação da eficiência em três pontos: os tipos de solventes utilizados que foi o etanol, hexano e éter, as formas de condicionamento da amostra, sendo este em cartucho, papel de filtro e papel de filtro com cartucho e os tipos de vidraria que foram o Soxhlet convencional e o instrumental em bloco.

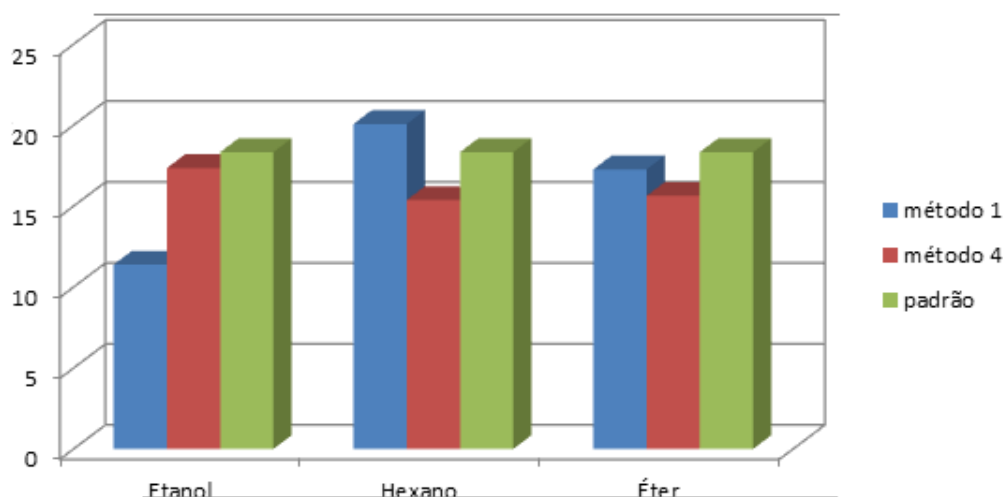
Na Tabela 3 são mostrados os valores médios dos teores de gordura obtidos da amostra de soja sob diversas condições. A metodologia tradicional de Soxhlet consiste na exposição da amostra triturada, acondicionada em cartucho de celulose, à lavagem constante com solventes orgânicos, por um período de 5h. Para este estudo, foram testados tipos de aparelhos diferentes (vidraria e por instrumento), formas de acondicionamento da amostra (cartucho de celulose e papel de filtro) e diferentes solventes (etanol, hexano e éter).

Tabela 3. Médias, desvio padrão e coeficiente de variação dos resultados das análises de gordura pelo método Soxhlet

Métodos	Solventes	Média (%)	DP	CV(%)
MÉTODO 1 Convencional com cartucho	Etanol	11,38	1,993	17,5280
	Hexano	20,07	0,6526	3,2507
	Éter	17,26	0,3363	1,9480
MÉTODO 2 Convencional com papel de filtro	Etanol	11,39	0,4493	3,9456
	Hexano	16,60	0,1772	7,0907
	Éter	16,59	0,4393	2,6474
MÉTODO 3. Instrumental com papel de filtro	Etanol	17,45	0,7683	4,4031
	Hexano	15,95	0,2072	1,2991
	Éter	16,49	0,2834	1,7189
MÉTODO 4. Instrumental com papel de filtro + cartucho	Etanol	17,35	0,118	0,6800
	Hexano	15,37	0,3410	2,2179
	Éter	15,63	0,1896	1,2136
VALOR DE REFERENCIA	-	18,33	-	-

Como os testes realizados envolveram muitas variáveis, será discutida inicialmente a comparação de eficiência entre o método Soxhlet montado com vidrarias e o método instrumental. O gráfico mostrado na Figura 12 revela que a utilização do equipamento de Soxhlet, contendo sensores de ajuste de temperatura na placa de aquecimento e conexão com sistema ajustável de resfriamento de água (torre de resfriamento) é mais eficiente para obtenção de resultado mais confiáveis, quando comparados ao padrão, independente do tipo de solvente utilizado.

Figura 12. Resultado para determinação de gordura pelo método convencional (vidrarias) e instrumental (MÉTODOS 1 e 4) usando três solventes diferentes



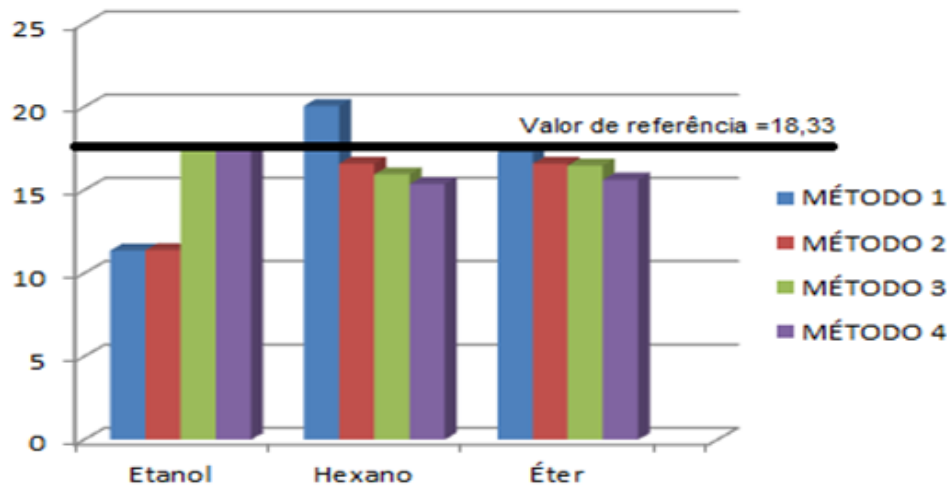
MÉTODO 1. Extração convencional utilizando cartucho de celulose

MÉTODO 4. Extração com Soxhlet instrumental com papel de filtro e cartucho

Ao compararmos a forma de acondicionamento da amostra (cartucho de celulose-MÉTODOS 1 e 4 ou papel de filtro-MÉTODOS 2 e 3), também é possível perceber a superioridade do método instrumental em relação ao sistema de vidraria convencional (Figura 13). Ainda, no sistema instrumental, percebe-se que o etanol apresenta resultados de extração mais próximos do valor de referência, quando comparado ao éter e ao hexano. Este resultado é importante uma vez que o etanol se caracteriza como um solvente de baixo custo, fácil aquisição (é encontrado facilmente no mercado local), baixa toxicidade e baixo impacto ambiental.

O etanol é um solvente muito utilizado para se extrair gorduras, ele não causa problema a saúde de quem o manipula nem ao meio ambiente e a sua recuperação geralmente é maior devido ao seu ponto de ebulição de 80°C, maior que o de hexano e éter. Os outros solventes citados por se ter um ponto de ebulição baixo não se tem um bom rendimento com relação a recuperação do solvente e causa dano a saúde do manipulador e também ao meio ambiente.

Figura 13. Resultado Geral para determinação de gordura pelo método convencional (vidraria) e instrumental, utilizando o etanol, hexano e éter, como solvente



MÉTODO 1. Extração convencional utilizando cartucho de celulose

MÉTODO 2. Extração convencional utilizando o papel de filtro

MÉTODO 3. Extração com Soxhlet instrumental com apenas o papel de filtro

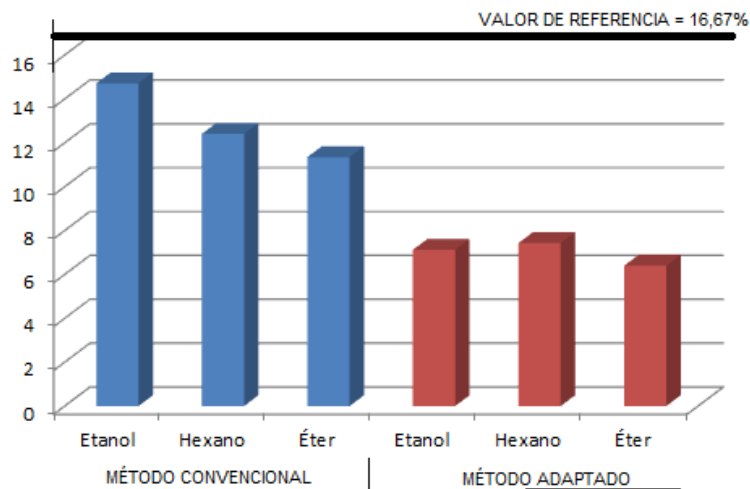
MÉTODO 4. Extração com Soxhlet instrumental com papel de filtro e cartucho

Com relação ao acondicionamento da amostra, o método de Soxhlet instrumental, utilizando somente o papel filtro embrulhado e amarrado ou o papel com cartucho, obtiveram valores próximos ao valor da amostra.

5.4 DETERMINAÇÃO DE FIBRA INSOLÚVEL

A Figura 14 mostra o comportamento dos resultados de fibras utilizando o método adaptado, porém diferenciando na obtenção da amostra desengordurada (tratamento inicial da amostra). Foi chamada de convencional com relação à obtenção da amostra desengordurada para a determinação de fibras, utilizado a extração convencional montado com vidraria, com o uso do papel de filtro e o adaptado no sentido de ter utilizado para conseguir a amostra desengordurada a extração com Soxhlet instrumental em bloco, com papel de filtro e cartucho da análise anterior, por apresentar valores mais próximo da referência, sendo que assim que a amostra foi desengordurada a análise foi efetuada. Em ambos os casos, utilizou-se a técnica de digestão ácida e básica para a análise de fibra, sem conexão dos frascos de digestão com o sistema de resfriamento.

Figura 14. Resultado para fibras pelo método adaptado, diferenciado a obtenção da amostra desengordurada convencional e adaptado



É possível perceber que em ambas, utilizando o método adaptado de fibras, variando apenas na obtenção da amostra desengordurada, não resultaram em respostas confiáveis, uma vez que todos os valores ficaram distantes do valor de referência (16,67%). Desta forma, conclui-se que a metodologia adaptada de fibra utilizada atualmente deverá ser substituída pelo método enzimático-gravimétrico, conforme sugestão do IAL (2008), em que há o uso de enzimas, com menor perda de componentes e uma maior quantificação devido simular as condições do intestino humano.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos mostram que com a metodologia adaptada de Lane-Eynon para determinação de glicídios não foi possível detectar glicídios redutores, somente glicídios não redutores em sacarose e amido, o que apresentou uma distância significativa ao valor de referência. Esta metodologia deve ser utilizada com ressalvas quando a amostra possuir altos teores de proteína e gordura e baixos teores de açúcares, por possuir baixa precisão ou reprodutibilidade.

Para a análise de proteína utilizando o método micro kjeldahl adaptado do Adolf Lutz, os resultados foram precisos com relação a amostra de referência não certificada de soja. O mesmo ocorreu na análise de extração de gordura por Soxhlet, onde foi utilizado o método convencional variando-se os solventes. Neste caso, os valores obtidos entre os

métodos não diferiram entre si, com valores próximos ao valor de referência para lipídios no grão de soja.

No que diz respeito às fibras insolúveis utilizando o método adaptado, variando apenas a obtenção da amostra desengordurada, ambos apresentaram valores distantes ao valor de referência, devendo a metodologia de digestão ser retirada da rotina do laboratório por falta de precisão. Hoje já se tem um equipamento que é o analisador de fibras dietética da marca DANKON que faz o trabalho muito mais rápido, já é validado e totalmente automatizado, porém é muita cara.

ANEXO 1

DETERMINAÇÃO DE GLICÍDIOS (Método de Lane & Eynon Adaptado)

A) DETERMINAÇÃO DE GLICÍDIOS REDUTORES, EM GLICOSE

Material:

Vidro de relógio

Bécker 100mL

Pipeta 2mL

Papel de filtro qualitativo

Balão volumétrico 100mL

Bureta de 25 ou 50mL

Pipeta volumétrica 10mL

Reagentes:

Solução de acetato neutro de chumbo saturada

Sulfato de sódio anidro

Soluções de Fehling A e B tituladas

Procedimentos:

- Pesar 5g da amostra, transferir para um bequer com 50mL de água;
- Adicionar solução de acetato neutro de chumbo saturada, até não haver mais precipitação (aproximadamente 2,0 mL).
- Complete o volume com água, filtre em filtro seco. Adicione sulfato de sódio até precipitar o excesso de chumbo;
- Filtre e transfira o filtrado para uma bureta;
- Transfira com auxílio de pipetas volumétricas, 10mL de cada uma das soluções de Fehling para um erlenmeyer, adicione 40mL de água;
- Aquecer até ebulição e adicionar gota a gota a solução da bureta sobre a solução do balão em ebulição, agitando sempre até que esta passe de azul a incolor (no fundo do balão deverá ficar um resíduo vermelho).

OBS: Na titulação, quando se tornar difícil o desaparecimento da cor azul, adicione ao erlenmeyer, próximo do ponto final, 1mL da solução azul de metileno, como indicador interno. Continue a titulação até completo descoramento da solução. Use as soluções de Fehling tituladas com indicador interno.

CÁLCULO:

Glicídios redutores, em glicose, por cento p/p =

B) DETERMINAÇÃO DE GLICÍDIOS NÃO-REDUTORES, EM SACAROSE

Material:

Pipetas volumétricas 20mL

Balão volumétrico 100mL

Banho-maria

Reagentes:

Ácido clorídrico concentrado;

carbonato de sódio anidro,

Soluções de Fehling A e B tituladas

Procedimentos:

- Transferir com pipeta volumétrica 25mL do filtrado obtido anteriormente para um balão de 100mL;

- Acidule com 0,5mL de HCl concentrado e coloque em banho-maria (temperatura 90-100°C) por 15 minutos. Esfrie, adicione 2 gotas de fenolftaleína 0,1%;
- Neutralize com carbonato de sódio anidro. Complete o volume com água;
- Transfira o filtrado para uma bureta;
- Transfira com auxílio de pipetas volumétricas, 10mL de cada uma das soluções de Fehling para um erlenmeyer, adicione 40mL de água.
- Aqueça até ebulição;
- Adicione gota a gota a solução da bureta sobre solução do balão em ebulição, agitando sempre, até que esta passe de azul a incolor (no fundo do balão deverá ficar um resíduo vermelho).

OBS: Na titulação, quando se tornar difícil o desaparecimento da cor azul, adicione ao erlenmeyer, próximo do ponto final, 1mL da solução azul de metileno, como indicador interno. Continue a titulação até completo descoramento da solução. Use as soluções de Fehling tituladas com indicador interno.

CÁLCULO:

Glicídios não redutores, em sacarose, por cento p/p =

C) DETERMINAÇÃO DE NÃO REDUTORES, EM AMIDO

Material:

Solução de hidróxido de sódio a 10%

Funil de decantação

Soluções de Fehling A e B tituladas

Vidro de relógio

Bécker 100mL

Proveta 50mL

Papel de filtro qualitativo

Erlenmeyer de 300mL,

Autoclave

Balão volumétrico 250 ou 500mL

Bureta de 10mL

Reagentes:

Éter etílico

Ácido clorídrico P. A

Procedimentos:

- Pesar 5g da amostra desengordurada e seca (ou tome uma amostra e trate sucessivamente com 3 porções de 20mL de éter etílico, agite e decante).
- Transfira o material desengordurado para um béquer;
- Adicione 100mL de água destilada, homogeneíze, filtre e lave bem o resíduo a fim de retirar todos os solúveis;
- Transferir o resíduo juntamente com o papel de filtro para um erlenmeyer de 500mL com auxílio de 150mL de água;
- Adicione 4 gotas de NaOH 10%, aqueça em autoclave a 1 atm por 1 hora.
- Esfrie e em seguida adicione 5mL de HCl concentrado (a solução deverá ficar fortemente ácida);
- Aqueça em autoclave por mais 30 minutos.
- Neutralize com NaOH a 10%.
- Transfira para um balão volumétrico de 250 ou 500mL.
- Complete o volume com água e filtre.
- Nesta solução determine glicídios redutores por titulação com solução de Fehling, como indicado para glicídios redutores, em glicose.
-
- **CÁLCULO:**
- Glicídios não redutores, em amido, por cento p/p =
- OBS: não esquecer de multiplicar pelo fator 0,9 (correção do amido)

D) PADRONIZAÇÃO DAS SOLUÇÕES DE FEHLING

DI) PREPARO DAS SOLUÇÕES

FEHLING A: pesar 34,639g de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) e transferir para balão volumétrico de 1000mL. Complete o volume com água.

FEHLING B: pesar 173g de tartarato de sódio e potássio ($\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) e dissolver em 250mL, de água. Adicione 250mL de solução de NaOH a 20%. Complete o volume até 1000mL.

DII) TITULAÇÃO

Transfira para erlenmeyer 10mL de cada uma das soluções A e B. Adicione 40mL de água.

Aqueça até a ebulição e adicione, com auxílio de uma bureta, solução-padrão de glicose a 1% p/v, mantendo a fervura, sob agitação, até a solução tornar-se incolor (no fundo do balão deverá ficar resíduo avermelhado).

DIII) CÁLCULO DO FATOR DAS SOLUÇÕES

Será calculada a quantidade, em gramas, de glicose correspondente a 10mL de cada uma das soluções A e B.

$$f = V \times P$$

$$f = \text{fator}$$

$$V = \text{MI da solução de glicose gasta}$$

$$P = \text{título da solução de glicose (g\% = 0,01)}$$

Obs: o valor de f deverá ser da ordem de 0,05g

ANEXO 2

DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA (MÉTODO MICRO KJEDAL)

Material:

Bloco digestor
Tubos de digestão micro kjedal
Destilador de nitrogênio
Bureta e agitador mecânico
Erlenmeyer de 125mL
Pipetas graduadas

Reagentes:

Óxido de mercúrio
Ácido sulfúrico concentrado
Solução de tiosulfato de sódio 15%
Solução de hidróxido de sódio 40%
Ácido bórico (42g/L)
Verde de bromocresol
Vermelho de metila

PARTE 1. Digestão da amostra

- Pese aproximadamente 1g de amostra, em papel alumínio (3 repetições);
- Transfira a amostra para tubos de digestão micro Kjedal, sem deixar que resíduos de amostras fiquem aderidos à parede do tubo. Adicione 0,2g de óxido de mercúrio e 7mL de ácido sulfúrico concentrado, em cada tubo;
- Coloque os tubos na galeria e em seguida encaixe em cima do bloco digestor (ainda frio). Inicie o aquecimento do bloco, tomando os seguintes cuidados:

1. O bloco digestor deve ser instalado dentro da capela e o controlador de temperatura fora da capela.

2. Ligar a chave geral e iniciar com a programação de temperatura para $\pm 100^{\circ}\text{C}$. Quando a temperatura estabilizar, aumentar gradualmente de 15 em 15 minutos (50 em 50°C) até atingir 350°C .

3. O tempo necessário para a digestão dependerá do tipo de amostra. Em geral, a digestão é finalizada quando a amostra contida no tubo se apresenta azulada/esverdeada e transparente.

4. CUIDADO! Os gases emitidos durante a digestão são tóxicos e, portanto, a inalação deve ser evitada. Procure não ficar dentro do laboratório enquanto a amostra estiver sendo digerida.

- Após a digestão, desligar o bloco e aguardar o resfriamento dos tubos;

PARTE 2. Destilação da amostra

- Adicionar CUIDADOSAMENTE 10mL de água destilada e 1mL de solução de tiosulfato de sódio a 15% à amostra digerida;

- Acoplar o tubo no destilador de nitrogênio, tomando os seguintes cuidados:

1. Limpar previamente todo o sistema de destilação, usando água destilada;

2. Verificar o nível da água da caldeira;

3. Ligar o sistema de circulação de água;

4. Colocar na extremidade do condensador um erlenmeyer de 125mL contendo: 10mL de ácido bórico, 5 gotas de verde de bromocresol e 5 gotas de vermelho de metila. O bico do condensador deve mergulhar na solução.

- Colocar no copo dosador do destilador, no mínimo 50mL de solução de hidróxido de sódio 40%;

- Adicionar lentamente 10mL de hidróxido de sódio 40% sobre a amostra contida no tubo e ligar o termostato para iniciar a destilação;

- Destilar até que se obtenha aproximadamente 50mL do destilado no erlenmeyer;

- Desligar o sistema, começando pelo termostato.

PARTE 3. Titulação da amostra

- Titular em bureta graduada, sob agitação, a amostra contida no erlenmeyer. Usar como solução titulante a solução de ácido sulfúrico 0,1N até aparecimento da cor cinza.

- Anotar o volume gasto na titulação e calcular o teor de nitrogênio.

PARTE 4. Cálculo

$$\% \text{ proteína bruta} = \frac{\text{mL H}_2\text{SO}_4 \times 1,4 \times \text{Normalidade do ácido}}{\text{Fator}}$$

Peso da amostra

Fator=6,38 para leite; 5,70 para farelo de trigo e 6,25 para as demais amostra.

ANEXO 3

DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA PELO MANUAL DE ADOLFO LUTZ MÉTODO DE MICRO KJEDAL

Material

Balança analítica, frascos de Kjeldahl de 500 a 800 mL, chapa elétrica ou manta aquecedora, balão de destilação, frasco Erlenmeyer de 500 mL, bureta de 25 mL, espátula, papel desfada, dedal e pipeta graduada de 25 mL ou pipetador automático.

Reagentes

Ácido sulfúrico

Ácido sulfúrico 0,05 M

Sulfato de cobre

Sulfato de potássio

Dióxido de titânio

Solução fenolftaleína

Vermelho de metila a 1% m/v

Zinco em pó

Hidróxido de sódio a 30% m/v

Hidróxido de sódio 0,1 M

Mistura catalítica – Dióxido de titânio anidro, sulfato de cobre anidro e sulfato de potássio anidro, na proporção 0,3:0,3:6.

Procedimento – Pese 1 g da amostra em papel de seda. Transfira para o balão de Kjeldahl (papel+amostra). Adicione 25 mL de ácido sulfúrico e cerca de 6 g da mistura catalítica. Leve ao aquecimento em chapa elétrica, na capela, até a solução se tornar azul-esverdeada e livre de material não digerido (pontos pretos). Aqueça por mais uma hora. Deixe esfriar. Caso o laboratório não disponha de sistema automático de destilação, transfira quantitativamente o material do balão para o frasco de destilação. Adicione 10 gotas do indicador fenolftaleína e 1 g de zinco em pó (para ajudar a clivagem das moléculas grandes de protídios).

Ligue imediatamente o balão ao conjunto de destilação. Mergulhe a extremidade afilada do refrigerante em 25 mL de ácido sulfúrico 0,05 M, contido em frasco Erlenmeyer de 500 mL com 3 gotas do indicador vermelho de metila. Adicione ao frasco que contém a amostra digerida, por meio de um funil com torneira, solução de hidróxido de sódio a 30% até garantir um ligeiro excesso de base. Aqueça a ebulição e destile até obter cerca de (250-300) mL do destilado. Titule o excesso de ácido sulfúrico 0,05 M com solução de hidróxido de sódio 0,1 M, usando vermelho de metila.

Cálculo

$$\frac{V \times 0,14 \times f}{P} = \text{protídios por cento m/m}$$

V = diferença entre o no de mL de ácido sulfúrico 0,05 M e o no de mL de hidróxido de sódio 0,1 M gastos na titulação, P = no de g da amostra, f = fator de conversão, 6,25.

ANEXO 4

DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA (MÉTODO DO MAPA)

Reagentes:

Material: Bloco digestor	Mistura catalítica (sulfato de cobre e sulfato de potássio)
Tubos de digestão micro kjedal	Ácido sulfúrico concentrado
Destilador de nitrogênio	Solução de tiosulfato de sódio 15%
Bureta e agitador mecânico	Solução de hidróxido de sódio 40%
Erlenmeyer de 125mL	Ácido bórico (42g/L)
Pipetas graduadas	Verde de bromocresol
	Vermelho de metila

PARTE 1. Digestão da amostra

- Pese aproximadamente 0,25g de amostra, em papel alumínio (3 repetições);
- Transfira a amostra para tubos de digestão micro Kjedal, sem deixar que resíduos de amostras fiquem aderidos à parede do tubo. Adicione 0,2g de óxido de mercúrio e 7mL de ácido sulfúrico concentrado, em cada tubo;
- Coloque os tubos na galeria e em seguida encaixe em cima do bloco digestor (ainda frio). Inicie o aquecimento do bloco, tomando os seguintes cuidados:
 1. *O bloco digestor deve ser instalado dentro da capela e o controlador de temperatura fora da capela.*
 2. *Ligar a chave geral e iniciar com a programação de temperatura para $\pm 100^{\circ}\text{C}$. Quando a temperatura estabilizar, aumentar gradualmente de 15 em 15 minutos (50 em 50°C) até atingir 350°C .*

3. *O tempo necessário para a digestão dependerá do tipo de amostra. Em geral, a digestão é finalizada quando a amostra contida no tubo se apresenta azulada/esverdeada e transparente.*

4. **CUIDADO! Os gases emitidos durante a digestão são tóxicos e, portanto, a inalação deve ser evitada. Procure não ficar dentro do laboratório enquanto a amostra estiver sendo digerida.**

- Após a digestão, desligar o bloco e aguardar o resfriamento dos tubos;

PARTE 2. Destilação da amostra

- Adicionar **CUIDADOSAMENTE** 10mL de água destilada e 1mL de solução de tiosulfato de sódio a 15% à amostra digerida;

- Acoplar o tubo no destilador de nitrogênio, tomando os seguintes cuidados:

1. *Limpar previamente todo o sistema de destilação, usando água destilada;*

2. *Verificar o nível da água da caldeira;*

3. *Ligar o sistema de circulação de água;*

4. *Colocar na extremidade do condensador um erlenmeyer de 125mL contendo: 10mL de ácido bórico, 5 gotas de verde de bromocresol e 5 gotas de vermelho de metila. O bico do condensador deve mergulhar na solução.*

- Colocar no copo dosador do destilador, no mínimo 50mL de solução de hidróxido de sódio 40%;

- Adicionar lentamente 10mL de hidróxido de sódio 40% sobre a amostra contida no tubo e ligar o termostato para iniciar a destilação;

- Destilar até que se obtenha aproximadamente 50mL do destilado no erlenmeyer;

- Desligar o sistema, começando pelo termostato.

PARTE 3. Titulação da amostra

- Titular em bureta graduada, sob agitação, a amostra contida no erlenmeyer. Usar como solução titulante a solução de ácido sulfúrico 0,1N até aparecimento da cor cinza.
- Anotar o volume gasto na titulação e calcular o teor de nitrogênio.

PARTE 4. Cálculo

$$\% \text{ nitrogênio total} = V \times N \times f \times 0,014 \times 100$$

$$\% \text{ protídios} = \% \text{ nitrogênio total} \times F$$

Onde:

V= Volume da solução de ácido sulfúrico 0,1N, gasto na titulação em mL.

N= Normalidade do ácido sulfúrico 0,1N.

f= Fator de correção do ácido sulfúrico 0,1N.

F= Fator de conversão da relação nitrogênio/proteína, F= 6,25

ANEXO 5

DETERMINAÇÃO DE GORDURA (MÉTODO SOXHLET)

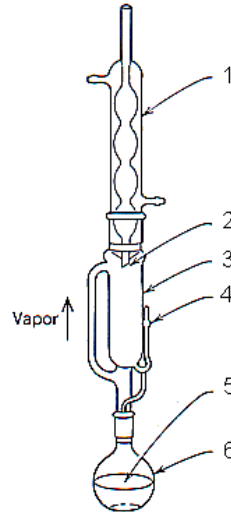


Figura 1. Partes do extrator de soxhlet:

1-condensador;

2-câmara de extração;

3-amostra;

4-sifão;

5-solvente de extração; 6-

Material:

Cartucho de extração
Algodão desengordurado
Aparelho extrator de Soxhlet com aquecimento elétrico
Tubos de ebulição
Estufa 105°C
Dessecador e Vidro de relógio

Procedimento para preparo das amostras:

- Lavar, secar (em estufa por 1 hora) e pesar o tubo de ebulição. Adicionar 100mL do solvente e encaixar o tubo na placa de aquecimento;
- Pesar cerca de 5 gramas da amostra, previamente dessecada (em estufa a 105°C), em vidro de relógio tarado;
- Transferir a substancia seca para o papel de filtro e depois para o cartucho de um aparelho extrator de Soxhlet. Ajustar o aro de metal e encaixar na câmara de extração;
- Ligar o aquecimento e o sistema de circulação de água e deixar extraindo por 5 horas, controlando a temperatura de acordo com a temperatura de ebulição do solvente usado.

Éter etílico: temp. ebulição = 33,6°C

Hexano: temp. ebulição = 69°C

- Após a extração, retire o cartucho e reaqueça até que a secção central do extrator esteja quase cheia, despeje o solvente a recuperar, repita a operação até que o tubo de ebulição esteja quase vazio.
- Evapore o solvente restante sem deixar queimar;
- Coloque o balão com o resíduo em estufa a 105°C (aproxim. 15 minutos);
- Levar para o dessecador até esfriar.
- Pesar e anotar o peso;
- repetir a operação de aquecimento e resfriamento até obter peso constante.

Cálculo:

$$\text{Lípidos por cento p/p} = (P_{t+a} - P_t)/P$$

Onde: P_{t+a} = massa do tubo contendo a amostra; P_t = massa do tubo vazio; P = massa da amostra (g).

ANEXO 6

DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FIBRAS ADAPTADO DO MANUAL DE ADOLF LUTZ 1985

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Material:

Cartucho de extração
Algodão desengordurado
Aparelho extrator de Soxhlet com aquecimento elétrico ou funil de decantação
Tubos de ebulição
Estufa 105°C
Dessecador
Vidro de relógio
Ácido sulfúrico 0,255N
Hidróxido de sódio 0,313N
Etanol
Éter

Procedimento para preparo das amostras

- Pesar 2g da amostra triturada e extrair a gordura com éter, de acordo com a metodologia descrita para extração de gordura em aparelho de Soxhlet (ou em funil de decantação);
- Levar a amostra desengordurada para estufa para eliminação completa do solvente.
- Em um recipiente, adicionar 200mL de ácido sulfúrico 0,255N e em seguida aquecer até ebulição. Usar o ácido aquecido para remover o resíduo da amostra desengordurada e seca transferindo tudo para um erlenmeyer. Adicionar 0,5g de amianto.
- Levar o erlenmeyer contendo a mistura para uma chapa de aquecimento para fervura por 30 minutos (adaptar sistema de resfriamento e agitar de vez em quando).
- Filtrar à vácuo, adaptando ao funil de buckner um papel de filtro e acima dele um pedaço de tecido poliéster.
- Lavar a amostra com água fervente até que o filtrado não se apresente mais ácido.
- Transferir o resíduo para um erlenmeyer e adicionar 200mL de NaOH 0,313N quente.
- Levar o erlenmeyer contendo a mistura para uma chapa de aquecimento para fervura por 30 minutos (adaptar sistema de resfriamento).
- Filtrar em cadinho de Goch e adicionar 50mL de água fervente e 20mL de HCl 1%.
- Lavar a amostra com água fervente até que o filtrado não se apresente mais ácido.
- Lavar a amostra com 20mL de etanol e 20mL de éter.
- Levar a amostra para estufa para secagem por uma hora.
- Pesar até peso constante.
- Levar a amostra para mufla.
- Pesar até peso constante.

Cálculo:

$$\text{Fibra (\%)} = \frac{\text{Pfibra} \times 100}{P}$$

Onde: Pfibra = peso da fibra (última pesagem – peso cadinho vazio)

P = peso da amostra.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Resolução RE nº 899, de 29/05/2003.

ASSIS, L. M. de. Efeitos da parboilização do arroz sobre características nutricionais e tecnológicas de farinhas mistas ternárias

AZEVEDO, L. C. de. Estudo de compostos carbonílicos e os respectivos ácidos hidroxialquilsulfônicos em vinhos. 2007. (Programa de pós-graduação em química)- Universidade Federal da Bahia, 2007.

BARROS, Soja, a semente da destruição e desigualdade, 2010.

BATISTA, M. B. F; GIUSTI C. A de. Análise dos efeitos da intervenção governamental na competitividade da produção de soja em grãos no mato grosso do sul, 2013.

BEDANI, V. R.; MIRANDA, J.; OLIVEIRA, K. F de. Desenvolvimento de um novo produto para a indústria de massas alimentícias: massa de pastel colorida. Universidade Tecnológica Federal do Paraná/ UTFPR, Ponta Grossa, Brasil. v. 02, n. 01, 21 a 25 de maio, 2007.

BRUM, A. A. S. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica. 2004. 66f. Dissertação (Mestrado em Ciências – área de concentração Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2004.

CAMARGO, M. F. Produção de soja para consumo humano: uma estratégia de mercado para o pequeno produtor. 111 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia da Produção) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Ponta Grossa. Curso de PósGraduação em Engenharia de Produção. Ponta Grossa: UTFPR, Campus Ponta Grossa, 2008.

Caracterização físico-química e tecnológica da farinha de soja integral fermentada com *Aspergillus oryzae*, 2012.

CASTRO, L. de.; AYUSO, G. L. E.; *Anal. Chim. Acta*1998, 369, 1.

CECCHI, E. M. Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos- 2ª Ed. rev.- Campinas, SP: Editora da UNICAMP, 2003.

CIABOTTI, S.; BARCELLOS, M. F. P.; MANDARINO, J. M. G.; TARONE, A. G. Avaliações Químicas e Bioquímicas dos Grãos, Extratos e Tofus de Soja Comum e de Soja Livre de Lipoxigenase. *Ciência Agrotecnologia*, Lavras, v. 30, n. 5, p. 920-929, set./out., 2006.

com trigo e soja. 2009. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial)- Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2009.

CONAB. **Acompanhamento da Safra Brasileira**. Grãos. CONAB. Primeiro Levantamento - Intenção de Plantio. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_10_23_13_46_38_boletim_portugues_outubro_2013.pdf. Acesso em: 27 de jan. de 2015.

COSTA, P. F. P.; WAKAYAMA, Gabriela Nomiya,
EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - **Soja. Londrina, Paraná. Cultivares 2014. BRS 257**. Disponível em: <
<http://www.cnpso.embrapa.br/cultivares/BRS257.pdf>> Acesso em 13 de outubro de 2015.

EMBRAPA. **Tecnologias de produção de soja – região central do Brasil 2012 e 2013**. Londrina: Embrapa Soja, 2011. (Sistemas de Produção, n. 15).

ESTEVES, A. A, **Validação em Laboratório de método analítico para bdeterninação do Teor de adipato e ftalato di (2-etil-exila) utilizados como plastificantes em filmes flexíveis de PVC**,2007

FERREIRA, A. E. P.; ALMEIDA L. B. de M. **Validação de métodos cromatográficos por clae para análise da vitaminas B1, B2, B6 e niacina naturalmente presentes em farinha de cereais**, 2008.

FORTI, M. C.; MACIVIERO R. L. A. **Validação de métodos analíticos do laboratório de aerossóis, solução aquosas e tecnologias – LAQUATEC**, 2011.

INMETRO. **Orientação sobre validação métodos analíticos** de. DOQ-CGCRE-008 Revisão 03. Fev. 200310. Disponível em:<
http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ-CGRE-8_03.pdf>Acesso em;04 de janeiro de 2015.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**, 4 ed., 1 ed. digital. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1020 p.

LIMA, M. A. C. **Características sensoriais e físicas de extratos e tofus de soja comum processada termicamente e livre de lipoxigenase**. Ciência Tecnologia Alimentos, v. 27, n. 3, p. 643- 648, 2007.

LIU, K. **Soybeans as functional foods and ingredients**. Columbia Missouri: AOCS Press, 2005. 331 p.

Luiz C. GUTKOSKI, Cassiana TROMBETTA. **Avaliação dos teores de fibra alimentar e de beta-glicanas em cultivares de aveia (*Avena sativa* L)**. Ciênc. Tecnol. Aliment. vol.19 n.3 Campinas Sept./Dec. 1999

MACHADO, F. P. P; QUEIRÓZ, J. H.; OLIVEIRA, M. G. A.; PIOVESAN, N. D.; PELUZIO, M. C. G.; COSTA, N. M. B.; MOREIRA, M. A. **Effects of heating on protein quality of soybean flour devoid of Kunitz inhibitor and lectin**. **Food Chemistry**, London, v. 107, n. 2, p. 649-655, 2008.

MANDARINO, et al. **Trabalhador na transformação caseira de alimentos: soja**. Curitiba: SENAR-PR, 2009

MAPA – **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, Instrução Normativa nº 68 de 12/12/2006.

MARTELLI, A. **Gestão da Qualidade em Laboratório de Análises Clínicas**, 2011.

MAURER, A.L; SOARES, J. L, ROLIM, P. J, **Desenvolvimento de método analítico por clae em comprimidos de beznidazol para a doença de chagas**, 2007.

MOURA, N.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G.; SOUZA, M. C.; DIAS, C. T. S. **Composição de cultivares de soja submetida a diferentes tratamentos térmicos**. Alimentação e Nutrição, Araraquara, v. 18, n. 2, p. 151-160, 2007.

OLIVEIRA, Rosicler B. **Composição química e valor proteico do resíduo de soja em relação ao grão de soja**, 2006.

PAPALEO, V. T. **As propriedades da proteína de soja na alimentação humana**. 2004. 44 f. Monografia (Especialização em Qualidade em Alimentos)- Centro de excelência em turismo, Universidade de Brasília, Brasília, 2004.

PASTORE, S. M. **Mercado de milho, farelo de soja e ovos no Brasil de 2010 a 2013**. 2013

PAUCAR-MENACHO, L. M.; BERHOW, M. A.; MANDARINO, J. M G.; DE MEJIA, E. G.; CHANG, Y. K. **Optimization of germination time and temperature on the concentration of bioactive compounds in Brazilian soybean cultivar BRS 133 using response surface methodology**. Food Chemistry, London, v. 119, n. 2, p. 636-642, 2010.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, J. C. S. F.; MELO, L. F. C. **Validação em métodos cromatográficos**. Química Nova, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

SILVA, A. P, **Como iniciar a validação de métodos analíticos**, 2006.

SILVA, J. F. **Inter-relações entre produção e demanda da soja e de proteína animal**, 2014.

SILVA, L. H.; CELEGHINI, R. M. S; CHANG, Y. K. **Effect of fermentation of whole soybean flour in the isoflavone conversion from glycosides to aglycones**. Food Chemistry, London, v. 128, n. 3, p. 640-644, 2011.

SILVA, Leomar H. **Caracterização físico-química e tecnológica da farinha de soja integral fermentada com *Aspergillus Oryzal***, 2012.

SILVA, R. do N. **Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel**, 2003.

SWARTZ, M. E.; KRUUL, J. S. **Validação de métodos cromatográficos**. Pharmaceutical Technology, p. 12-20, 1998.

SOARES, M. L. V. **Como obter resultados confiáveis em cromatografia.** Revista do Instituto Adolfo Lutz, v 60, n. 1, p. 79-84,2001.

TACO – **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos** – 4ª edição revisada e ampliada, Campinas – SP, 2011.

YAGO, G. **Da soja ao óleo de soja: Benefícios a saúde.** 2014