



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

HERICK MACEDO SANTOS

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA A DETERMINAÇÃO DE
MACRO E MICROELEMENTOS EM AMOSTRAS DE GUARANÁ (*Paullinia cupana*)
PRODUZIDAS NA REGIÃO SUL DA BAHIA**

ILHÉUS- BAHIA

2017

HERICK MACEDO SANTOS

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA A DETERMINAÇÃO DE
MACRO E MICROELEMENTOS EM AMOSTRAS DE GUARANÁ (*Paullinia cupana*)
PRODUZIDAS NA REGIÃO SUL DA BAHIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC, como parte dos requisitos para obtenção de grau de Mestre em Química. Área de concentração: Química Analítica Aplicada. Linha de pesquisa: Desenvolvimento de métodos analíticos.

Orientador: Prof. Dr. Raildo Mota de Jesus

ILHÉUS-BAHIA

2017

S237 Santos, Herick Macedo.
Desenvolvimento de método analítico para determinação de macro e micro elementos em amostras de guaraná (Paullinia Cupana) produzidas na região sul da Bahia / Herick Macedo Santos. – Ilhéus : UESC, 2016.
97f. : il.
Orientador : Raildo Mota de Jesus.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Mestrado Programa de Pós-graduação em Química.
Inclui referências.

Guaraná – Sementes – Nutrientes. 2. Química analítica.
Guaraná – Cultivo – Bahia, Sul. 4. Guaraná – Mata atlântica.
I. Jesus, Raildo Mota de. II. Título.

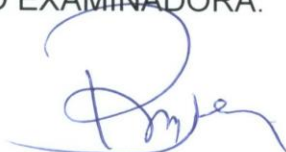
CDD - 543.08

HERICK MACEDO SANTOS

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA A
DETERMINAÇÃO DE MACRO E MICROELEMENTOS EM
AMOSTRAS DE GUARANÁ (*Paullinia cupana*) PRODUZIDAS NA
REGIÃO DO SUL DA BAHIA

Ilhéus-BA, Ilhéus, 07 de março de 2017.

COMISSÃO EXAMINADORA:



Prof(a). Dr. Raildo Mota de Jesus
Doutor em Química - UFBA
Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC
Orientador(a)



Prof(a). Dr. Fábio Alan Carqueija Amorim
Doutor em Química - UFBA
Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC



Prof(a). Dra. Maria das Graças Korn
Doutora em Ciências - USP
Universidade Federal da Bahia - UFBA

Dedico este trabalho aos meus pais **Edmar Novaes** e **Railda Macedo**, pelo amor e apoio incondicional. E ao meu irmão **Ransnei Macedo**, pela amizade e carinho.

AGRADECIMENTOS

À Deus, criador do Céu e da Terra, pela sua infinita bondade e por sempre me dar força e sabedoria para alcançar meus objetivos.

À toda minha família, que sempre está torcendo e orando por mim. Em especial aos meus pais Edmar e Railda, e o meu irmão Ransnei.

À minha namorada Rose pelo amor, apoio, compreensão, companheirismo e por estar sempre do meu lado em todas as situações.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Raildo Mota de Jesus, pela confiança, valiosas conversas, conselhos e ensinamentos. E pela grande amizade que foi construída ao longo desses dois anos de trabalho.

Ao Dr. Janclei Pereira, pela amizade e auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

À todo o quadro de professores do PPGQUIM, em especial aos professores Dr. Ivon Pinheiro, Dr. Fábio Alan Carqueija, Dr. Daniel de Castro, Dr. Erik Galvão e Dr. Antônio Santana pelos ensinamentos nas disciplinas de Química Analítica.

À Câmara Setorial do Guaraná do Baixo Sul, em especial ao Sr. Gerval Teófilo Brito e demais colaboradores, aos técnicos agrícolas da região, pelo apoio, disponibilidade e grande mobilização para a coleta das amostras, e aos produtores de guaraná pelo fornecimento das amostras.

À todos os amigos e colegas da turma 2015.1 e demais colegas da UESC, especialmente Ivero, Erivelton, Ohana, Rândilla, Iago, Analu Rocha, Analu Reis, Wellington, Tatielle, Gabriel, Pedro Kaynnan, Gleydison, José Lucas Ferraz e Lucas, por todas as resenhas e momentos de diversão.

Aos amigos do Laboratório de Pesquisa em Química Analítica: Clissiane, Milana, Luana, José Lucas, Madson, Givaldo, Nicolas, George e André, pela constante ajuda no laboratório e momentos de descontração.

Aos amigos Cayo, Tiago e Vinícius Câmara, pela boa convivência em tempos de república.

Ao secretário do PPGQUIM, Maurício Dezidério, pelas resenhas no colegiado e pela amizade construída.

À Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) e ao Laboratório de Solos da Comissão do Plano Executivo da Lavoura Cacaueira (CEPLAC) pela estrutura oferecida para execução do trabalho.

À FAPESB, pela concessão da bolsa de estudos e financiamento do projeto.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste trabalho

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição centesimal de guaraná em pó.....	21
Tabela 2: Produção nacional dos principais estados produtores de guaraná.....	23
Tabela 3: Recomendação de ingestão diária, fontes alimentares conhecidas e principais funções de alguns minerais à saúde humana.	25
Tabela 4: Propriedades dos principais reagentes empregados para decomposição via úmida.....	27
Tabela 5: Recentes aplicações de procedimentos de decomposição assistida por radiação micro-ondas usando ácido nítrico diluído	34
Tabela 6: Parâmetros instrumentais do ICP OES e linhas de emissão selecionadas para análise	42
Tabela 7: Relação das amostras de guaraná coletadas para análise.....	44
Tabela 8: Programa de aquecimento do forno micro-ondas aplicado para a decomposição das amostras.....	46
Tabela 9: Composição e concentração resultante de HNO ₃ dos pseudocomponentes utilizados no planejamento.....	47
Tabela 10: Matriz do planejamento de misturas com pseudocomponentes e proporções reais dos componentes	48
Tabela 11: Matriz de dados do planejamento de misturas e suas respectivas respostas experimentais.....	52
Tabela 12: Resumo da ANOVA para as respostas experimentais avaliadas.....	58
Tabela 13: Coeficientes dos modelos matemáticos e seus respectivos erros-padrão	61
Tabela 14: Comparação entre os valores previstos pelo modelo e valores obtidos	66
Tabela 15: Concentração equivalente ao sinal de fundo, limites de detecção e quantificação, desvio padrão relativo e faixa linear de trabalho para o procedimento proposto.	71
Tabela 16: Coeficientes das equações geradas pelas curvas de calibração externa e com adição de analito	73
Tabela 17: Testes estatísticos aplicados aos analitos nas curvas de calibração.....	73
Tabela 18: Comparação entre os valores encontrados com o método proposto e os valores certificados nos CRM's.	75

Tabela 19: Teste de adição e recuperação dos analitos em dois níveis de concentração	76
Tabela 20: Valores médios da concentração dos analitos nas amostras de guaraná provenientes dos municípios de Nilo Peçanha e Valença.	78
Tabela 21: Valores médios da concentração dos analitos nas amostras de guaraná provenientes do município de Taperoá.....	79
Tabela 22: Valores médios da concentração dos analitos nas amostras de guaraná provenientes do município de Camamu	80
Tabela 23: Faixa de concentração dos elementos nas amostras de guaraná coletadas em cada município e faixa geral de concentração.	83
Tabela 24: Estimativa da porcentagem de contribuição para a IDR de Ca, Mg, K, P, Cu, Fe, Mn e Zn considerando o consumo de 15 g de uma amostra de guaraná	86

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: (A) guaranazeiro (<i>Paullinia cupana</i> var. <i>Sorbillis</i>); (B) guaraná (fruto).....	21
Figura 2: Mapa da região Baixo sul da Bahia.	22
Figura 3: Representação ilustrativa do ciclo de regeneração do ácido nítrico.	31
Figura 4: Representação gráfica de um planejamento simplex centroide	39
Figura 5: Representação geográfica de um planejamento simplex centroide com pseudocomponentes.....	40
Figura 6: Distribuição dos pontos experimentais no triângulo do planejamento de misturas.	47
Figura 7: Gráfico de ‘outlier T’ versus ‘número do experimento’ para a resposta ‘K’. (A) antes do tratamento do resíduo; (B) após o tratamento do resíduo.	53
Figura 8: Gráficos de valores preditos <i>x</i> observados e resíduos <i>x</i> valores observados para as respostas ‘Cu’ e ‘Fe’	54
Figura 9: Gráficos de valores preditos <i>x</i> observados e resíduos <i>x</i> valores observados para as respostas ‘K’, ‘Mg’ e ‘Mn’	55
Figura 10: Gráficos de valores preditos <i>x</i> observados e resíduos <i>x</i> valores observados para as respostas ‘P’, ‘S’ e ‘Zn’	56
Figura 11: Gráficos de valores preditos <i>x</i> observados e resíduos <i>x</i> valores observados para as respostas ‘acidez residual’ e ‘teor de carbono residual’ (RCC).	57
Figura 12: Gráficos de Pareto gerados para as respostas ‘Cu’, ‘Fe’, ‘K’, ‘Mg’, ‘Mn’ e ‘P’.	59
Figura 13: Gráficos de Pareto gerados para as respostas ‘S’, ‘Zn’, ‘acidez residual’ e ‘teor de carbono residual’ (RCC).....	60
Figura 14: Gráfico de contorno e superfície de resposta para a proporção entre os pseudocomponentes usando desejabilidade global como resposta.....	64
Figura 15: Gráfico de desejabilidades para cada resposta individual e desejabilidade combinada.....	65
Figura 16: Solução da amostra em frasco de PFA após decomposição em forno micro-ondas e solução resultante após diluição com água ultrapura em frasco de polipropileno.....	68
Figura 17: Teor de carbono residual e acidez residual da solução resultante em cada experimento do planejamento de misturas..	69

Figura 18: Gráfico de pesos PC1 x PC2 com as variáveis Mg, S, P, Ca, K, Cu, Mn, Fe e Zn.
..... 81

Figura 19: Gráfico de escores PC1 x PC2 das amostras de guaraná.. 81

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
AOAC	Associação de Químicos Analíticos Oficiais (do inglês <i>Association of Official Analytical Chemists</i>)
AR	Acidez residual
BEC	Concentração equivalente ao sinal de fundo (do inglês <i>background equivalent concentration</i>)
CRM	Material de referência certificado (do inglês <i>certified reference material</i>)
DO	Denominação de origem
DOC	Teor de carbono orgânico dissolvido (do inglês <i>dissolved organic carbon</i>)
FAAS	Espectrometria de absorção atômica com chama (do inglês <i>flame absorption atomic spectrometry</i>)
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (do inglês <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>)
IBGE	Instituto brasileiro de geografia e estatística
ICP OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (do inglês <i>inductively coupled plasma optical emission spectrometry</i>)
IDR	Ingestão diária recomendada
INPI	Instituto Nacional da Propriedade Industrial
IP	Indicação de procedência
IUPAC	União internacional de química pura e aplicada (do inglês <i>International union of pure and applied chemistry</i>)
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
NIST	Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (do inglês <i>National Institute of Standards and Technology</i>)
PFA	Perfluoroalcóxi
PTFE	Politetrafluoretileno
RCC	Teor de carbono residual (do inglês <i>residual carbon content</i>)
RSM	Metodologia de superfície de resposta (do inglês <i>response surface methodology</i>)
SBR	Relação entre sinal do analito e sinal de fundo
RSD	Desvio padrão relativo (do inglês <i>relative standard deviation</i>)
WHO	Organização Mundial da Saúde (do inglês <i>World Health Organization</i>)

SUMÁRIO

RESUMO	15
ABSTRACT	16
1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	19
2.1. Objetivo geral	19
2.2. Objetivos específicos	19
3. REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1. O guaraná	20
3.1.1. Perspectivas históricas e econômicas	20
3.1.2. Guaraná da Mata Atlântica.....	22
3.2. Importância dos elementos nutrientes para a saúde humana	24
3.3. Estratégias de preparo de amostra para a determinação multielementar em alimentos.....	26
3.3.1. Decomposição assistida por radiação micro-ondas em sistema fechado	29
3.4. Técnicas de otimização multivariada para o preparo de amostras.....	36
3.4.1. Planejamento de misturas.....	37
4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	42
4.1. Equipamentos e materiais utilizados.....	42
4.2. Reagentes e soluções.....	43
4.3. Amostragem.....	44
4.4. Pré-tratamento das amostras	45
4.5. Preparo das amostras.....	45
4.6. Otimização multivariada do procedimento de preparo de amostra.....	46
4.7. Determinação da acidez residual.....	48
4.8. Determinação de carbono residual.....	49

4.9. Validação do método analítico.....	49
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1. Otimização do procedimento de preparo de amostra.....	51
5.2. Determinação da condição ótima.....	62
5.3. Eficiência de decomposição.....	68
5.4. Validação do método analítico.....	71
5.5. Aplicação do método analítico em amostras de guaraná produzidas na Bahia	77
5.5.1. Avaliação da concentração dos macro e microelementos nutrientes	83
6. CONCLUSÕES	87
PERSPECTIVAS FUTURAS.....	88
REFERÊNCIAS	89

RESUMO

O guaraná (*Paullinia cupana*) é uma espécie nativa da região Amazônica e bastante tradicional no Brasil. As sementes de guaraná exibem grande ação estimulante devido à elevada concentração de metilxantinas (principalmente cafeína) em sua composição química. Adicionalmente, o guaraná é também uma rica fonte de flavonóides como catequina e epicatequina, caracterizando-o como uma espécie com potencial atividade antioxidante. No entanto, estudos acerca da concentração de macro e microelementos nutrientes nesse fruto ainda são bastante escassos na literatura. Este trabalho teve como objetivo desenvolver um procedimento de preparo de amostras para a determinação de K, Mg, Ca, P, S, Cu, Fe Mn e Zn em amostras de sementes de guaraná empregando espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES). O procedimento de preparo de amostra foi baseado em decomposição assistida por radiação micro-ondas usando ácido nítrico diluído auxiliado por peróxido de hidrogênio. Para otimização do procedimento, foi aplicado um planejamento de misturas simplex centroide com pseudocomponentes usando HNO₃, H₂O₂ e H₂O, e um programa de aquecimento previamente estabelecido para o forno micro-ondas. Os modelos matemáticos gerados foram submetidos à ANOVA ($p < 0,05$), onde não apresentaram falta de ajuste significativa. Para predição da melhor condição experimental, adotou-se a otimização multiresposta desenvolvida por Deringer e Suich, em que os critérios e as respostas avaliadas foram: maximização do sinal analítico de cada elemento de interesse e minimização da acidez residual e do teor de carbono residual, simultaneamente. A melhor condição experimental para a decomposição de aproximadamente 250 mg de amostra foi resultante de uma mistura com concentração final de HNO₃ igual a 0,9 mol L⁻¹, constituída por 1,0 mL de HNO₃ (9,0 mol L⁻¹), 3,0 mL de H₂O₂ e 6,0 mL de H₂O. Nessa condição, a acidez residual e o teor de carbono residual dos digeridos finais (aferidos para 25 mL) foram de 0,4 mol L⁻¹ e 6,5%, respectivamente. O método proposto foi validado considerando os seguintes parâmetros analíticos: limite de detecção, limite de quantificação, faixa linear de trabalho, robustez do plasma, efeito de matriz e precisão. A exatidão do método foi avaliada através do teste de adição e recuperação de analitos em uma amostra real e também por análise dos materiais de referência certificados de farinha de arroz (*Rice Flour*, NIST 1568b), agulhas de pinheiro (*Pine Needles*, NIST 1575a) e cereal matinal fortificado (*Fortified Breakfast Cereal*, NIST 3233). O método proposto foi aplicado para a determinação de K, Ca, Mg, S, P, Cu, Fe, Mn e Zn em 72 amostras de sementes de guaraná produzidas na região do Baixo Sul do estado da Bahia, Brasil. A Análise de Componentes Principais (PCA) mostrou que amostras provenientes de quatro diferentes municípios (Camamu, Nilo Peçanha, Taperoá e Valença) e submetidas a distintos procedimentos de secagem (sol, estufa natural e aguidá) não foram discriminadas em função dos macro e microelementos estudados. As amostras de sementes de guaraná analisadas apresentaram as seguintes faixas de concentração (mg kg⁻¹): K (5247 - 8434), Ca (424 - 2356), Mg (564 - 1163), S (1008 - 1437), P (1118 - 1905), Cu (7,2 - 16,2), Fe (25,9 - 462), Mn (6,5 - 32,5) e Zn (13,7 - 26,5). Foi demonstrado que, embora seja consumido especialmente pelo elevado teor de cafeína, o guaraná também pode ser uma boa fonte de elementos nutrientes ao organismo humano. Este trabalho apresenta resultados inéditos sobre a composição mineral de amostras de guaraná produzidas no estado da Bahia.

Palavras-chave: guaraná, macro e microelementos, preparo de amostra, ácido nítrico diluído, ICP OES, planejamento de misturas.

ABSTRACT

Guarana (*Paullinia cupana*) is a typical species of the Amazon region and quite traditional in Brazil. The guarana seeds exhibit strong stimulating action due to high methylxanthines concentration (mainly caffeine) in its chemical composition. Furthermore, guarana is also a rich source of flavonoids such as catechin and epicatechin, characterizing it as a species with potential antioxidant activity. However, works about the concentration of macro and microelements nutrients in this fruit are very scarce in the literature. This work aimed to develop a sample preparation procedure for determination of K, Mg, Ca, P, S, Cu, Fe Mn and Zn in guarana seeds samples employing inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES). The sample preparation procedure was based on microwave-assisted digestion with diluted nitric acid plus hydrogen peroxide. For procedure optimization, it was used a simplex centroid mixture design with HNO₃, H₂O₂, H₂O, and a heating program previously established. The mathematical models generated were submitted to ANOVA ($p < 0.05$), not being observed evidence of significant lack of fit at 95% confidence level. To predict the optimal experimental condition, it was adopted the multi-response optimization proposed by Deringer and Suich, in which the evaluated criteria and responses were: analytical signal maximization of each element and minimization of residual acidity and residual carbon content, simultaneously. The best condition for digestion of 250 mg sample mass resulted in a mixture of a final concentration of 0.9 mol L⁻¹ HNO₃, constituted by 1.0 mL of HNO₃ (9.0 mol L⁻¹), 3.0 mL of H₂O₂ and 6.0 mL of H₂O. In this condition, the residual acidity and residual carbon content of final digested (measured to 25 mL) were 0.4 mol L⁻¹ and 6.5 %, respectively. The method was validated considering the follow analytical parameters: limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), linear working range, plasma robustness, matrix effects and precision. Accuracy was evaluated by spike additions and recovery test in real guarana sample and by analyzing the Rice Flour certified reference material (NIST 1568b), Pine Needles (NIST 1575a) and Fortified Breakfast Cereal (NIST 3233). The proposed method was applied for the determination of K, Ca, Mg, S, P, Cu, Fe, Mn and Zn in 72 guarana seed samples from Bahia's Southern Lowlands, Brazil. Principal Component Analysis (PCA) showed that samples from different cities (Camamu, Nilo Peçanha, Taperoá and Valença) and submitted to different drying procedure (sun, greenhouse and "aguidá") were not discriminated according to the concentration of macro and microelements studied. The analyzed guarana seed samples presented the following range concentrations (mg kg⁻¹): K (5247 - 8434), Ca (424 - 2356), Mg (564 - 1163), S (1008 - 1437), P (1118 - 1905), Cu (7.2 - 16.2), Fe (25.9 - 462), Mn (6.5-32.5) and Zn (13.7 - 26.5). Although it's consumed especially due to high caffeine concentration, was demonstrated that guarana can also be a good source of nutrient elements to the human organism. This work presents unpublished results about the mineral composition of guarana seed samples produced in Bahia State, Brazil.

Keywords: guarana, macro and microelements, sample preparation, diluted nitric acid, ICP OES, mixture design.

1. INTRODUÇÃO

O guaraná (*Paullinia cupana*) é uma planta de origem amazônica e reconhecida em todo o mundo por suas propriedades estimulantes e medicinais. Embora seja nativa do estado do Amazonas, essa espécie encontrou condições edafoclimáticas extremamente favoráveis ao seu desenvolvimento no Baixo Sul da Bahia. Há mais de uma década o estado baiano tornou-se o maior produtor de guaraná do Brasil, superando o estado do Amazonas tanto em área plantada como em produção (SUFRAMA, 2003). No Baixo Sul do Estado, a cultura do guaraná possui grande relevância social e econômica, tendo em vista que sua exploração é exclusiva de pequenos e médios produtores da região.

Em termos comerciais, o Brasil é o principal produtor de guaraná no mundo, atendendo sozinho pela grande demanda do produto por parte das indústrias de bebidas não alcoólicas no mercado interno e no exterior. Sua comercialização é tradicionalmente praticada em forma de ramas (sementes secas), após processo de beneficiamento do fruto *in natura* (EMBRAPA, 2005). As sementes de guaraná são bastante conhecidas por sua ação estimulante ao sistema nervoso central, fato associado à elevada concentração de metilxantinas (principalmente cafeína) em sua composição química (WECKERLE; STUTZ; BAUMANN, 2003). Outros estudos também revelaram que o consumo moderado de guaraná pode trazer importantes benefícios para a saúde, tais como prevenção de doenças cardiovasculares (KUSKOSKI *et al.*, 2005), atividade antimicrobiana (BASILE *et al.*, 2005; MAJHENIC; SKERGET; KNEZ, 2007), e atividade antioxidante, a qual é atribuída principalmente pela presença dos flavonoides catequina e epicatequina (MATTEI *et al.*, 1998; KLEIN; LONGHINI; MELLO, 2012; BITTENCOURT *et al.*, 2016). Entretanto, ainda são bastante escassos os estudos sobre a concentração de elementos nutrientes neste importante e tradicional fruto brasileiro.

Em amostras de alimentos, a determinação de elementos nutrientes é amplamente realizada empregando-se técnicas analíticas baseadas em absorção ou emissão atômica (DUGO *et al.*, 2012). Antes da etapa de determinação, as amostras são submetidas a um prévio tratamento de modo a converter a amostra em uma solução apropriada à introdução no equipamento. Os métodos convencionais de preparo de amostra trazem uma série de desvantagens, incluindo o alto consumo de tempo (o que implica em frequência analítica relativamente baixa), a utilização de grandes quantidades de reagentes concentrados e de grau analítico (não desejável por questões econômicas e de segurança), além dos riscos de

contaminação da amostra, que pode comprometer a precisão e exatidão dos resultados (KORN *et al.*, 2008; FLORES *et al.*, 2016).

Diante deste impasse, estratégias baseadas em decomposição assistida por radiação micro-ondas em sistemas fechados se credenciam como excelentes alternativas para o pré-tratamento de amostras. Além de minimizar riscos associados à contaminação externa, este procedimento pode reduzir consideravelmente tanto o tempo de preparo de amostra como também os volumes de reagentes utilizados. Outra característica interessante é a possibilidade de utilizar soluções de ácido diluído combinado com peróxido de hidrogênio para a decomposição de amostras, sem que haja redução na eficiência de decomposição (NÓBREGA; DONATI, 2011; NÓBREGA *et al.*, 2012).

Em função da grande relevância socioeconômica do guaraná para a região do Baixo Sul baiano e levando-se em consideração a carência de informações acerca de sua composição mineral e de caracterização da qualidade do produto, há grande necessidade pelo desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação de elementos essenciais em sementes de guaraná produzidas no nosso Estado. Essa dissertação faz parte de um projeto de pesquisa com o título “Avaliação da composição de amostras de guaraná (*Paullinia cupana*) por técnicas espectroanalíticas visando a indicação de origem”, financiado pelo PRONEM, FAPESB/CNPq. Termo de outorga PNE 011/2014.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Desenvolver um procedimento analítico para o preparo de amostras de sementes de guaraná visando a determinação de macro e microelementos por espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES).

2.2. Objetivos específicos

- Desenvolver um procedimento de decomposição de amostras de guaraná assistida por radiação micro-ondas empregando ácido nítrico diluído auxiliado por H_2O_2 ;
- Otimizar o procedimento de decomposição assistida por radiação micro-ondas utilizando planejamento de misturas com HNO_3 , H_2O e H_2O_2 ;
- Validar e aplicar o procedimento para a determinação de K, Mg, Ca, S, P, Cu, Fe, Mn e Zn em amostras de sementes de guaraná produzidas em diferentes municípios da região do Baixo Sul da Bahia empregando ICP OES.
- Aplicar análise de componentes principais (PCA) para verificar possíveis semelhanças e disparidades entre as amostras em função da concentração de macro e microelementos.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. O guaraná

3.1.1. Perspectivas históricas e econômicas

O cultivo de guaraná iniciou-se ainda na época pré-colombiana por indígenas da tribo Sateré-Mawé, na região leste do Amazonas, e também pela tribo Andiras no Alto Rio Negro, próximo às fronteiras da Colômbia e Venezuela. Há relatos de que o guaraná já era consumido por esses povos em forma de uma bebida ritual, preparada a partir da trituração do guaraná e posterior dissolução em água. Tal bebida era eficaz contra febre, cãibras e dores de cabeça, além de apresentar propriedades diuréticas e antidiarreicas (HENMAN, 1982; ALMEIDA, 2007).

A planta que produz o guaraná é conhecida popularmente aqui no Brasil como guaranazeiro. Trata-se de uma planta perene e arbustiva, pertencente à família Sapindaceae (HENMAN, 1982). Em homenagem ao médico e botânico alemão Christian Franz Paullini (1643-1712), o gênero dessa planta foi classificado como *Paullinia*. Para a espécie foi adotado o nome “cupana”, como é conhecido o fruto em outros países sul-americanos como Colômbia e Venezuela (GONÇALVES, 1971). Por estas razões o guaraná recebeu o nome científico *Paullinia cupana*.

Estudos realizados pelo botânico Adolpho Ducke por volta de 1937 revelaram algumas diferenças morfológicas entre o guaraná encontrado no Amazonas e a “cupana” encontrada na região do Alto Rio Negro venezuelano. Devido a essa diversidade, o guaraná foi classificado em duas principais variedades geográficas: *Paullinia cupana* var. *Typica* para as espécies da Colômbia e Venezuela; e *Paullinia cupana* var. *Sorbillis* para a espécie nativa do Brasil, considerado o guaraná tradicional e único que é explorado comercialmente (DUCKE, 1937; SCHIMPL *et al.*, 2013).

O guaraná possui aspecto físico bastante peculiar (Figura 1). O fruto consiste em uma cápsula pequena com pedúnculo desenvolvido, que no período de maturação apresenta pericarpo de coloração vermelha-alaranjada e pode conter até três ou quatro sementes revestidas por um tegumento fino. Após a maturação completa, o fruto se abre e expõe parcialmente a(s) semente(s) de cor castanha escura, envolvida(s) por um arilo branco, assemelhando-se bastante com um olho humano (SCHIMPL *et al.*, 2013). A Tabela 1 traz informações acerca da composição centesimal de guaraná em forma de pó produzido no estado do Amazonas (AGUIAR, 1996).

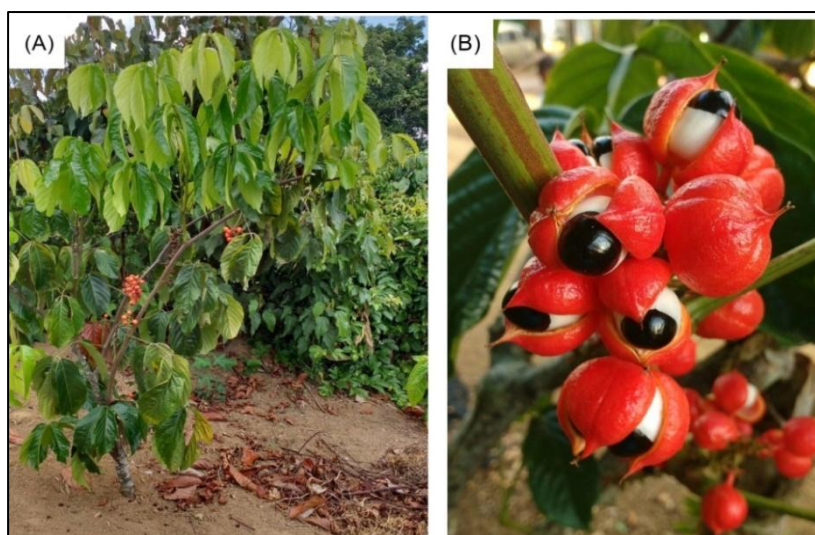


Figura 1: (A) guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *Sorbilis*); (B) guaraná (fruto). Fonte: autor.

Tabela 1: Composição centesimal do guaraná em pó

Composição por 100 g de guaraná em pó						
Umidade (%)	Proteína (g)	Cinza (g)	Lipídios (g)	Carboidrato (g)	Fibra (g)	Energia (kcal)
8,17	16,46	1,03	2,76	70,96	-	374,60

Fonte: Adaptado de AGUIAR (1996)

A comercialização do guaraná é amplamente praticada em forma de sementes (ou ramas). O processamento pós-colheita envolve inicialmente o despulpamento manual do fruto após período de dois ou três dias de fermentação, para facilitar a remoção da casca, e posterior lavagem com água. Em seguida, as sementes são submetidas a um procedimento de secagem para redução do teor de umidade (EMBRAPA, 2005). Segundo a portaria do MAPA (1982) que regulamenta a classificação do guaraná, as sementes com qualidade ideal para comercialização devem apresentar no máximo 12% de umidade, 2% de impurezas (detritos do guaranazeiro) e apenas 8% de defeitos (grãos danificados).

O Brasil é praticamente o único produtor de guaraná em todo o mundo, com exceção de pequenas áreas plantadas em algumas regiões da Venezuela e Peru, onde o cultivo comercial também é realizado (SUFRAMA, 2003; CONAB, 2007). Entre os anos 2008 e 2016, a produção média nacional foi superior a 3800 toneladas, dividida entre estados da região norte, nordeste e centro-oeste (CONAB, 2013; CONAB, 2016). Para a safra de 2017, a estimativa de produção é de algo próximo a 3280 toneladas de sementes de guaraná, conforme aponta dados do IBGE divulgados pela conjuntura mensal da CONAB (2017).

O mercado do guaraná no Brasil é fortemente impulsionado pelo elevado consumo de bebidas gaseificadas e energéticas no mundo (KURI, 2008). Estima-se que aproximadamente

70% das sementes de guaraná produzidas no país são adquiridas por indústrias nacionais de bebidas, sendo 45% destinadas à produção de bebidas gaseificadas e 25% à produção de bebidas mistas e energéticas. Os outros 30% são destinados à produção de guaraná em pó e algumas formulações farmacêuticas (KURI, 2008; SUFRAMA, 2003; SCHIMPL *et al.*, 2013).

3.1.2. Guaraná da Mata Atlântica

Até a década de 80, o estado do Amazonas era disparadamente o maior estado guaranaicultor do Brasil. O município de Maués era o principal destaque, detendo cerca de 90% da produção no país (SCHIMPL *et al.*, 2013). Entretanto, após a regulamentação da Lei dos Sucos¹ (1973) pelo Ministério da Agricultura, houve uma maior demanda de guaraná em escala nacional. O aumento da procura fez com que o cultivo se expandisse para outros estados brasileiros, especialmente Acre, Pará, Mato Grosso e Bahia (SUFRAMA, 2003; SCHIMPL *et al.*, 2013).

As condições climáticas e características do solo encontradas na região do Baixo Sul da Bahia favoreceram para o desenvolvimento satisfatório e rápida disseminação do guaraná nesse Estado (EMBRAPA, 2005). Também conhecida como Território do Baixo Sul (Figura 2), essa região possui vegetação típica de Mata Atlântica e fica localizado ao longo da Costa do Dendê, litoral baiano, abrangendo 14 municípios (PTDS, 2010).



Figura 2: Mapa da região Baixo sul da Bahia. Fonte: Adaptado de PTDS (2010)

¹ A Lei dos Sucos foi regulamentada pelo Decreto 73.267 (06/12/1973) e estabeleceu quantidades de 0,2 - 2,0 g de guaraná a serem adicionadas em cada litro de bebida gaseificada.

Devido às condições edafoclimáticas favoráveis já mencionadas, aliadas a baixa incidência de doenças como a antracnose e técnicas diferenciadas de cultivo por parte dos produtores baianos, a Bahia passou a ocupar a primeira colocação no ranking nacional de produção de guaraná (SUFRAMA, 2003). Na última safra (2016) o estado produziu cerca de 2600 toneladas, correspondendo a 71% da produção no país. Segundo dados do CONAB (2017), a estimativa de produção de guaraná na Bahia no ano de 2017 é de aproximadamente 2340 toneladas. Dados sobre a produção nacional nos últimos anos e a estimativa para 2017 são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2: Produção nacional dos principais estados produtores de guaraná nos últimos anos

UF	Produção (toneladas)					
	2012	2013	2014	2015	2016	2017*
Bahia	2676	2672	2691	2600	2600	2340
Amazonas	1082	740	794	855	855	744
Mato Grosso	242	242	224	188	211	181
Pará	13	12	12	13	13	12
Acre	10	10	3	4	2	2

UF = unidade federal; * Estimativa. Fonte: CONAB (2013); CONAB (2017)

O Território do Baixo Sul responde praticamente sozinho por toda produção de guaraná no estado da Bahia, possuindo uma área plantada superior a 7600 hectares. Entre os principais produtores destacam-se os municípios de Taperoá, Ituberá, Valença, Nilo Peçanha e Camamu. Esse produto possui extrema importância socioeconômica na região, uma vez que a cultura é explorada basicamente pela agricultura familiar e envolve aproximadamente 11.000 famílias distribuídas em pequenas e médias propriedades rurais nos municípios do Baixo Sul que têm o guaraná como uma das principais fontes de renda (EBDA, 2013).

Alguns produtores, juntamente com associações e cooperativas regionais vêm tentando a consolidação do “Guaraná da Mata Atlântica” a partir da obtenção do certificado de denominação de origem (DO) ou indicação de procedência (IP) junto ao INPI, visando agregar valor comercial ao produto. Sendo assim, é importante que haja intensificação de pesquisas acerca da caracterização química do guaraná dessa região, incluindo a avaliação de sua composição mineral.

3.2. Importância dos elementos nutrientes para a saúde humana

A essencialidade dos elementos químicos ao organismo humano é caracterizada quando a baixa exposição a um determinado elemento resulta na redução de uma função fisiológica ou quando o elemento constitui uma estrutura que participa de processos vitais ao organismo (WHO, 1996). No entanto, ao contrário de outros nutrientes, estes elementos não podem ser sintetizados pelo organismo e sua ingestão deve ser administrada a partir de fontes alimentícias (McDOWELL, 2003).

Com base na quantidade requerida pelo organismo de uma pessoa adulta, os elementos nutrientes são classificados em dois principais grupos: macro e microelementos. Os macroelementos (ou elementos majoritários) são os minerais requeridos em quantidades superiores a 100 mg/dia e correspondem a aproximadamente 3,5% da composição do corpo humano. Pertencem a esse grupo os elementos Na, Ca, Mg, K, S e P. Já os microelementos (ou elementos minoritários) são aqueles cuja quantidade necessária diariamente é inferior a 100 mg. Entre os principais microelementos essenciais destacam-se o Fe, Cu, Mn e Zn. Em conjunto com outros minerais, esses elementos correspondem a 0,55% da constituição do nosso corpo (McDOWELL, 2003).

Os elementos nutrientes podem exercer quatro funções específicas no organismo humano: suporte estrutural (esqueleto), fisiológico, catalítico e regulatório. Sabe-se que os macroelementos cálcio e fósforo (em forma de fosfato de cálcio, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) auxiliam na constituição óssea, enquanto que os microelementos ferro e zinco têm papel fundamental no processo respiratório e sistema imunológico, respectivamente (McDOWELL, 2003; FAO/WHO, 2004). A deficiência ou excesso de minerais essenciais pode comprometer seriamente o bom funcionamento do organismo (FENNEMA; TANNENBAUM, 2000). Em função disso, há grande preocupação por parte da Organização Mundial da Saúde (WHO, do inglês *World Health Organization*) em relação à ingestão adequada de elementos nutrientes pela população. Na Tabela 3 estão sumarizadas as quantidades diariamente recomendadas de alguns minerais e suas funções mais relevantes à saúde humana.

Tabela 3: Recomendação de ingestão diária, fontes alimentares conhecidas e principais funções de alguns minerais à saúde humana. Fonte: FAO/WHO (2004); KOHLMEIER (2015).

Elemento	IDR* (mg dia ⁻¹)	Fontes alimentares conhecidas	Principais funções
Ca	1000	Alimentos lácteos, cereais	Sais de cálcio atribuem rigidez ao esqueleto. Íons de cálcio exercem papel fundamental na maioria dos processos metabólicos do organismo.
Mg	220 - 260	Nozes e sementes, legumes, banana	Cofator de enzimas envolvidas na produção de ATP, síntese de DNA e RNA. Mantém o potencial elétrico de tecidos do sistema nervoso e membranas celulares.
K	1300	Frutas, vegetais	Principal agente osmótico no interior das células. Desempenha importante papel nos processos elétricos do corpo, transporte de nutrientes e ativação enzimática.
P	700	Produtos lácteos, alimentos processados	Fosfato constitui o esqueleto. Participa do metabolismo e armazenamento de ATP, além de ser um importante tampão na maioria dos compartimentos do corpo.
S	ni**	Proteínas de origem vegetal e animal	Aminoácidos sulfurados (metionina e cisteína) são necessários para a síntese de proteínas. Sulfatos exercem importante papel na ativação e eliminação de hormônios.
Fe	9,1 - 19	Feijão, carnes em geral	Auxilia no transporte de O ₂ para os tecidos pulmonais através da hemoglobina e também no transporte eletrônico no interior das células.
Mn	1,8 - 2,3	Chá, nozes, grãos, batata doce	Cofator para muitas enzimas associadas ao metabolismo de carboidratos, digestão e metabolismo de proteínas.
Zn	4,9 - 7	Carne vermelha, grãos, leguminosas	Auxilia na síntese e degradação de carboidratos, lípidos, proteínas e ácido nucleico. Contribui para o metabolismo de outros micronutrientes e para a ativação genética.
Cu	0,9	Fígado, marisco, nozes, sementes	Essencial para a respiração celular, regulação neurotransmissora, síntese de colágeno e metabolismo de outros micronutrientes.

*IDR = ingestão diária recomendada; **ni = não há informações

3.3. Estratégias de preparo de amostra para a determinação multielementar em alimentos

Para a determinação de macro e microelementos em amostras alimentícias, técnicas analíticas como espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) e espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES) são amplamente empregadas. Ambas as técnicas normalmente requerem uma etapa prévia de preparo de amostra, visando a disponibilização dos analitos em uma forma apropriada para análise. Métodos baseados em extração assistida por ultrassom, amostragem em suspensão e decomposição tem sido bastante utilizados, sendo este último o mais comum (KEBBEKUS, 2003; KORN *et al.*, 2008; ROCHA, NÓBREGA e KAMOGAWA, 2016).

Os métodos de decomposição consistem basicamente na total destruição da matriz orgânica que constitui a amostra (BARNES; SANTOS JÚNIOR; KRUG, 2014). Eles vêm sendo amplamente empregados na literatura recebendo diferentes denominações, incluindo mineralização (HOENIG *et al.*, 1998), digestão (BIZZI *et al.*, 2014) e decomposição (MARTINS *et al.*, 2015). Para efeitos de padronização textual, o termo decomposição será adotado neste trabalho.

Os métodos de preparo de amostra baseados em decomposição são divididos em duas estratégias: decomposição por via seca e por via úmida. Entre os métodos de decomposição via seca mais simples em análise de alimentos, destaca-se o processo de combustão empregando um forno tipo mufla. Este método consiste na queima da matriz orgânica com o oxigênio do ar após aquecimento da amostra em temperaturas bastante elevadas (450–550°C) e posterior dissolução das cinzas remanescentes em uma solução ácida apropriada. O oxigênio atmosférico atua como um agente oxidante e as cinzas provenientes da combustão consistem basicamente de óxidos metálicos, fosfatos e sulfatos não voláteis. Embora seja um método relativamente simples e eficiente, tendo em vista que a decomposição da matéria orgânica é praticamente completa, a principal desvantagem da combustão é que ela oferece sérios riscos de perdas de analitos por volatilização devido às elevadas temperaturas exigidas. Isso pode comprometer a precisão e a exatidão dos resultados na determinação de macroelementos como P e S, que são não-metais propensos a volatilização (KORN *et al.*, 2008; BARNES; SANTOS JÚNIOR; KRUG, 2014; FLORES *et al.*, 2016).

A decomposição por via úmida é uma estratégia que pode contornar esses problemas devido a não utilização de temperaturas tão drásticas. Neste método, a eliminação da matriz orgânica é promovida pela oxidação da amostra após reação química com ácidos, mistura de

ácidos ou mistura entre ácido e um reagente auxiliar (geralmente H₂O₂) sob aquecimento em um intervalo de tempo apropriado. A solução resultante (contendo os analitos em forma inorgânica livre) é então adequadamente diluída e submetida à análise (KEBBEKUS, 2003; BARNES; SANTOS JÚNIOR; KRUG, 2014; BARIN *et al.*, 2016). Algumas propriedades dos principais reagentes empregados na decomposição por via úmida são apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4: Propriedades dos principais reagentes empregados para decomposição via úmida. Fonte: BARNES; SANTOS JÚNIOR; KRUG (2014).

Reagente	Fórmula química	Concentração (m m ⁻¹)	Concentração (mol L ⁻¹)	TE (°C)
Ácido nítrico	HNO ₃	65	14,4	121
Ácido clorídrico	HCl	37	12	61
Ácido sulfúrico	H ₂ SO ₄	98	18	338
Peróxido de hidrogênio	H ₂ O ₂	30	9,9	106

TE = temperatura de ebulição

O ácido nítrico tem sido preferencialmente utilizado para o preparo de amostras de natureza alimentícia. Seu poder oxidante é capaz de promover a decomposição de alimentos com alto teor de carboidratos. Entretanto, quando se trabalha com amostras ricas em gordura e proteínas, recomenda-se o uso de peróxido de hidrogênio associado com ácido nítrico para auxiliar a decomposição. Dependendo das características da amostra, pode ser necessária a utilização de condições ainda mais agressivas como a mistura entre dois ou mais ácidos (DUGO *et al.*, 2012). Essa interação pode favorecer a formação de compostos intermediários e acelerar consideravelmente o processo de decomposição da matéria orgânica (BARNES; SANTOS JÚNIOR; KRUG, 2014).

A satisfatória oxidação da matéria orgânica é fundamental para eliminar interferências na determinação dos analitos e obter resultados com precisão e exatidão. Quando amostras contendo teores relativamente altos de carbono são introduzidas no equipamento para determinação por ICP OES, por exemplo, há possibilidade de ocorrer o entupimento gradativo da tocha devido ao depósito de material carbonáceo. Adicionalmente, elevadas concentrações de compostos orgânicos podem causar instabilidade no plasma e, conseqüentemente, afetar a transferência de energia do plasma para a amostra. A eficiência de decomposição de uma determinada amostra pode ser qualitativamente avaliada pela observação visual da solução

resultante. Normalmente, quando se obtém um digerido límpido e livre de resíduos, admite-se que a matriz orgânica foi satisfatoriamente decomposta. Entretanto, essa suposição pode não ser confiável, já que existem situações em que muitos compostos orgânicos podem não estar totalmente oxidados mesmo que a amostra digerida apresente aspecto límpido (ROCHA; NÓBREGA; KAMOGAWA, 2016; BARIN *et al.*, 2016).

Do ponto de vista quantitativo, a eficiência de decomposição pode ser avaliada, principalmente, por duas diferentes formas: teor de carbono orgânico dissolvido (DOC, do inglês *dissolved organic carbon*), e teor de carbono residual (RCC, do inglês *residual carbon content*). O DOC se refere à concentração de carbono presente no digerido (em mg L⁻¹) e indica a quantidade de carbono que será introduzida no equipamento. O RCC (expresso em %) é amplamente mais utilizado. Esse parâmetro corresponde à massa de carbono na solução resultante em relação à massa de carbono inicialmente presente na matriz, podendo ser calculado pela Equação 1 (ROCHA; NÓBREGA; KAMOGAWA, 2016; BARIN *et al.*, 2016). Teores de carbono residual inferiores a 12% são considerados adequados para amostras que serão posteriormente analisadas por ICP OES (ARAÚJO, 2002).

$$\text{RCC (\%)} = \frac{C_R}{C_O} \times 100 \quad (1)$$

Onde C_R é a concentração remanescente de carbono no digerido, cuja determinação pode ser realizada por ICP OES, e C_O é a quantidade de carbono originalmente presente na amostra.

Nos casos em que a quantidade de carbono original na amostra é desconhecida, uma estratégia que pode ser utilizada é a estimativa do teor de carbono residual admitindo-se que a amostra contém 100% de carbono. Dessa forma, o RCC é calculado substituindo 'C_O' na Equação 1 por 1000 (mg g⁻¹) e 'C_R' pelo DOC convertido de mg L⁻¹ para mg g⁻¹.

O método de decomposição em frascos abertos empregando-se um bloco metálico de aquecimento e tubos de vidro do tipo borossilicato é bastante convencional. Atualmente, equipamentos mais sofisticados com blocos de grafite revestidos por Teflon[®] e tubos de PTFE também já estão disponíveis comercialmente (BARIN *et al.*, 2016). No entanto, a temperatura máxima de aquecimento dos blocos é restrita à temperatura de ebulição do ácido a pressão atmosférica. Quando se utiliza ácido nítrico, temperaturas de 121°C (correspondente ao seu ponto de ebulição) limitam sua eficiência oxidante e isso pode conduzir a tempos de preparo de amostra relativamente altos ou a digeridos com teores muito elevados de carbono residual.

Em relação ao ácido sulfúrico, o aumento da temperatura do bloco devido ao seu maior ponto de ebulição (338°C) não é compensado. Embora apresente um elevado poder desidratante, o processo de oxidação da amostra com H₂SO₄ ocorre de forma muito lenta (BARIN *et al.*, 2016). Outras desvantagens dos sistemas abertos estão relacionadas ao uso de grandes quantidades de reagentes concentrados, probabilidade de contaminação externa e possíveis perdas de analitos voláteis (OLIVEIRA, 2003; KEBBEKUS, 2003).

Estratégias de decomposição baseadas em sistemas fechados podem minimizar consideravelmente as desvantagens mencionadas anteriormente. Dentro deste contexto, a utilização de radiação micro-ondas para promover o aquecimento da mistura reacional tem sido bastante explorada.

3.3.1. Decomposição assistida por radiação micro-ondas em sistema fechado

As micro-ondas são radiações eletromagnéticas (300-300000 MHz) localizadas entre a região do infravermelho e as ondas de rádio no espectro eletromagnético. Esse tipo de radiação é classificada como não ionizante, ou seja, não possui energia suficiente para quebrar ligações químicas. De acordo com as características dos materiais, as micro-ondas podem ser transmitidas, refletidas ou absorvidas. Sabe-se que os líquidos polares apresentam forte capacidade de absorção, enquanto que materiais metálicos são excelentes refletores. Já alguns fluoropolímeros como o politetrafluoretileno (PTFE) e o perfluoralcóxi (PFA) são exemplos de materiais totalmente transparentes a essas radiações (MELLO; BARIN; GUARNIERI, 2014).

Nas decomposições assistidas por micro-ondas normalmente utiliza-se um forno com cavidade com controle automático de temperatura e potência, equipado com um suporte para até 48 recipientes (frascos de decomposição), dependendo do fabricante. Os fornos comerciais fabricados para uso em laboratório utilizam radiação micro-ondas com frequência de 2450 MHz (comprimento de onda igual a 12,2 cm e energia de 10⁻⁵ eV/fóton). Por questões de segurança, os frascos reacionais, geralmente confeccionados por PTFE ou PFA, são recobertos por materiais de elevada resistência mecânica (Kevlar[®] ou poliéter-éter-cetona, conhecido como PEEK) capazes de conseguir suportar altas pressões e temperaturas sem que haja deformação (NÓBREGA; DONATI, 2011; FECHER; SCHLEMMER; SCHOEBERL, 2014; MORAES *et al.*, 2016).

Dentro dos frascos, o aquecimento é promovido pela interação entre a radiação eletromagnética e a solução ácida ou mistura de ácidos no meio reacional. Dois processos

físicos favorecem esse aquecimento: o fluxo iônico causado pela interação entre o campo elétrico das micro-ondas e os íons da solução da amostra; e a rotação dipolar ou alinhamento de cada molécula dipolar também causado pelo efeito do componente campo elétrico das micro-ondas. A soma destes dois fenômenos contribui para que o aquecimento ocorra de maneira uniforme e localizada, permitindo análises com resultados mais precisos (OJEDA; ROJAS, 2013; MELLO; BARIN; GUARNIERI, 2014).

O aumento da pressão devido ao fechamento dos frascos faz com que a temperatura também aumente, possibilitando a utilização de temperaturas superiores ao ponto de ebulição do ácido selecionado. Isso eleva seu poder oxidante e implica em uma eficiente decomposição em intervalos de tempo bem menores do que os sistemas abertos. Além disso, o ambiente fechado também minimiza os riscos de contaminação por fatores externos e perdas de analitos por volatilização (MULLER *et al.*, 2014).

Outro grande atrativo para a utilização deste método é a possibilidade de adição de água como reagente auxiliar. As moléculas de água são fortemente afetadas pelo campo eletromagnético produzido pelas micro-ondas, facilitando o aquecimento no interior dos frascos (MORAES *et al.*, 2016). Isso permite que soluções de ácidos diluídos também sejam empregadas com resultados satisfatórios.

3.3.1.1. Decomposição assistida por radiação micro-ondas usando ácidos diluídos

O uso de ácidos diluídos em métodos de preparo de amostra tem sido bastante explorado nos últimos anos. A adição de água nas decomposições usando micro-ondas pode trazer vantagens como redução dos volumes de ácido concentrado, consumo reduzido de energia, levando-se em consideração que apenas a solução da amostra absorve radiação e, conseqüentemente, não se gasta energia para aquecimento dos frascos, além da geração de resíduos mais “limpos”, seguindo os preceitos da Química Verde (BENDICHO *et al.*, 2012). Adicionalmente, é de se esperar que as soluções da amostra após decomposição apresentem baixa acidez residual. Isso é desejável principalmente quando são empregadas técnicas espectroanalíticas com sistema de introdução de amostra baseado em nebulização pneumática, devido à minimização de interferências de transporte (BIZZI; NÓBREGA; BARIN, 2014).

Do ponto de vista químico, a eficiência de decomposição com ácido nítrico diluído pode ser justificada por uma série de reações que ocorrem no interior dos frascos e que levam à regeneração *in situ* do ácido nítrico (Figura 3). Sabe-se que após reação com ácido nítrico

aquecido, a amostra (matéria orgânica) é oxidada e produz $\text{CO}_{2(g)}$, $\text{NO}_{(g)}$ e $\text{H}_2\text{O}_{(l)}$. Para que o ciclo reacional mencionado ocorra de forma eficaz, é necessário que haja quantidade suficiente de oxigênio dentro do frasco para promover a oxidação do $\text{NO}_{(g)}$ produzido à $\text{NO}_{2(g)}$. Em seguida, devido ao gradiente de temperatura formado entre a fase gasosa e a fase líquida no frasco (já que os líquidos absorvem mais facilmente radiação micro-ondas), supõe-se que o $\text{NO}_{2(g)}$ é reabsorvido na solução aquosa, reagindo com moléculas de água e produzindo $\text{HNO}_{3(aq)}$. Deste modo, as reações continuam efetivas enquanto houver matéria orgânica e oxigênio na fase gasosa dentro do frasco (BIZZI; NÓBREGA; BARIN, 2014; MORAES *et al.*, 2016).

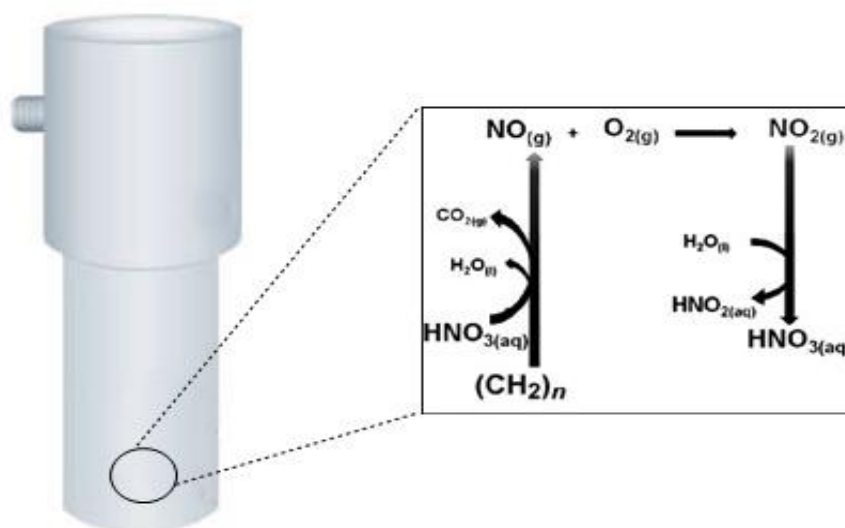


Figura 3: Representação ilustrativa do ciclo de regeneração do ácido nítrico. Fonte: Adaptado de BIZZI; NÓBREGA; BARIN (2014).

A hipótese de regeneração do HNO_3 foi demonstrada por Bizzi *et al.* (2011a) a partir da avaliação da decomposição de amostras de leite em pó usando HNO_3 diluído na ausência e na presença de oxigênio como reagente auxiliar. Empregando solução de ácido nítrico a uma concentração de $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ (6,0 mL) sob pressão atmosférica, verificou-se um teor de carbono residual superior a 60%. Por outro lado, ao se utilizar frascos pressurizados com 7,5 bar de $\text{O}_{2(g)}$, o teor de carbono residual determinado reduziu-se a um valor próximo a 10%. A exatidão do procedimento foi avaliada através da determinação de Ca, Cd, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, Pb e Zn por ICP OES em material de referência certificado de leite em pó, onde não foram observadas diferenças significativas entre o valor encontrado e o valor certificado.

Em outro trabalho Bizzi *et al.* (2011b) avaliaram a influência da fase gasosa dentro do frasco para a decomposição de leite em pó utilizando ácido nítrico $2,0 \text{ mol L}^{-1}$. Em um

primeiro experimento, os frascos foram pressurizados com oxigênio e, em outro experimento, foi pressurizado com argônio. Também foram utilizados frascos sem pressurização. Sob pressão atmosférica, foi observado um teor de carbono residual de 63%. Uma baixa eficiência de decomposição também foi verificada com a utilização de frascos pressurizados com 20 bar de Ar_(g), cujo teor de carbono residual foi superior a 51%. Em contrapartida, quando houve pressurização dos frascos com 7,5 bar de O_{2(g)} a decomposição foi considerada satisfatória (teor de carbono residual < 10%). Outro estudo também foi realizado com amostras de orégano (BIZZI *et al.*, 2011c), onde encontrou-se resultados similares. Deste modo, os autores concluíram que o oxigênio tem papel essencial no processo de decomposição empregando ácido diluído. Sua ausência na fase gasosa dentro do tubo impossibilita o ciclo de regeneração do ácido nítrico.

Apesar de seus efeitos positivos, o uso de oxigênio como reagente auxiliar não é tão difundido. O principal motivo é que a disponibilidade de frascos especiais com sistema de pressurização prévia ainda é muito baixa no mercado. Neste sentido, o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) apresenta-se como uma alternativa para melhorar a eficiência de decomposição com soluções de ácido diluído em sistemas sem prévia pressurização. Mesmo sendo reconhecido como um poderoso agente oxidante ao ser associado com ácido nítrico, o peróxido de hidrogênio pode sofrer uma reação de decomposição e produzir oxigênio molecular e água (BIZZI; NÓBREGA; BARIN, 2014). Esta reação está representada pela Equação 2.



Em consequência dessa reação, sugere-se que o peróxido de hidrogênio seja uma fonte alternativa de O_{2(g)}, podendo ser empregado em conjunto com ácido nítrico diluído e conduzir a decomposições satisfatórias.

A eficiência do H₂O₂ como reagente auxiliar foi claramente demonstrada em um estudo realizado por Bizzi (2012). Neste trabalho, avaliou-se a decomposição de amostras de leite em pó e fígado bovino empregando ácido nítrico diluído (2,0 mol L⁻¹) e diferentes volumes de peróxido tanto em frascos comuns (sem pressurização prévia) como em frascos pressurizados. O autor verificou que a eficiência de decomposição foi praticamente a mesma ao se utilizar 2,0 ou 3,0 mL de peróxido em frascos pressurizados com O_{2(g)} (7,5 e 5 bar para leite em pó e fígado bovino, respectivamente) e também em frascos sem adição de gás oxigênio. Para ambas as amostras, a decomposição foi considerada satisfatória, uma vez que

os teores de carbono residual foram sempre inferiores a 12%. De acordo com o autor, estes resultados evidenciaram a ação do H_2O_2 como possível fonte de $\text{O}_{2(\text{g})}$ para promover a regeneração do ácido nítrico dentro do frasco reacional.

Soluções de ácido nítrico diluído associado com H_2O_2 têm sido satisfatoriamente empregadas para a decomposição de amostras de alimentos diversos, visando a determinação multielementar por técnicas espectrométricas. Uma estratégia que vem sendo utilizada por muitos pesquisadores é o estabelecimento prévio de um criterioso programa de aquecimento e posterior avaliação da eficiência de decomposição variando-se apenas a concentração de ácido nítrico.

Bressy *et al.* (2013) desenvolveram um método de decomposição assistida por radiação micro-ondas para o preparo de amostra de tomate, onde foram estudadas três diferentes concentrações de HNO_3 (4,0; 7,1 e 14,0 mol L^{-1}). Para avaliar a eficiência de decomposição, o teor de carbono residual e a recuperação dos analitos em material de referencia certificado foram adotados como respostas. Os melhores resultados foram obtidos a partir da utilização de 7,0 mL de HNO_3 7,1 mol L^{-1} e 1,0 mL de H_2O_2 (RCC < 12%). A exatidão foi avaliada por análise do material de referência certificado de folhas de tomate (NIST 1573a). O método foi aplicado para a determinação de 15 elementos em amostras de tomates com diferentes estágios de maturação e distintas formas de cultivo empregando ICP OES e ICP-MS.

Para a determinação de microelementos em amostras de soja e derivados, Barbosa *et al.* (2015) propuseram um método de decomposição assistida por radiação micro-ondas usando ácido diluído. Neste trabalho, as seguintes concentrações de HNO_3 foram estudadas: 2,1; 4,2; 7,3 e 14,5 mol L^{-1} . Baseando-se na concentração dos analitos em uma amostra teste e no teor de carbono residual, os autores verificaram que a utilização de 7,0 mL de HNO_3 2,1 mol L^{-1} e 1,0 mL de H_2O_2 promoveu uma decomposição considerada satisfatória (RCC < 18%). A exatidão do método foi avaliada através da análise do material de referência certificado de farinha de arroz (*Rice Flour*, NIST 1568b). O método proposto foi aplicado para a determinação de microelementos essenciais e não essenciais em amostras de diferentes produtos derivados da soja por ICP OES e ICP-MS.

Outros trabalhos envolvendo a aplicação do método de decomposição assistida por micro-ondas em amostras de alimentos são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: Recentes aplicações de procedimentos de decomposição assistida por radiação micro-ondas usando ácido nítrico diluído para a determinação multielementar em amostras de alimentos e derivados

Amostra	Concentrações de HNO ₃ avaliadas (mol L ⁻¹)	Concentração de HNO ₃ utilizada (mol L ⁻¹)	Volume de H ₂ O ₂ (mL)	RCC (%)	Analitos	Técnica	Referência
Nozes e sementes	-	6,0	1,0	5 – 13	Al, B, Ba, Ca, Cl, Cu, Fe, K, Mg, Mn, P, S, Si, Sr e Zn	ICP OES	Naozuka <i>et al</i> (2011)
Peixe	-	3,8	-	-	V, Mn, Fe, Co, Cu, Zn, As, Se, Cd e Pb	ICP-MS	Low, Zain e Abas (2011)
Manjerição em pó	-	7,2	2,0	-	33 elementos	ICP OES	Ghanjaoui <i>et al</i> (2011)
Amendoim	-	7,2	2,0	-	Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P e Zn	ICP OES e ICP-MS	Phan-Tien <i>et al</i> (2012)
Achocolatado em pó	-	5,4	1,5	-	Al, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Ni, P, Pb, V e Zn	ICP OES	Peixoto, Oliveira e Cadore (2012)
Cereja	3,5; 7,0	7,0	-	-	Al, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Sr e Zn	ICP OES	Cindric <i>et al</i> (2012a)
Maçã	-	7,2	-	-	Ag, Al, Ca, Co, Pb, Ni, Zn, Ba, K, Na, Mn, Mg, Al, Cd, Cu, Fe e Cr	ICP OES	Cindric <i>et al</i> (2012b)
Patê	14,0;7,0; 3,5	3,5	1,0	-	Fe and Zn	FAAS	Souza <i>et al</i> (2013)
Alimentos pet	2,0; 3,5; 5,0	2,0	2,0	-	Ca, P, S, Zn, Ba, K, Sr, Mn, Mg, Al, Cd, Cu, Fe and Cr	ICP OES	Costa <i>et al</i> (2013)
Produtos lácteos em pó	-	3,0	-	-	Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na e Zn	ICP OES	Da Silva <i>et al</i> (2013)

(-) significa que o respectivo fator não foi estudado; RCC = teor de carbono residual

Tabela 5. Continuação

Amostra	Concentrações de HNO ₃ avaliadas (mol L ⁻¹)	Concentração de HNO ₃ utilizada (mol L ⁻¹)	Volume de H ₂ O ₂ (mL)	RCC (%)	Analitos	Técnica	Referência
Arroz	-	9,6	2,0	-	Se, As, Ba, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, Pb, Sr e Zn	DRC-ICP-MS	Wei <i>et al</i> (2014)
Vegetais	8,0; 9,6; 11,4	9,6	-	-	P, K, Na, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn e Cu	HR-CS-AAS	Santos <i>et al</i> (2014)
Chocolate	3,0; 6,0; 9,0; 12,0	6,0	1,5	10 - 17	Cd and Pb	GFAAS	Villa <i>et al</i> (2014)
Cereais	-	8,2	1,0		Cu, Mn, Fe, Zn, Mg, Ca, P, Na e K	ICP OES	Nascimento <i>et al</i> (2014)
Chás, grãos de trigo e farinha de trigo	4,6; 6,9; 9,1	6,9	2,0	-	Cu, Al, Cd, Mo, Pb, V, Sr, Ni, Cr, Co, Zn, Mn and Fe	ICP OES	Martins <i>et al</i> (2015)
Plantas medicinais	2,0; 4,0; 7,0; 10,0; 14,4	4,0	-	<10%	As, Cd, Pb e Hg	ICP-MS e FI-CVG-ICP-MS	Muller <i>et al</i> (2015)
Pólen	14,0;7,0; 3,5	3,5	3,0	-	Fe, Mn e Zn	FAAS	Siqueira <i>et al</i> (2016)
Chás	-	7,0	4,0	-	Ba, Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, P , Pb, Zn e Se	ICP OES e GFAAS	Pereira Jr e Dantas (2016)

(-) significa que o respectivo fator não foi estudado; RCC = teor de carbono residual

Como já mencionado, a eficiência do método de decomposição em forno micro-ondas depende basicamente de fatores como tempo, temperatura ou até mesmo da potência aplicada ao forno. Quando se propõe a utilização de ácido diluído em sistemas comuns (sem prévia pressurização), a concentração do ácido selecionado e o volume de peróxido de hidrogênio (reagente auxiliar) também podem se tornar variáveis significativas. Sendo assim, esses fatores são muitas vezes otimizados, a fim de se obter decomposições satisfatórias (ZANARIAH, NGAH e YAHYA, 2012; SANTOS *et al.*, 2013; LEME *et al.*, 2014; TARANTINO *et al.*, 2016).

A possibilidade de utilizar programas de aquecimento variando-se apropriadamente os parâmetros do forno micro-ondas (tempo, temperatura e potência) também se configura como uma boa alternativa. Optando-se em utilizar programas de aquecimento fixos, apenas a concentração do ácido e o volume de peróxido de hidrogênio são as variáveis que necessitam ser otimizadas. Deste modo, técnicas de planejamento experimental podem ser satisfatoriamente empregadas.

3.4. Técnicas de otimização multivariada para o preparo de amostras

As técnicas de planejamento experimental são ferramentas estatísticas utilizadas para planejar e otimizar experimentos de forma multivariada, onde os fatores que influenciam na resposta experimental são variados simultaneamente. Em relação às técnicas tradicionais de otimização, onde apenas um fator é variado enquanto os outros são mantidos constantes, a otimização multivariada apresenta vantagens como redução da quantidade de experimentos e do consumo de reagentes, economia de tempo e possibilidade de verificar possíveis efeitos de interação entre as variáveis estudadas (LEARDI, 2009; FERREIRA, 2015).

Quando se deseja otimizar um método analítico de forma multivariada, a primeira etapa a ser desenvolvida é a triagem de fatores, ou seja, identificar aqueles fatores que sejam estatisticamente significativos à resposta experimental (PEREIRA FILHO, 2015). Para isso, normalmente é empregado um planejamento fatorial completo de dois níveis ou eventualmente um planejamento fatorial fracionário, caso a quantidade de variáveis seja muito elevada. Após a identificação das variáveis significativas, estas são otimizadas através de metodologia de superfície de resposta (FERREIRA, 2015).

A metodologia de superfície de resposta (RSM, do inglês *response surface methodology*) é uma ferramenta estatística baseada no ajuste de um modelo matemático capaz de descrever adequadamente a variabilidade dos dados experimentais obtidos. Sendo assim, funções polinomiais lineares ou quadráticas podem ser geradas para explorar o sistema, buscando-se realizar previsões de condição ótima para a resposta dentro da região experimental estudada (CALADO; MONTGOMERY, 2003; BEZERRA *et al.*, 2008). As metodologias de superfície de resposta mais empregadas para otimização de procedimentos analíticos utilizam o planejamento Box-Behnken, matriz Doehlert, planejamento composto central e planejamento de misturas (FERREIRA, 2015; NOVAES *et al.*, 2016).

3.4.1. Planejamento de misturas

Planejamento de misturas é um tipo especial de metodologia de superfície de resposta em que os fatores são os componentes (ou ingredientes) de uma mistura. Esse planejamento é empregado quando se deseja estabelecer a proporção entre os componentes de uma mistura que forneça a melhor resposta experimental. Neste caso, as proporções dos componentes são mutuamente dependentes entre si e devem sempre satisfazer à Equação 3 (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001; MYERS; MONTGOMERY; ANDERSON-COOK, 2009;).

$$\sum_{i=1}^q x_i = 100\% = 1 \quad (3)$$

Onde q é o número de componentes e x_i representa a proporção do i -ésimo componente.

De acordo com a equação 3, observa-se que para estabelecer a composição de uma determinada mistura, basta fixar as proporções de ' $q - 1$ ' componentes. A proporção do último componente será sempre igual ao valor que resta para totalizar 100% da mistura (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001).

Os modelos matemáticos mais utilizados para descrever o comportamento da resposta quando se utiliza um planejamento de misturas são: linear, quadrático e cúbico

especial. Os modelos são mostrados nas Equações 4 a 6, respectivamente (MONTGOMERY, 2001; MYERS; MONTGOMERY; ANDERSON-COOK, 2009).

$$y = \sum_{i=1}^q \beta_i x_i \quad (4)$$

$$y = \sum_{i=1}^q \beta_i x_i + \sum_{i<j}^q \beta_{ij} x_i x_j \quad (5)$$

$$y = \sum_{i=1}^q \beta_i x_i + \sum_{i<j}^q \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{i<j<k}^q \beta_{ijk} x_i x_j x_k \quad (6)$$

Onde y é a resposta prevista pelo modelo, β_i é o coeficiente linear, β_{ij} é o coeficiente de interação binária (termo quadrático) e β_{ijk} é o coeficiente de interação ternária (termo cúbico).

Planejamentos de misturas com três componentes são os mais utilizados. Devido à restrição imposta pela Equação 3 para $q = 3$ ($x_1 + x_2 + x_3 = 1$), o espaço de mistura é representado geometricamente por um triângulo equilátero, onde os vértices correspondem aos componentes puros e os lados correspondem à interação binária entre os componentes (CORNELL, 2002). Para sistemas ternários ($q = 3$), dois tipos de planejamento podem ser adotados: o simplex em rede (do inglês *simplex-lattice*) e o simplex centróide (CALADO; MONTGOMERY, 2003).

O planejamento simplex centróide é amplamente mais empregado. Ele difere do planejamento simplex em rede devido à adição de um ponto central correspondendo à mistura ternária entre os componentes, com $x_1 = x_2 = x_3 = 1/3$ (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001). Pontos interiores também podem ser adicionados ao redor do ponto central do planejamento para verificar os efeitos sobre a resposta quando um dos componentes está em maior proporção do que os demais. Estes pontos devem ser posicionados a uma distância máxima do ponto central definida pela expressão ‘ $q-1/q$ ’. Utilizando-se três componentes, isso significa que devem ser realizados três experimentos correspondentes à proporção de $2/3$ de um componente e $1/6$ dos outros dois (MONTGOMERY, 2001; CORNELL, 2002;). A Figura 4 mostra a representação gráfica do planejamento simplex centróide com a adição de pontos interiores.

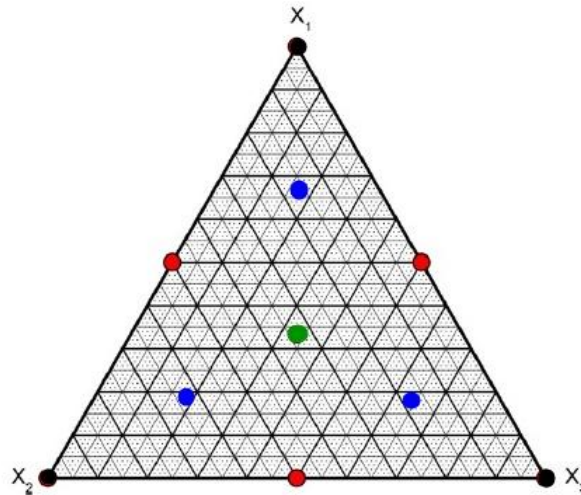


Figura 4: Representação gráfica de um planejamento simplex centrado. Os pontos pretos localizados nos vértices correspondem aos componentes puros. Os pontos vermelhos nas laterais correspondem às interações binárias. O ponto verde no centro do triângulo corresponde ao ponto central e os pontos azuis se referem aos pontos interiores. Fonte: Adaptado de LEARDI (2009).

3.4.1.1. Planejamento de misturas com pseudocomponentes

Existem algumas situações em que certas combinações entre os componentes de uma mistura não podem proporcionar resultados desejáveis. Deste modo, alguma limitação inferior ou superior deve ser imposta nas proporções dos componentes selecionados para compor a mistura. Para estes casos pode ser utilizada uma estratégia alternativa de planejamento de misturas, introduzindo-se o conceito de pseudocomponentes (MONTGOMERY, 2003; NOVAES *et al.*, 2016; CALADO).

O planejamento de misturas baseado em pseudocomponentes consiste na utilização de combinações ternárias entre os componentes em cada vértice do triângulo ao invés dos respectivos componentes puros. Para uma mistura com q componentes, em que apenas limitações inferiores são impostas, sua composição em termos de pseudocomponentes é dada pela Equação 7 (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001).

$$x_i = \frac{c_i - a_i}{1 - \sum_{i=1}^q a_i} \quad (7)$$

Onde x_i é a composição do pseudocomponente, c_i é a proporção real do componente i na mistura e a_i representa o limite inferior estabelecido.

Com a introdução de pseudocomponentes, um novo triângulo equilátero é definido para representar a região experimental estudada (Figura 5). É possível observar que os pontos localizados nos vértices do novo triângulo passam a apresentar composições “não reais” para os componentes X_1 , X_2 e X_3 . Para determinação da melhor condição experimental, recomenda-se a análise da superfície de resposta gerada pelos modelos ajustados aos pseudocomponentes, com posterior conversão às proporções originais de cada componente na mistura (MYERS; MONTGOMERY; ANDERSON-COOK, 2009).

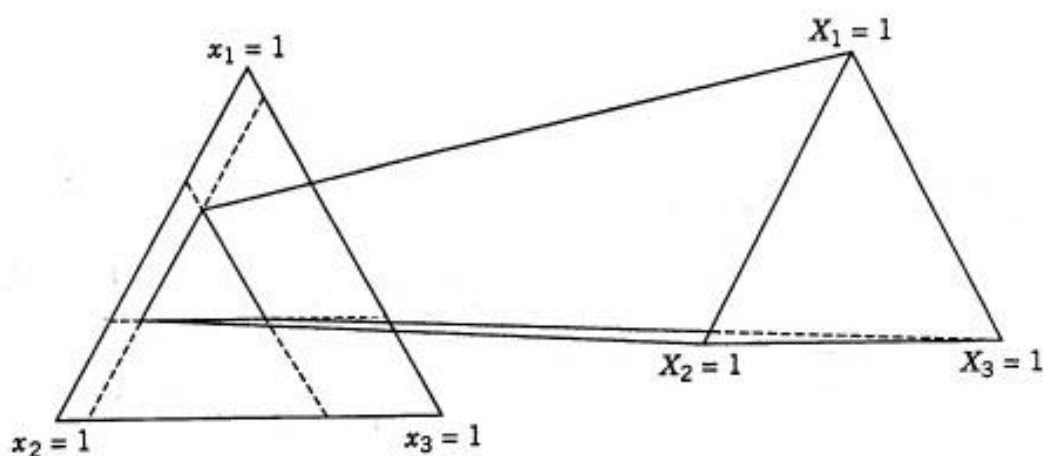


Figura 5: Representação geográfica de um planejamento simplex centroide com pseudocomponentes. O triângulo à direita corresponde à nova região experimental gerada após estabelecimento de certas restrições aos componentes do triângulo mostrado à esquerda. Fonte: Adaptado de MYERS; MONTGOMERY; ANDERSON-COOK (2009).

Planejamentos de misturas com pseudocomponentes são bastante utilizados para a otimização de procedimentos analíticos. Bezerra et. al (2010) empregaram esse tipo de planejamento para otimizar um procedimento de amostragem em suspensão, visando a determinação de Zn e Mn em folhas de chá por FAAS. Em outro trabalho, Bezerra *et al.* (2015) utilizaram planejamento de misturas com restrições em um procedimento de decomposição assistida por radiação UV com H_2O_2 para a determinação de Fe, Zn, Mn, Ni, e Co em amostras de resíduos líquidos coletados em aterro sanitário. Recentemente, esse planejamento também foi aplicado em método de extração em ponto nuvem (SANTOS *et al.*, 2016) e microextração líquido-líquido dispersiva (MEIRA e DIAS, 2017).

Entretanto, a aplicação do planejamento de misturas em métodos de decomposição de amostras assistida por radiação micro-ondas ainda não é muito explorada. Nano *et al.* (2009) empregaram um planejamento de misturas simplex centroide com HNO₃, HCl e H₂O₂ para a decomposição de amostras de tecido de ostra em bloco digestor. Cada vértice do triângulo foi constituído pelos seguintes pseudocomponentes: (1) 10% de HCl, 20% de HNO₃ e 70% de H₂O₂; (2) 70% de HCl, 10% de H₂O₂ e 20% de HNO₃; (3) 10% de HCl, 10% de H₂O₂ e 80% de HNO₃. As maiores recuperações dos analitos em CRM foram obtidas para o pseudocomponente constituído por 19%, 18% e 63% de HCl, HNO₃ e H₂O₂, respectivamente. Em termos de volume (mL), essa condição correspondeu a 1,0 mL de HCl, 1,5 mL de HNO₃ e 2,5 mL de H₂O₂. A exatidão do método foi avaliada através de análise de material de referência certificado de tecido de ostra (*Oyster tissue*, NIST 1566b), onde não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os valores encontrados e certificados (exceto Al, Co e V). O método foi aplicado para a determinação de Al, As, Ba, Ca, Cd, Co, Cu, Fe, Mg, Mn, V e Zn em amostras de tecidos de ostra por ICP OES.

Em um trabalho recente, Castro *et al.* (2017) utilizaram planejamento de misturas com restrições para a otimização de um procedimento de decomposição de amostras de folhas de vegetais assistida por radiação micro-ondas. A minimização do teor de carbono residual (RCC) e da acidez residual foram adotadas como respostas para avaliar a eficiência de decomposição. A melhor condição experimental para a digestão de 100 mg de amostra foi a utilização de uma mistura com HNO₃ 8,0 mol L⁻¹ constituída por 0,63 mL de H₂O, 1,12 mL de HNO₃ e 0,25 mL de H₂O₂. Esta condição conduziu a satisfatórios valores de RCC e acidez residual. A exatidão do procedimento proposto foi avaliada por análise dos materiais de referência certificados de folhas de maçã (*Apple Leaves*, NIST 1515) e folhas de espinafre (*Spinach Leaves*, NIST 1570a). Os valores encontrados e certificados não apresentaram diferença estatisticamente significativa a um nível de 95% de confiança. O método proposto foi aplicado para a determinação de Ca, Mg, Na, K, Cu, Fe, Mn, Zn e Sr em amostras de folhas de vegetais utilizadas para o preparo de chás, empregando ICP OES.

Esses resultados demonstraram que o planejamento de misturas com pseudocomponentes pode ser uma alternativa eficaz para a decomposição de amostras tanto em sistema convencional utilizando bloco digestor como em sistema fechado com radiação micro-ondas empregando ácido nítrico diluído.

4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1. Equipamentos e materiais utilizados

Para determinação dos analitos e do carbono residual foi utilizado um espectrômetro de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente, modelo 710 ES Varian (Mulgrave, Austrália), equipado com nebulizador concêntrico OneNeb[®] Agilent (Santa Clara, EUA), câmara de nebulização ciclônica *single pass* Varian (Mulgrave, Austrália), tocha Varian (Mulgrave, Austrália) com configuração axial e detector de estado sólido com arranjo CCD (do inglês *charge coupled device*). As condições operacionais utilizadas no equipamento e as linhas analíticas de emissão selecionadas para cada elemento são mostradas na Tabela 6. Argônio 99,998% White Martins/Praxair (Bahia, Brasil) foi utilizado para geração do plasma, nebulização da amostra e gás auxiliar.

Tabela 6: Parâmetros instrumentais do ICP OES e linhas de emissão selecionadas para análise

Parâmetro instrumental	Condição operacional
Potência de rádiofrequência (kW)	1,3
Vazão do gás do plasma (L min ⁻¹)	15,0
Vazão do gás auxiliar (L min ⁻¹)	1,5
Pressão de nebulização (kPa)	150
Tempo de estabilização (s)	15
Tempo de leitura das replicatas (s)	5
Número de replicatas	3
Linhas de emissão (nm)	Ca (II) 373,690; Mg (II) 279,800; Mg (II) 280,270; Mg (I) 285,213; K (I) 766,491; P (I) 213, 618, S (I) 181,972; C (I) 193,091, Cu (I) 327,395; Fe (II) 238,204; Mn (II) 257, 610; Zn (I) 213, 857.

(I) linha de emissão atômica; (II) linha de emissão iônica

Para o preparo das amostras foi utilizado um forno micro-ondas, sistema multimodo, modelo Mars Xpress CEM (Carolina do Norte, EUA) equipado com sensor infravermelho de temperatura e rotor com 16 tubos confeccionados por PFA.

Balança analítica modelo AUW 220-D Shimadzu (Quioto, Japão) foi utilizada para a pesagem das amostras.

Estufa com circulação e renovação de ar modelo CR/100 Sterilifer (São Paulo, Brasil) com controle digital de temperatura foi utilizada para a redução de umidade das sementes de guaraná.

Banho ultrassom modelo USC-2500 Unique (São Paulo, Brasil) com potência ultrassônica de 155 watts RMS foi utilizado para sonicação das amostras na etapa de determinação de carbono residual.

Para a trituração das amostras de sementes de guaraná foi utilizado um moinho de bolas modelo TE-350 Tecnal (São Paulo, Brasil).

4.2. Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas com reagentes de grau analítico e água ultrapura com resistividade 18,2 M Ω cm obtida a partir de um sistema de purificação Milli-Q Milipore (Bedford, EUA).

Para o procedimento de decomposição assistida por radiação micro-ondas foi utilizado ácido nítrico 65% m/m EMSURE[®] Merck (Darmstadt, Alemanha), peróxido de hidrogênio 30% EMSURE[®] Merck (Darmstadt, Alemanha) e água ultrapura.

Padrões aquosos monoelementares 1000 mg L⁻¹ Merck (Darmstadt, Alemanha) foram utilizados para preparar a curva analítica de calibração. Solução padrão multielementar High-purity Standards (Carolina do Sul, EUA) foi utilizada para a calibração do sistema ótico do ICP OES.

Ácido cítrico monohidratado P.A. Vetec (Rio de Janeiro, Brasil) foi utilizado no preparo da solução padrão de C para determinação de carbono residual.

Hidróxido de sódio P.A. Biotec (Paraná, Brasil) e biftalato de potássio Biotec (Paraná, Brasil) foram utilizados no preparo e padronização de solução para a determinação da acidez residual das amostras após decomposição.

Todas as vidrarias utilizadas foram previamente lavadas com água deionizada obtida a partir de um sistema de osmose reversa Vexer (Paraná, Brasil) e

descontaminadas em banho de HNO₃ 10% (v/v) por 24 horas. Após o período de descontaminação, foram retiradas do banho e enxaguadas com água ultrapura. Os frascos de PFA foram descontaminados após cada rodada de decomposição, adicionando-se 10,0 mL de HNO₃ 10% (v/v) e submetendo-os a um programa de aquecimento no forno micro-ondas, constituído por uma etapa de 10 minutos a uma temperatura de 180 °C e potencia de 1600 W. Ao término do programa, os frascos foram enxaguados com água ultrapura.

4.3. Amostragem

As amostras foram coletadas diretamente em propriedades rurais produtoras de guaraná nos municípios de Nilo Peçanha/BA, Camamu/BA, Taperoá/BA e também em cooperativa de fomento agrícola, no município de Valença/BA, no período de 03 a 05 de março de 2016. Foram adquiridas 72 amostras de guaraná em forma de sementes, previamente colhidas e submetidas a processo de secagem pelos próprios produtores (Tabela 7). Todas as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos limpos e encaminhadas ao Laboratório de Pesquisa em Química Analítica (LPQA).

Tabela 7: Relação das amostras de guaraná coletadas para análise

Origem	Processamento pós-colheita	Quantidade	Código
Taperoá - BA	Secagem em aguidá rotativo ^a	1	T
	Secagem em estufa natural	8	
	Secagem ao sol	15	
Camamu - BA	Secagem em aguidá rotativo	3	C
	Secagem em estufa natural	1	
	Secagem ao sol	22	
Nilo Peçanha - BA	Secagem em aguidá rotativo	2	NP
	Secagem ao sol	7	
Valença - BA	Secagem em aguidá rotativo	9	V
	Secagem em estufa natural	3	

^aequipamento alternativo desenvolvido pelos produtores do Baixo Sul da Bahia para a secagem de sementes de guaraná.

4.4. Pré-tratamento das amostras

As amostras de sementes de guaraná foram inicialmente submetidas a um processo de secagem em estufa com circulação de ar, em temperatura de 50 °C durante 16 horas para redução do teor de umidade. Posteriormente, foram trituradas em um moinho de bolas por aproximadamente 3 minutos, transferidas para recipientes plásticos previamente descontaminados e armazenadas em dessecadores.

4.5. Preparo das amostras

O procedimento de preparo de amostra foi baseado em decomposição assistida por radiação micro-ondas empregando HNO_3 diluído auxiliado por H_2O_2 . Uma massa de aproximadamente 250 mg de amostra foi pesada diretamente no frasco de PFA com o auxílio de uma balança analítica. Ao tubo foi adicionado 10,0 mL de uma mistura constituída por 1,0 mL de HNO_3 (9,0 mol L^{-1}), 3,0 mL de H_2O_2 (30%) e 6,0 mL de H_2O (ultrapura), resultando em uma concentração final de HNO_3 igual a 0,9 mol L^{-1} . O frasco foi fechado e submetido a um programa de aquecimento em forno micro-ondas (Tabela 8). O tempo e a temperatura de cada etapa foram selecionados com base em programa de aquecimento satisfatoriamente empregado na literatura (CASTRO *et al.*, 2009), com algumas modificações. Após o procedimento de decomposição, a amostra foi transferida quantitativamente para tubo de polipropileno com tampa rosqueável (50 mL) e o volume foi completado com água ultrapura até 25 mL (digerido final).

Como procedimento referência para auxiliar a avaliação da eficiência de decomposição, foi realizado um experimento em triplicata adicionando-se ao frasco 5,0 mL de HNO_3 (65% m/m) e 2,0 mL de H_2O_2 (30%) empregando o mesmo programa de aquecimento estabelecido para a decomposição com ácido diluído.

Tabela 8: Programa de aquecimento do forno micro-ondas aplicado para a decomposição das amostras

Etapa	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Potência (W)
1	2	120	1600
2	8	120	1600
3	5	180	1600
4	15	180	1600
<i>Cool Down</i> ^a	15	-	-

^a etapa de resfriamento dos frascos recomendada pela fabricante.

4.6. Otimização multivariada do procedimento de preparo de amostra

Para a otimização do procedimento foi empregado um planejamento de misturas simplex centroide com os reagentes HNO₃, H₂O₂ e H₂O, utilizando uma amostra selecionada aleatoriamente. Nesse planejamento adotou-se a ideia de pseudocomponentes, onde foi utilizada uma mistura ternária em cada vértice do triângulo. Tal estratégia foi utilizada levando-se em consideração que o componente puro H₂O não é capaz de promover a decomposição da amostra. Além disso, já foi demonstrado que a eficiência de decomposição em forno micro-ondas pode ser maximizada empregando-se estes três componentes de forma conjunta (BIZZI *et al.*, 2011a).

A composição de cada mistura foi criteriosamente estabelecida a partir de duas condições básicas: (i) a concentração máxima de ácido nítrico deveria ser 7,2 mol L⁻¹ e (ii) o volume máximo de peróxido de hidrogênio não poderia exceder 3,0 mL. Na Tabela 9 são apresentados os detalhes de cada pseudocomponente utilizado no planejamento.

Tabela 9: Composição e concentração resultante de HNO₃ dos pseudocomponentes utilizados no planejamento

Pseudocomponente	Volume (mL)			Concentração resultante de HNO ₃ (mol L ⁻¹)
	HNO ₃ (9,0 mol L ⁻¹)	H ₂ O ₂ (30%)	H ₂ O	
χHNO ₃	8,0	1,0	1,0	7,2
χH ₂ O ₂	1,0	3,0	6,0	0,9
χH ₂ O	1,0	1,0	8,0	0,9

χ = pseudocomponente

Um total de 12 experimentos foi realizado, conforme ilustra a Figura 6. Para estimativa do erro experimental, utilizou-se uma triplicata do ponto central. A matriz do planejamento de misturas com os pseudocomponentes e as proporções reais dos componentes é apresentada na Tabela 10. Os volumes de HNO₃, H₂O₂ e H₂O em cada experimento foram estimados observando-se o volume adicionado e as proporções requeridas em cada interação entre os pseudocomponentes. Para o cálculo da concentração de HNO₃ resultante em cada ponto experimental, aplicou-se a Equação 8.

$$M_{\text{HNO}_3} = \frac{M_i \times V_{\text{ad}}}{V_f} \quad (8)$$

Onde M_{HNO_3} é a concentração de ácido nítrico resultante na mistura, M_i é a concentração inicial de HNO₃ (9,0 mol L⁻¹), V_{ad} é o volume de ácido nítrico adicionado e V_f é o volume final da mistura (10,0 mL).

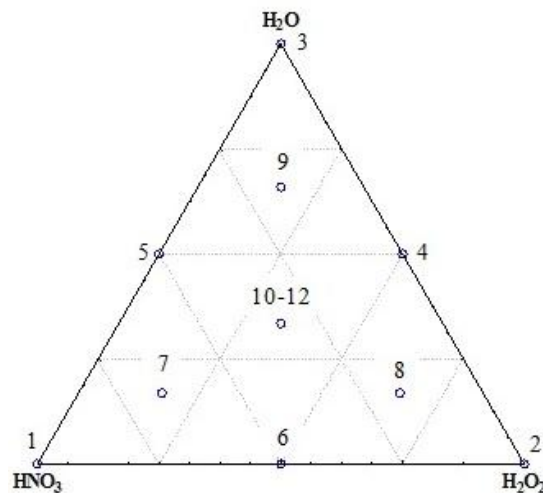


Figura 6: Distribuição dos pontos experimentais no triângulo do planejamento de misturas

Tabela 10: Matriz do planejamento de misturas com pseudocomponentes e proporções reais dos componentes, expressas em volume (mL).

Experimento	Pseudocomponente			Volume (mL)			Concentração de HNO ₃ ^a (mol L ⁻¹)
	χ_{HNO_3}	$\chi_{\text{H}_2\text{O}_2}$	$\chi_{\text{H}_2\text{O}}$	HNO ₃ (9,0 mol L ⁻¹)	H ₂ O ₂ (30%)	H ₂ O	
1	1	0	0	8,0	1,0	1,0	7,2
2	0	1	0	1,0	3,0	6,0	0,9
3	0	0	1	1,0	1,0	8,0	0,9
4	0	1/2	1/2	1,0	2,0	7,0	0,9
5	1/2	0	1/2	4,5	1,0	4,5	4,0
6	1/2	1/2	0	4,5	2,0	3,5	4,0
7	2/3	1/6	1/6	5,6	1,3	3,1	5,0
8	1/6	2/3	1/6	2,1	2,3	5,6	2,0
9	1/6	1/6	2/3	2,1	1,3	6,6	2,0
10 (PC)	1/3	1/3	1/3	3,3	1,6	5,1	3,0
11 (PC)	1/3	1/3	1/3	3,3	1,6	5,1	3,0
12 (PC)	1/3	1/3	1/3	3,3	1,6	5,1	3,0

χ = pseudocomponente; PC = ponto central; ^a concentração resultante de HNO₃ no frasco reacional

Para determinar a melhor condição experimental, adotou-se a estratégia de otimização multiresposta desenvolvida por Derringer e Suich (1980), onde os critérios e as respostas experimentais avaliadas foram: a maximização da intensidade de emissão para cada analito e a minimização da acidez residual e do teor de carbono residual, simultaneamente. Os modelos matemáticos gerados foram submetidos à análise de variância – ANOVA ($p < 0,05$), utilizando os softwares Design Expert 6.0.4 (Minneapolis, EUA) e Statistica 7.0 Statsoft (EUA). Para verificar a validade dos modelos, os parâmetros estatísticos avaliados foram a significância do modelo matemático e da falta de ajuste, o comportamento dos resíduos e o coeficiente de determinação (R^2).

4.7. Determinação da acidez residual

A acidez residual (AR) das amostras foi determinada por método titulométrico de neutralização. Uma alíquota de 100 μL do digerido final foi titulada com solução

padronizada de hidróxido de sódio (NaOH) 0,9984 mol L⁻¹, usando fenolftaleína 1% como indicador. Para o cálculo da acidez residual, foi aplicada a Equação 9.

$$AR = \frac{M_{\text{NaOH}} \times V_{\text{NaOH}}}{V_{\text{am}}} \quad (9)$$

Onde AR é a acidez residual, M_{NaOH} é a concentração da solução alcalina, V_{NaOH} é o volume gasto na titulação e V_{am} é o volume de amostra.

4.8. Determinação de carbono residual

O teor de carbono residual foi determinado de acordo com alguns trabalhos já descritos na literatura (GOUVEIA *et al.*, 2001; BIZZI *et al.*, 2010). Uma solução estoque de ácido cítrico com concentração de 5000 mg L⁻¹ foi preparada pela dissolução de 0,125 g do reagente monohidratado em 25,00 mL de água ultrapura. Em seguida, a solução foi sonicada em banho ultrassom por aproximadamente 3 minutos para eliminação de possíveis compostos voláteis de carbono. A curva de calibração foi preparada em balões volumétricos de 10,00 mL (n = 7) a partir de diluições apropriadas da solução estoque e adição de 2,0 mL de HNO₃ 50% (v/v). A concentração de C na curva variou de 10 a 180 mg L⁻¹. Uma alíquota de 1,0 mL do digerido final, previamente sonicado em banho ultrassom por 3 minutos, foi diluído com água ultrapura em uma proporção 1:5 e submetida à análise por ICP OES. As condições operacionais utilizadas no espectrômetro são mostradas na Tabela 6 da seção 4.1.

4.9. Validação do método analítico

O procedimento proposto foi validado a partir da avaliação dos seguintes parâmetros analíticos: limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), robustez do plasma, efeito de matriz, precisão (repetibilidade) e exatidão.

Para o cálculo dos limites de detecção e de quantificação, adotou-se o conceito de concentração equivalente ao sinal de fundo (BEC). Esse parâmetro é definido como a concentração do analito que produz sinal de intensidade igual ao sinal de fundo quando soluções do branco analítico são introduzidas no equipamento para determinação por

ICP OES. O BEC foi determinado calculando-se a razão entre a concentração (C) do analito em uma solução padrão multielementar (0,2 – 4,0 mg L⁻¹) e a relação sinal do analito/sinal de fundo (SBR), de acordo com a Equação 10 (BOUMANS, 1991).

$$\text{BEC} = \frac{C}{\text{SBR}} \quad (10)$$

O SBR é dado por $(I_a - I_{br})/I_{br}$. Onde I_a é o sinal de intensidade do analito na solução padrão e I_{br} é o sinal de intensidade do analito na solução do branco analítico.

Os valores de LD e LQ foram determinados a partir do BEC e do desvio padrão relativo dos brancos analíticos (RSD_{br} , $n=10$), multiplicando-se os valores desses dois parâmetros pelos fatores 3 e 10, respectivamente, e posterior divisão por 100, conforme as Equações 11 e 12 (IUPAC, 1978; BOUMANS; IVALDI; SLAVIN, 1991).

$$\text{LD} = \frac{\text{RSD}_{br} \times \text{BEC}}{100} \times 3 \quad (11)$$

$$\text{LQ} = \frac{\text{RSD}_{br} \times \text{BEC}}{100} \times 10 \quad (12)$$

A robustez do plasma foi avaliada pela razão entre a intensidade de emissão da linha iônica (280,270 nm) e linha atômica (285,213 nm) do elemento Mg (Mg II/Mg I), e posterior multiplicação pelo fator 1,8 (DENNAUD *et al.*, 2001), de acordo com a Equação 13. Os sinais de intensidade das duas linhas de Mg foram medidas em cada amostra.

$$\text{Robustez} = \frac{\text{Mg (II)}}{\text{Mg (I)}} \times 1,8 \quad (13)$$

Para avaliação de possíveis efeitos de matriz, foram preparadas curvas de calibração externa com diluições apropriadas dos padrões em HNO₃ 0,4 mol L⁻¹, e curvas com adição de analito na própria amostra. As inclinações das curvas foram comparadas estatisticamente para verificar se há diferença significativa entre elas.

A precisão foi estimada através do desvio padrão relativo (RSD), calculando-se a razão entre o desvio padrão obtido na determinação de cada analito em uma amostra real selecionada aleatoriamente (S , $n=7$) e sua respectiva concentração média (\bar{x}), e posterior multiplicação por 100 (IUPAC, 2002), conforme a Equação 14.

$$\text{RSD} = \frac{S}{\bar{x}} \times 100 \quad (14)$$

A exatidão do método foi avaliada através de teste de adição e recuperação de analitos e análise dos materiais de referência certificados de farinha de arroz (*Rice Flour*, NIST 1568b), agulhas de pinheiro (*Pine Needles*, NIST 1575a) e cereal matinal fortificado (*Fortified Breakfast Cereal*, NIST 3233).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Otimização do procedimento de preparo de amostra

Foi empregado um planejamento de misturas simplex centroide com pseudocomponentes HNO_3 , H_2O_2 e H_2O buscando verificar as melhores condições para a decomposição de amostras de sementes de guaraná em forno micro-ondas. A Tabela 11 mostra as condições experimentais e as respostas avaliadas.

Os dados gerados pela matriz do planejamento foram avaliados através dos softwares Design Expert e Statistica, testando diferentes modelos matemáticos. Para a resposta Ca, nenhum modelo ajustou-se aos dados experimentais, uma vez que a regressão para todos os modelos testados não foi estatisticamente significativa mesmo após aplicação de diferentes transformações matemáticas na resposta original. No entanto, é possível observar na matriz de dados que não há uma discrepância pronunciada entre os valores de intensidade de emissão para Ca em todas as condições experimentais. Sendo assim, mesmo fora do processo de otimização, optamos em manter o elemento Ca para posterior determinação, considerando que qualquer condição ótima sugerida também seria satisfatória para esse analito.

Tabela 11: Matriz de dados do planejamento de misturas e suas respectivas respostas experimentais

Experimento	χ			Intensidade de emissão ($c s^{-1}$)									AR ($mol L^{-1}$)	RCC (%)
	HNO ₃	H ₂ O ₂	H ₂ O	Ca	K	Mg	S	P	Cu	Fe	Mn	Zn		
1	1	0	0	27943	2560964	43851	851	6203	2446	18577	11651	2432	2,98	8,2
2	0	1	0	26611	3327091	49802	971	7081	2583	20818	12553	2623	0,38	6,5
3	0	0	1	27143	3214742	49005	930	6878	2527	18714	13035	2555	0,33	10,1
4	0	1/2	1/2	27558	3238310	49146	959	6901	2627	19605	12775	2576	0,37	7,9
5	1/2	0	1/2	28140	2787130	45940	892	6508	2465	17708	12370	2428	1,74	9,6
6	1/2	1/2	0	27313	2826809	46318	908	6545	2474	20322	12274	2451	1,69	7,8
7	2/3	1/6	1/6	26600	2704318	45575	891	6482	2506	17581	12557	2387	2,12	10,2
8	1/6	2/3	1/6	27576	3086626	48006	931	6811	2518	20393	12562	2497	0,82	7,7
9	1/6	1/6	2/3	28464	3027659	47722	920	6738	2569	16947	12721	2499	0,83	10,1
10 (PC)	1/3	1/3	1/3	27664	2988301	48455	942	6859	2603	18790	12858	2494	1,28	10,0
11 (PC)	1/3	1/3	1/3	27580	2933769	47270	924	6692	2555	18464	13104	2460	1,26	10,2
12 (PC)	1/3	1/3	1/3	28267	2924760	46341	948	6746	2590	18902	13384	2501	1,29	11,4

χ = proporção do pseudocomponente; $c s^{-1}$ = contagem por segundo; AR = acidez residual; RCC = teor de carbono residual; PC = ponto central

Para as respostas ‘K’, ‘P’, ‘S’, ‘Mn’, ‘Zn’ e ‘teor de carbono residual’ (RCC), o modelo cúbico especial foi o que melhor se ajustou. As respostas ‘Fe’ e ‘acidez residual’ (AR) ajustaram-se com o modelo quadrático, enquanto que para as respostas ‘Cu’ e ‘Mg’ o melhor ajuste foi obtido com o modelo linear. A partir da inspeção visual do gráfico de ‘outlier T’ versus ‘número do experimento’ (gerado pelo software Design Expert), foi constatado um valor anômalo para a resposta ‘K’ no experimento 10 ($t = 4,38$), correspondente a um dos pontos centrais do planejamento (Figura 7A). Valores de ‘t’ (conhecidos como *t-values*) superiores a 3,5 podem indicar algum problema com o modelo matemático, e, portanto, devem ser cuidadosamente examinados (STAT-EASE, 2005). Para o tratamento desse outlier, adotou-se uma alternativa proposta por Ferreira (2015), onde o valor anômalo foi substituído pela média dos valores restantes na matriz de dados do planejamento. Essa estratégia conduziu a uma redução no valor de ‘t’ (2,93), trazendo normalidade ao seu comportamento e sem causar interferência na média dos resultados (Figura 7B).

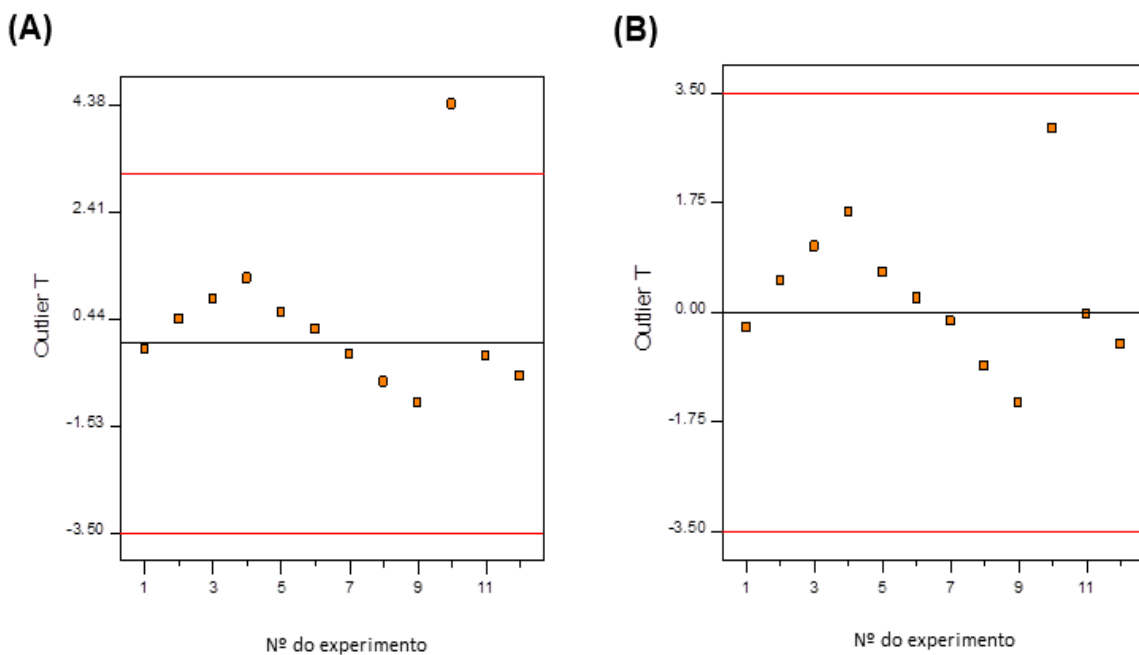


Figura 7: Gráfico de ‘outlier T’ versus ‘número do experimento’ para a resposta ‘K’. (A) antes do tratamento do resíduo; (B) após o tratamento do resíduo.

Os gráficos de ‘valores observados’ *versus* ‘valores preditos’ (Figuras 8 a 11) confirmam o bom ajuste dos modelos matemáticos aos resultados experimentais. Para todas as respostas, o coeficiente de determinação foi superior a 0,90, exceto Mn, Fe e Cu que apresentaram valores de 0,86, 0,81 e 0,52, respectivamente. Embora seja um valor relativamente baixo, o coeficiente de determinação para a resposta ‘Cu’ ($R^2 = 0,52$) foi considerado aceitável, levando-se em consideração a elevada quantidade de respostas avaliadas simultaneamente.

Os gráficos de ‘valores observados’ *versus* ‘resíduos’ (também apresentados nas Figuras 8 a 11) mostram uma distribuição residual independente e aleatória, evidenciando a adequação de cada modelo para fazer previsões.

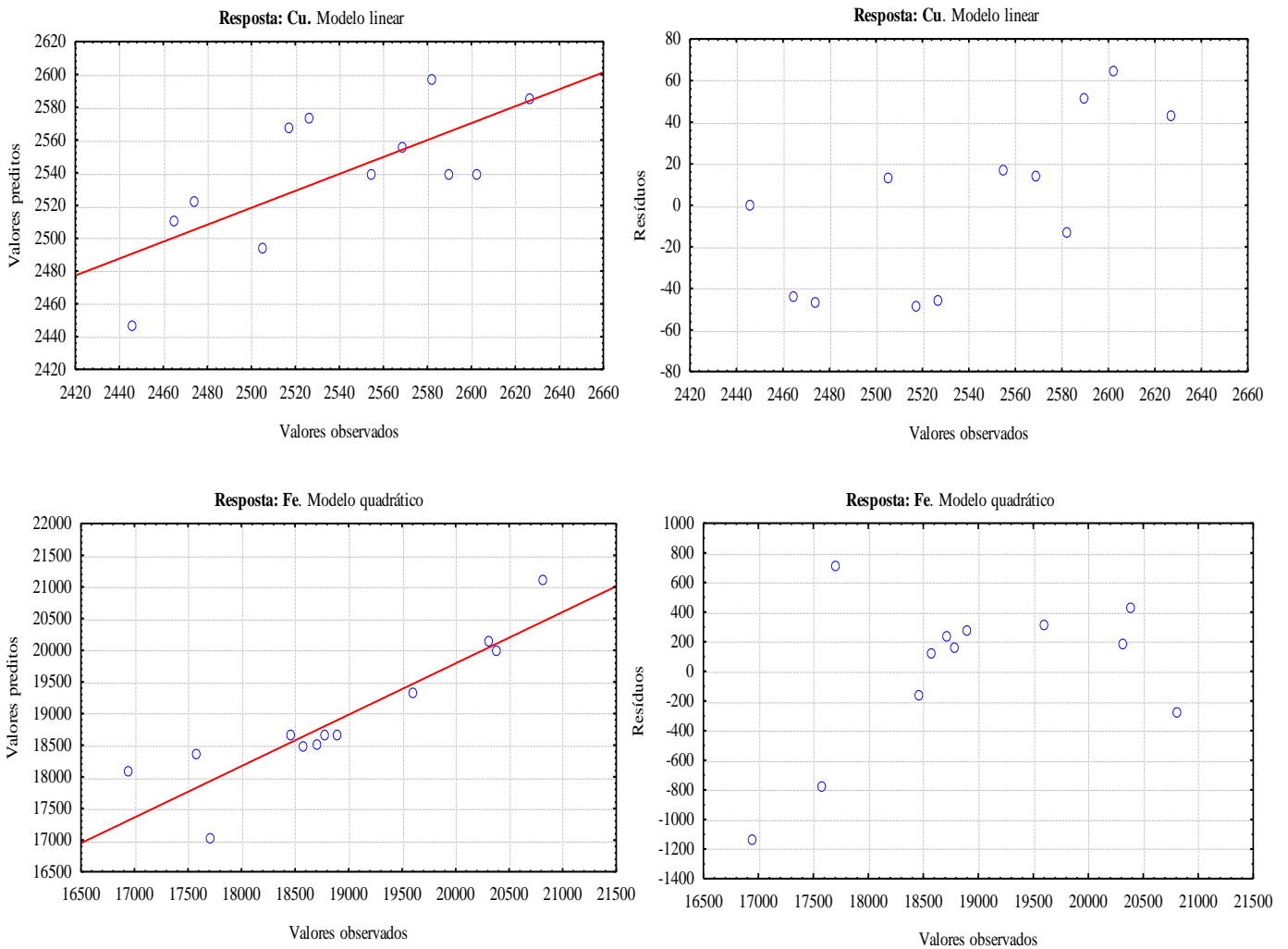


Figura 8: Gráficos de valores preditos x observados (esquerda); e resíduos x valores observados (direita) para as respostas ‘Cu’ e ‘Fe’,

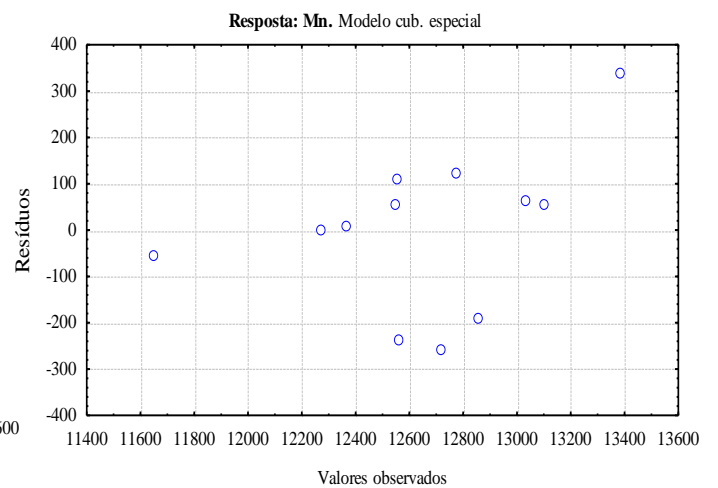
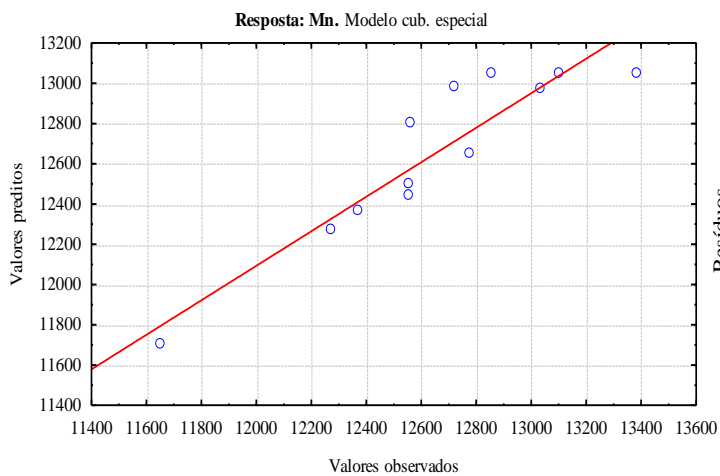
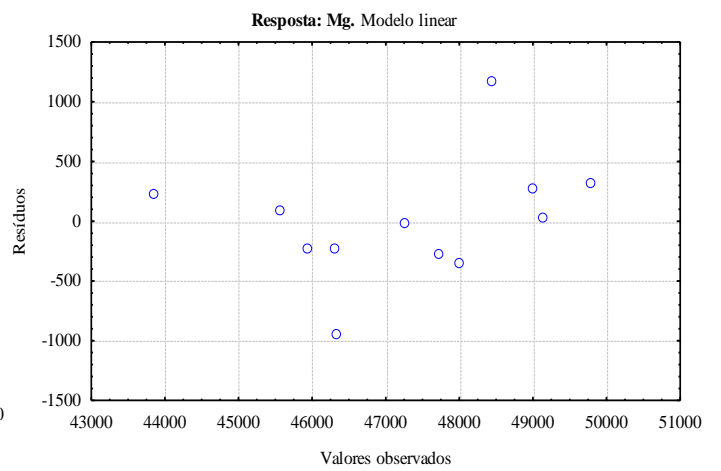
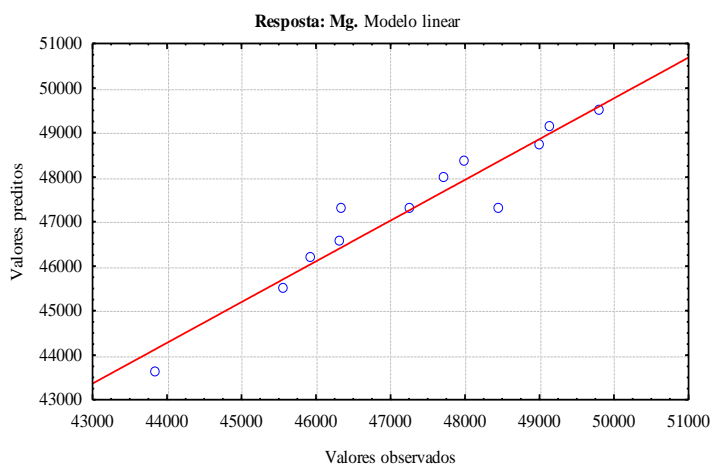
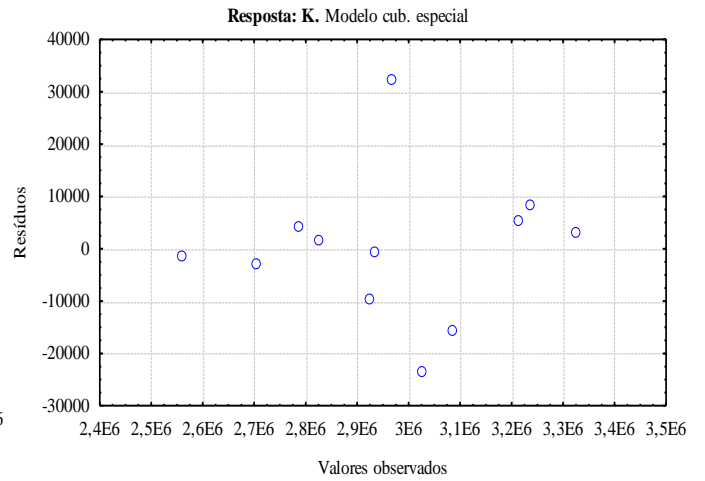
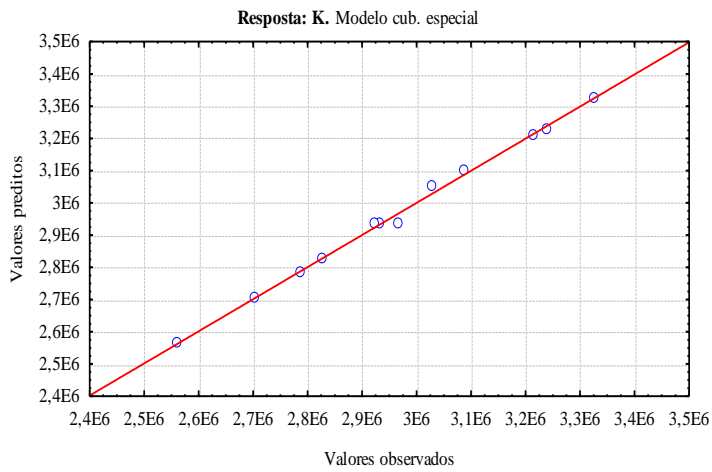


Figura 9: Gráficos de valores preditos x observados (esquerda); e resíduos x valores observados (direita) para as respostas 'K', 'Mg' e 'Mn'

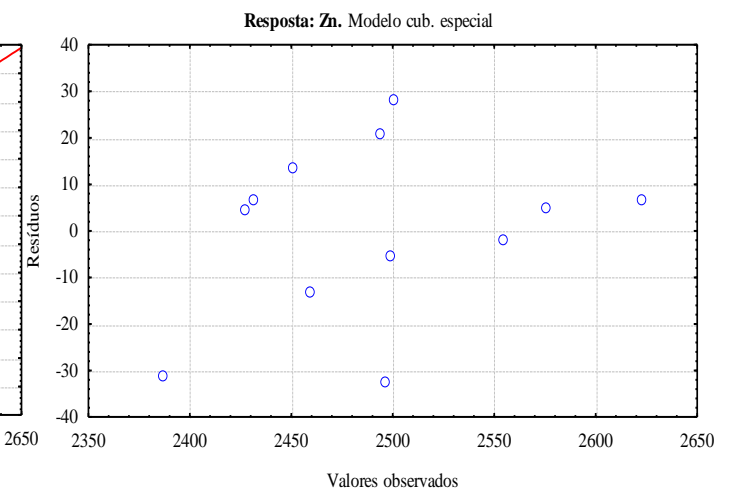
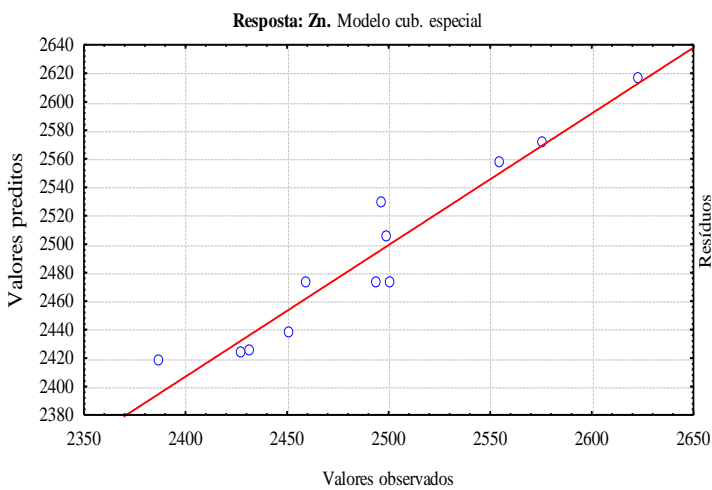
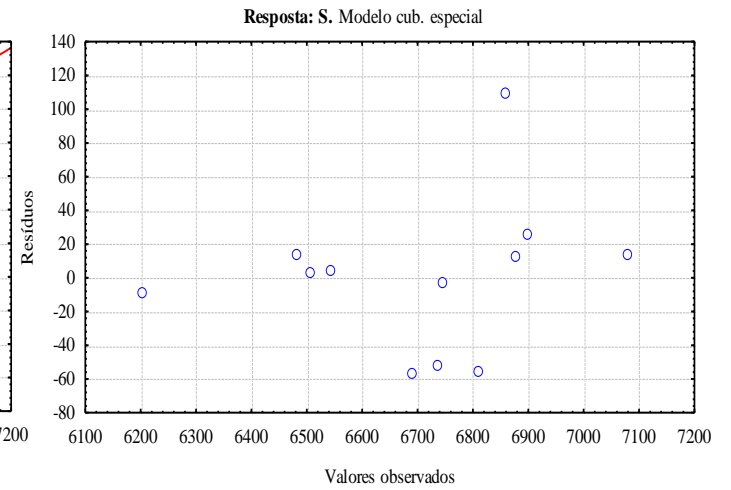
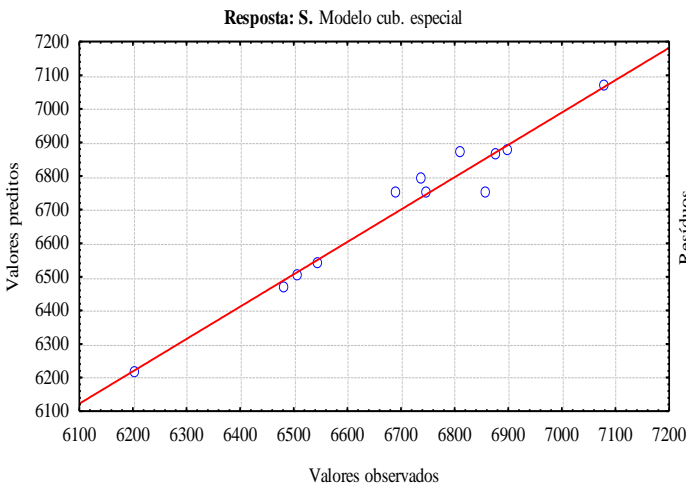
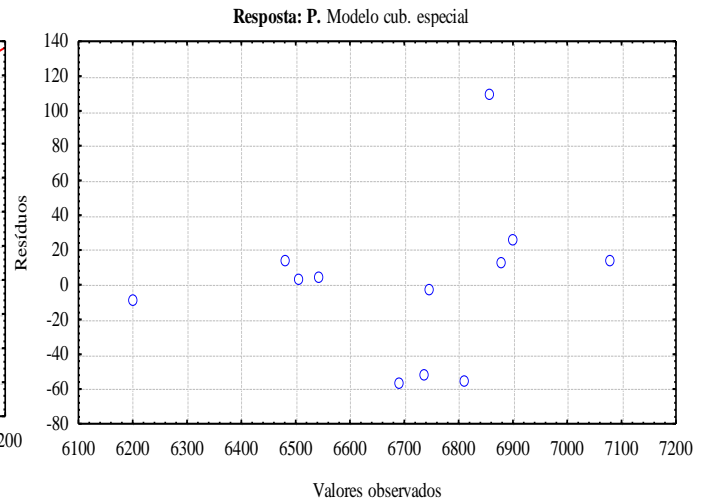
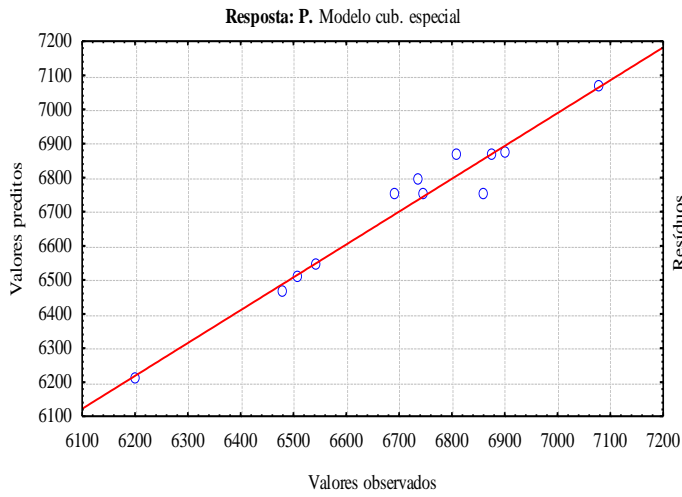


Figura 10: Gráficos de valores preditos x observados (esquerda); e resíduos x valores observados (direita) para as respostas 'P', 'S' e 'Zn'

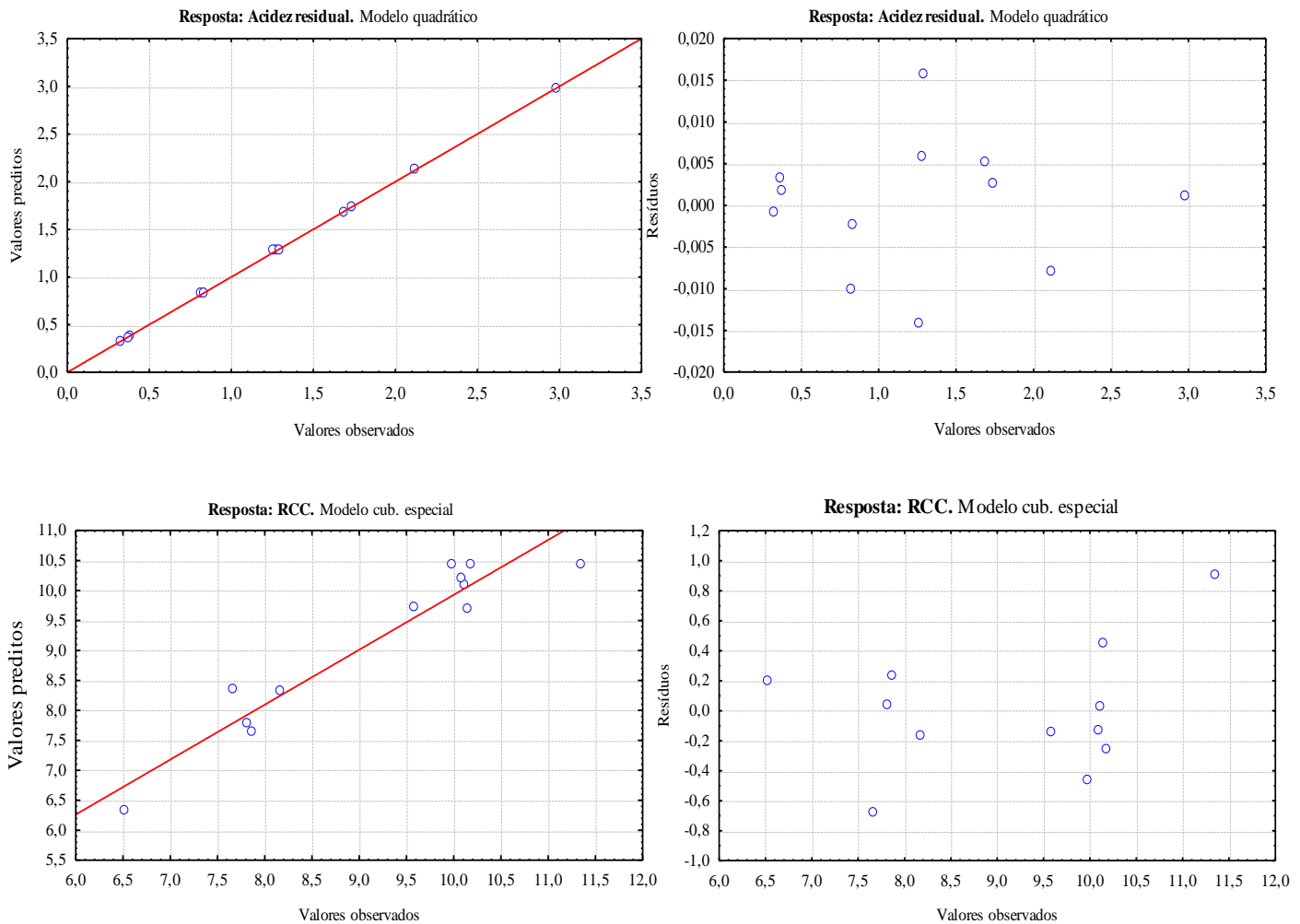


Figura 11: Gráficos de valores preditos x observados (esquerda); e resíduos x valores observados (direita) para as respostas 'acidez residual' e 'teor de carbono residual' (RCC).

Os modelos matemáticos foram validados através da análise de variância – ANOVA ($p < 0,05$). A Tabela 12 mostra um resumo da ANOVA com os modelos matemáticos ajustados para cada resposta, os respectivos valores de R^2 e os resultados da distribuição de Fisher (teste F) para a regressão e a falta de ajuste.

Tabela 12: Resumo da análise de variância (ANOVA) para as respostas experimentais avaliadas

Resposta	Modelo ajustado	R ²	Regressão			Falta de ajuste		
			F _{calc}	GL (reg;res)	F _{crit} 95%	F _{calc}	GL (faj;ep)	F _{crit} 95%
Cu	Linear	0,52	4,80	(2;9)	4,26	3,96	(7;2)	19,35
Mg	Linear	0,91	48,68	(2;9)	4,26	0,07	(7;2)	19,35
Fe	Quadrático	0,81	5,17	(5;6)	4,39	13,88	(4;2)	19,25
AR	Quadrático	0,99	11807	(5;6)	4,39	0,25	(4;2)	19,25
K	Cúbico especial	0,99	228,50	(5;6)	4,39	0,76	(3;2)	19,25
Mn	Cúbico especial	0,86	5,01	(6;5)	4,95	0,84	(3;2)	19,16
Zn	Cúbico especial	0,92	10,17	(6;5)	4,95	1,91	(3;2)	19,16
P	Cúbico especial	0,96	21,90	(6;5)	4,95	0,36	(3;2)	19,16
S	Cúbico especial	0,92	9,50	(6;5)	4,95	1,45	(3;2)	19,16
RCC	Cúbico especial	0,91	9,09	(6;5)	4,95	0,51	(3;2)	19,16

R² = coeficiente de determinação; F_{calc} = valor de F calculado pelo modelo matemático; GL = graus de liberdade; reg = regressão; res = resíduos; F_{crit} = valor de F tabelado a 95% de confiança para os respectivos graus de liberdade; faj = falta de ajuste; ep = erro puro; AR = acidez residual; RCC = teor de carbono residual.

Os valores calculados para F, ou seja, a razão entre a média quadrática da regressão e a média quadrática dos resíduos (MQ_R/MQ_r) foram maiores que o valor crítico de F ao nível de 95% de confiança, demonstrando que as regressões são estatisticamente significativas para todos os modelos ajustados. Além disso, não houve significância de falta de ajuste aos modelos matemáticos, tendo em vista que os valores calculados para F, ou seja, a razão entre a média quadrática da falta de ajuste e a média quadrática do erro puro (MQ_{faj}/MQ_{ep}) foram sempre inferiores ao valor crítico de F ao nível de 95 % de confiança. Portanto, pode-se concluir que os modelos são válidos e capazes de realizar previsões com confiabilidade.

Após a validação dos modelos matemáticos, foram construídos gráficos de Pareto de efeitos padronizados para avaliar o efeito de cada pseudocomponente e de suas interações sobre cada resposta avaliada. Os gráficos são mostrados nas Figuras 12 e 13.

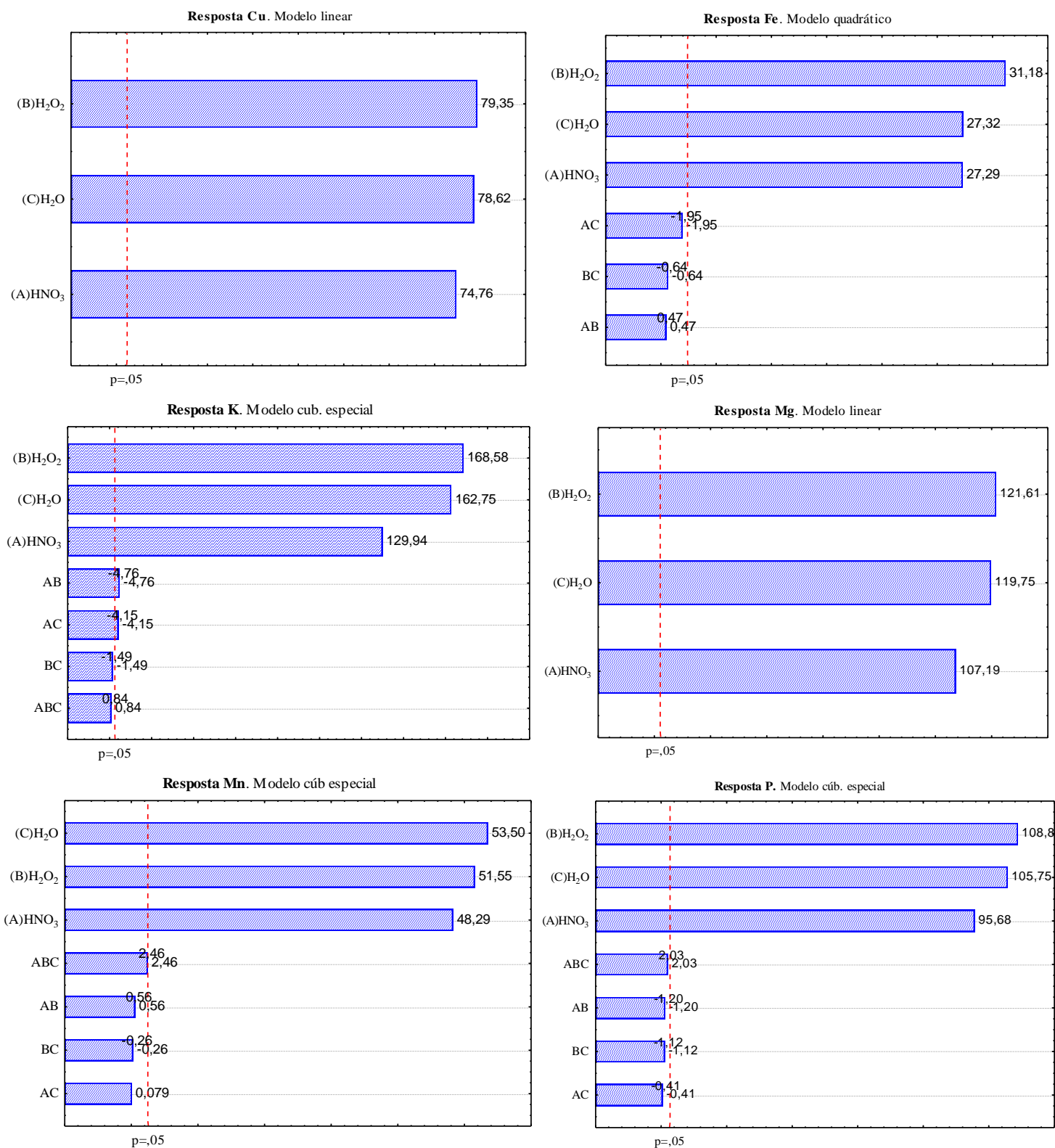


Figura 12: Gráficos de Pareto gerados para as respostas ‘Cu’, ‘Fe’, ‘K’, ‘Mg’, ‘Mn’ e ‘P’.

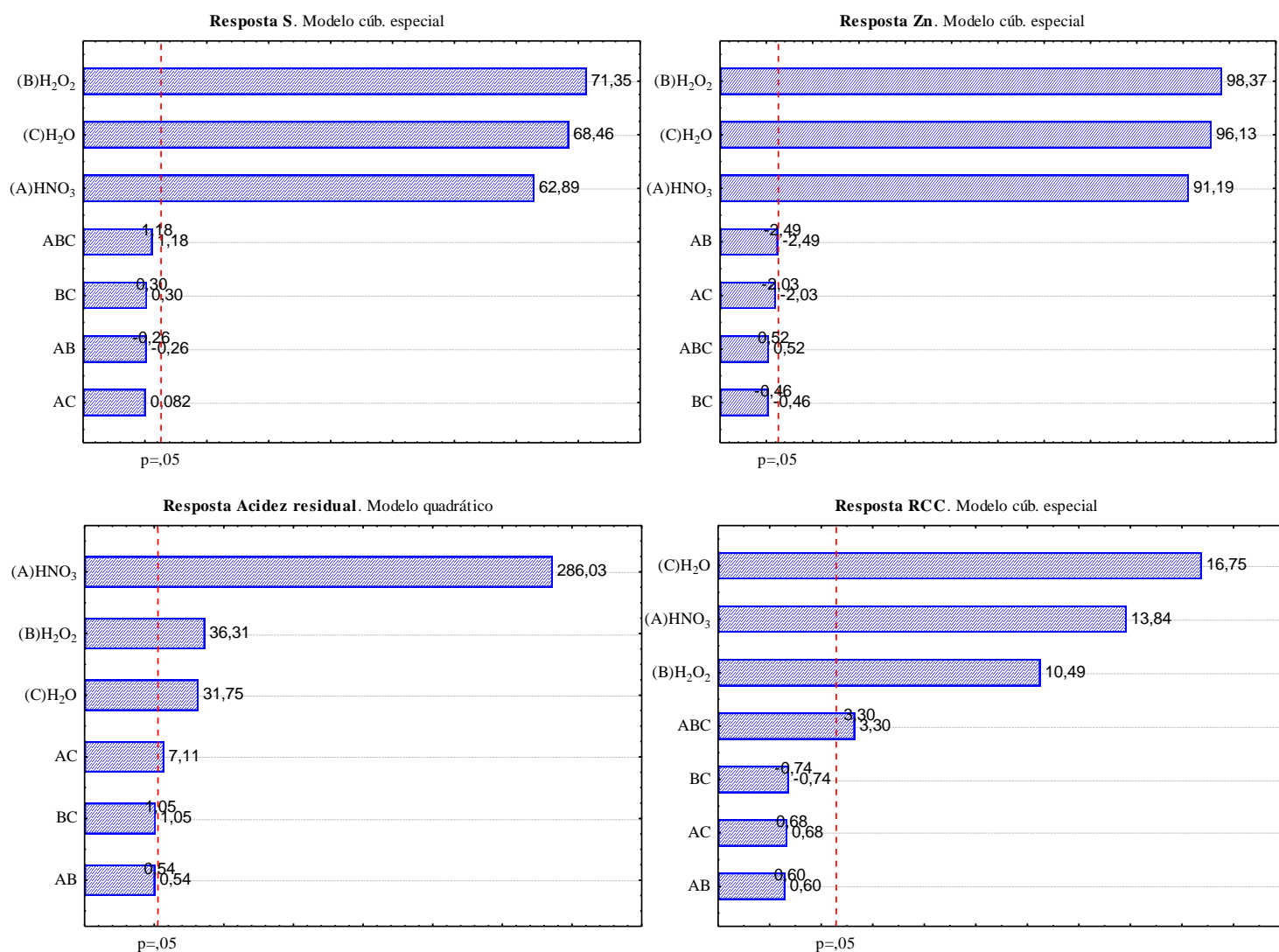


Figura 13: Gráficos de Pareto gerados para as respostas ‘S’, ‘Zn’, ‘acidez residual’ e ‘teor de carbono residual’ (RCC).

Os gráficos de Pareto das Figuras 12 e 13 mostram um comportamento similar para todos os elementos analisados, onde apenas os termos lineares mostraram-se estatisticamente significativos. A única exceção foi o elemento K, em que as interações entre os pseudocomponentes HNO₃ x H₂O₂ e HNO₃ x H₂O também foram significativas, mas com efeito antagônico evidenciado pelos valores negativos dos efeitos padronizados. Verifica-se também que o pseudocomponente H₂O₂ foi o fator com maior significância para todas essas respostas (exceto Mn), uma vez que o valor do respectivo efeito é sempre superior ao dos demais fatores.

Para as respostas ‘acidez residual’ e ‘teor de carbono residual’, os efeitos padronizados com menores valores correspondem aos fatores mais significativos, pois

no processo de otimização buscou-se minimizar essas respostas. Portanto, o pseudocomponente H₂O e a interação entre HNO₃ x H₂O são os fatores mais significativos para a ‘acidez residual’, enquanto que o pseudocomponente H₂O₂ é o fator com maior significância para a resposta ‘teor de carbono residual’. Isso reflete uma forte influência desse pseudocomponente para a elevação de todas as respostas experimentais, uma vez que o valor de seu efeito padronizado é superior ao valor dos efeitos dos demais pseudocomponentes para a maioria das respostas avaliadas.

Os coeficientes das equações que descrevem cada modelo validado estão dispostos na Tabela 13, sendo restritos apenas aos termos estatisticamente significativos, ou seja, em que o valor do erro padrão é inferior ao valor do coeficiente.

Tabela 13: Coeficientes estatisticamente significativos dos modelos matemáticos e seus respectivos erros-padrão

Resposta	Fator			Interações			
	(A) HNO ₃	(B) H ₂ O ₂	(C) H ₂ O	A*B	A*C	B*C	A*B*C
Coeficiente (± erro padrão)							
Cu	2446,3 (±32,7)	2596,3 (±32,7)	2572,7 (±32,7)				
Mg	43624,9 (±406,9)	49493,9 (±406,9)	48738,8 (±406,9)				
Fe	18465,7 (±676,4)	21093,8 (±676,4)	18486 (±676,4)				
K	2562355 (±19719)	3324281 (±19719)	3209428 (±19719)	-471885 (±99052)	-411215 (±99052)		
AR	2,98 (±0,01)	0,38 (±0,01)	0,33 (±0,01)		0,33 (±0,046)		
Mn	11707,4 (±242,4)	12497,9 (±242,4)	12971,8 (±242,4)				
Zn	2425,7 (±26,6)	2616,5 (±26,6)	2556,8 (±26,6)				
P	6212,6 (±64,9)	7068 (±64,9)	6866,4 (±64,9)				
S	852,3 (±13,5)	966,9 (±13,5)	927,7 (±13,5)				
RCC	8,34 (±0,6)	6,32 (±0,6)	-				54,32 (±16,44)

AR = acidez residual; RCC = teor de carbono residual

5.2. Determinação da condição ótima

Para a obtenção da melhor condição experimental, foi adotada a ferramenta de otimização de respostas múltiplas proposta por Derringer e Suich (1980). Tal ferramenta utiliza a função desejabilidade e requer um modelo matemático válido para cada resposta individual antes da análise simultânea. Após a etapa de validação estatística descrita na seção anterior, as respostas foram inicialmente convertidas em desejabilidades individuais (d_i). As Equações 15 e 16 mostram como são calculados os valores de ' d_i ' quando se deseja um valor de máximo e um valor de mínimo para a resposta experimental, respectivamente (CANDIOTI *et al.*, 2014).

$$d_i = (y_i - L_i / U_i - L_i)^s \quad (15)$$

$$d_i = (U_i - y_i / U_i - L_i)^s \quad (16)$$

Onde d_i é a desejabilidade individual, y_i é a resposta original, L_i é o menor valor obtido para a resposta no planejamento, U_i é o maior valor obtido para a resposta no planejamento e o expoente s é o valor de “peso” estabelecido para a resposta.

Posteriormente, as desejabilidades individuais foram combinadas e então transformadas em desejabilidade global (DG), efetuando-se a média geométrica das desejabilidades individuais (Equação 17), para encontrar as melhores respostas conjuntas (DERRINGER e SUICH, 1980; CANDIOTI *et al.*, 2014).

$$DG = \sqrt[n]{d_1 d_2 \dots d_n} \quad (17)$$

Onde DG é a desejabilidade global, n é o número de respostas, d_1 e d_2 são as desejabilidades individuais das respostas 1 e 2, respectivamente, e d_n é a desejabilidade individual da resposta n .

Os dados foram analisados através dos softwares Design Expert e Statistica, onde os critérios definidos como desejáveis foram: maximização da intensidade de emissão para cada elemento de interesse e minimização da acidez residual e do teor de carbono residual, simultaneamente (Tabela 11). Deste modo, os menores valores de

intensidade para cada analito e maiores valores para RCC e acidez residual foram assumidos como não aceitáveis ($d = 0$). De forma análoga, as máximas intensidades de emissão e mínimos valores para RCC e acidez residual foram considerados como valores ótimos, onde foi atribuído $d = 1$. Os cálculos das desejabilidades individuais e da desejabilidade global (Equações 15 a 17) foram automaticamente efetuados pelo software Design Expert, selecionando-se apenas o critério de otimização (maximização ou minimização) desejado para cada resposta. A Figura 14 mostra o gráfico de contorno e a superfície de resposta gerada pelo modelo cúbico especial para a DG.

A partir da avaliação da superfície de resposta, é possível verificar maiores valores de desejabilidade global na região experimental que compreende a interação binária entre os pseudocomponentes H_2O_2 e H_2O e apenas o pseudocomponente H_2O_2 . A condição que proporcionou o máximo valor de desejabilidade global foi a utilização de 100% do pseudocomponente H_2O_2 , correspondente ao experimento 2 do planejamento de misturas (mistura constituída por 1,0 mL de ácido nítrico a uma concentração de $9,0 \text{ mol L}^{-1}$, 3,0 mL de peróxido de hidrogênio 30% e 6,0 mL de água). Nesta condição, quase todas as respostas analisadas apresentaram desejabilidade individual bem próxima de 1,000. As únicas exceções foram as respostas Cu e Mn, que apresentaram valores próximos de 0,800 e 0,500, respectivamente. Entretanto, esses valores são considerados aceitáveis, levando-se em consideração o grande número de respostas que estão sendo otimizadas simultaneamente. A desejabilidade global foi igual a 0,900, provando que as condições impostas como desejáveis foram quase totalmente atendidas

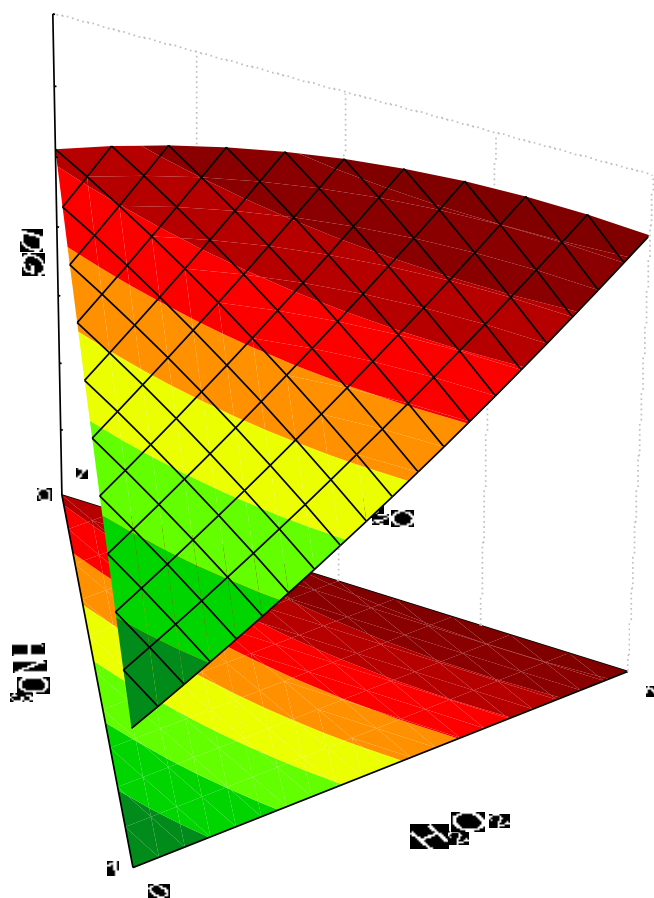
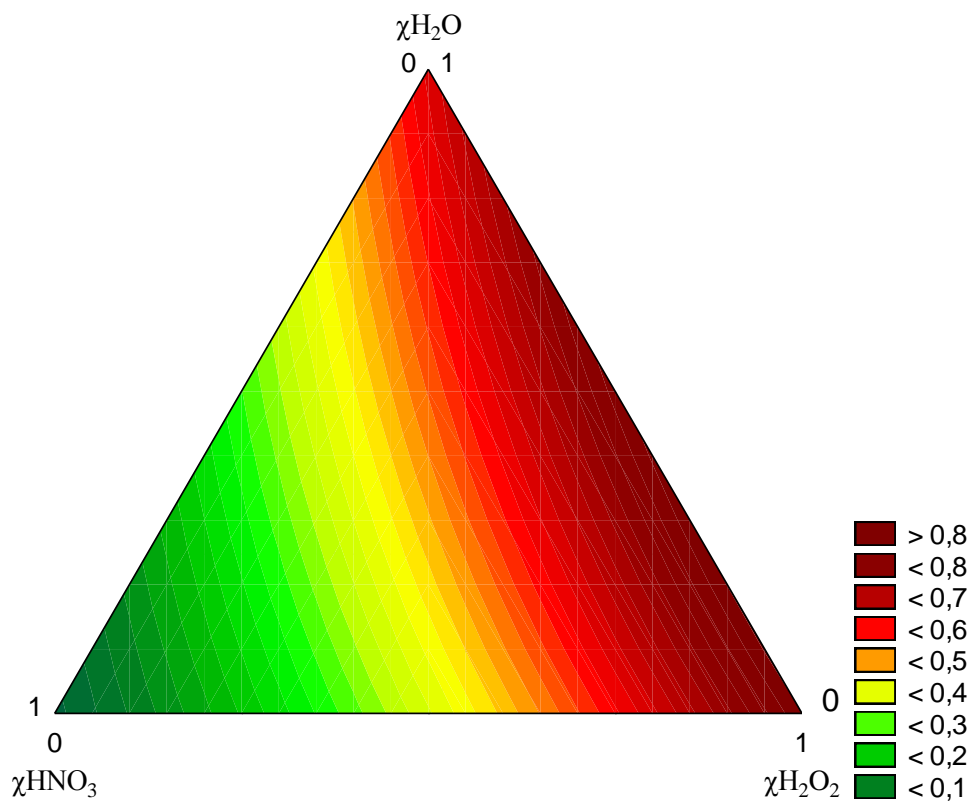


Figura 14: Gráfico de contorno (acima) e superfície de resposta (abaixo) para a proporção entre os pseudocomponentes usando desejabilidade global como resposta. Regiões com coloração mais avermelhada correspondem a maiores valores de desejabilidade global

Na Figura 15 são mostrados os valores de desejabilidade individual e combinada detalhadamente.

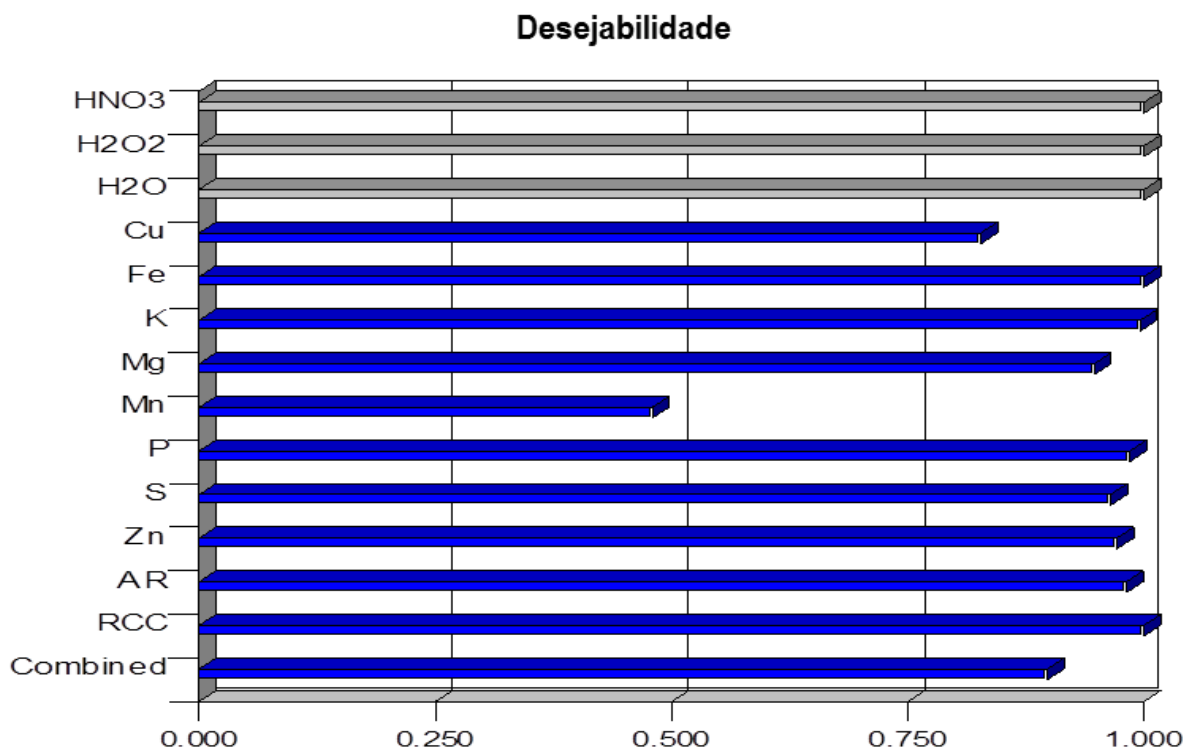


Figura 15: Gráfico de desejabilidades para cada resposta individual e desejabilidade combinada. HNO₃, H₂O₂ e H₂O correspondem aos respectivos pseudocomponentes. AR = acidez residual; RCC = teor de carbono residual; combined = desejabilidade global (ou combinada)

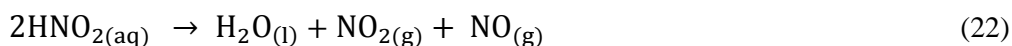
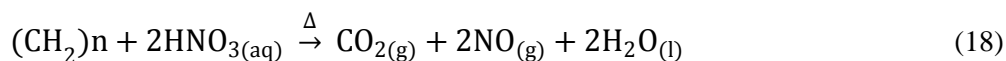
Após a determinação da condição ótima, realizou-se uma decomposição de uma amostra de guaraná assistida por radiação micro-ondas (em triplicata), com o objetivo de avaliar a capacidade de previsão dos modelos matemáticos. Os valores experimentais obtidos são apresentados na Tabela 14. É possível observar uma grande concordância entre os valores experimentais e os valores teoricamente previstos pela condição ótima, mostrando que os modelos ajustados apresentam boa capacidade de previsão.

Tabela 14: Comparação entre os valores previstos pelo modelo e valores obtidos experimentalmente com respectivos intervalos de confiança a 95% (n=3)

Resposta	Valor previsto	Valor experimental (\pm dp)
Cu ($c s^{-1}$)	2596	2613 (\pm 219)
Fe ($c s^{-1}$)	21094	21311 (\pm 1181)
Zn ($c s^{-1}$)	2616	2646 (\pm 158)
Mn ($c s^{-1}$)	12497	13522 (\pm 2970)
Mg ($c s^{-1}$)	49494	50568 (\pm 1939)
K ($c s^{-1}$)	$3,32 \times 10^6$	$3,35 \times 10^6$ (\pm 126775)
P ($c s^{-1}$)	7068	7162 (\pm 181)
S ($c s^{-1}$)	966	978 (\pm 17)
AR ($mol L^{-1}$)	0,38	0,38 (\pm 0,04)
RCC (%)	6,32	6,52 (\pm 0,32)

dp = desvio padrão; AR = acidez residual; RCC = teor de carbono residual; $c s^{-1}$ = intensidade em contagem por segundo.

A satisfatória decomposição empregando-se ácido nítrico diluído pode ser justificada pelo ciclo de reações químicas que possivelmente ocorrem no frasco, promovendo a regeneração do ácido nítrico no meio reacional. No entanto, para que esse ciclo ocorra eficientemente, é necessário que uma quantidade suficiente de oxigênio esteja presente na fase gasosa dentro do frasco para oxidar o $NO_{(g)}$ proveniente da decomposição da amostra à $NO_{2(g)}$ (BIZZI; NÓBREGA; BARIN, 2014). Como utilizamos frascos não pressurizados previamente, é provável que o oxigênio tenha sido fornecido pelo H_2O_2 . Além de elevar o potencial oxidante da solução ao ser associado com HNO_3 , o peróxido de hidrogênio pode sofrer decomposição produzindo H_2O e O_2 no interior do frasco (BIZZI; NÓBREGA; BARIN, 2014). A quantidade de O_2 liberado é dependente do volume de H_2O_2 presente no frasco e esse fator é determinante para o favorecimento da oxidação da matéria orgânica. Tal fato provavelmente explica a maior eficiência da mistura entre 1,0 mL de HNO_3 , 3,0 mL de H_2O_2 e 6,0 mL de H_2O (pseudocomponente H_2O_2), tendo em vista que essa condição corresponde ao nível máximo de H_2O_2 estabelecido no planejamento. Deste modo, pode-se inferir que a regeneração do HNO_3 foi maximizada devido a presença de maior quantidade de O_2 no meio reacional (BIZZI *et al.*, 2014; MORAES *et al.*, 2016). As possíveis reações químicas ocorridas dentro do frasco são representadas nas equações 18 a 22.



A reação representada na equação 18 corresponde ao processo de oxidação da matéria orgânica (amostra) após reação com ácido nítrico sob condições de elevada temperatura, liberando dióxido de carbono, água e óxido nítrico. A equação 19 representa a reação de decomposição do peróxido de hidrogênio em meio ácido, produzindo água e gás oxigênio. Na reação representada pela equação 20 ocorre a oxidação do $\text{NO}_{(\text{g})}$ liberado pela decomposição da amostra à $\text{NO}_{2(\text{g})}$ (produto de reação não gerado quando se utiliza ácido nítrico concentrado). Na equação 21 está representado o processo de reabsorção (condensação) do $\text{NO}_{2(\text{g})}$ na solução, no qual resulta em uma reação de desproporcionamento, favorecendo a regeneração do ácido nítrico. Finalmente, a molécula de HNO_2 sofre decomposição e produz $\text{NO}_{2(\text{g})}$ e $\text{NO}_{(\text{g})}$, conforme reação representada pela Equação 22. Os gases NO e NO_2 gerados seguirão a sequência reacional descrita na Equação 20, enquanto a molécula de HNO_3 reiniciará o ciclo de oxidação da matéria orgânica representada pela Equação 18 (MORAES *et al.*, 2016).

A influência da água para a eficiência de decomposição das amostras também pode ser destacada. Apesar de não apresentar poder oxidante, as moléculas de H_2O interagem fortemente com o campo elétrico gerado pela radiação micro-ondas devido aos fenômenos de migração iônica e rotação de dipolos. Isso implica em uma elevada taxa de absorção e favorece o aquecimento da mistura no meio reacional (MORAES *et al.*, 2016).

5.3. Eficiência de decomposição

O procedimento proposto para a decomposição das amostras conduziu a soluções resultantes bastante límpidas e sem nenhum resíduo sólido disperso (Figura 16). Embora seja uma análise apenas visual e não conclusiva, essas características são desejáveis em uma avaliação preliminar do preparo de amostra, considerando que a presença de resíduos nos digeridos pode sugerir forte indício de oxidação incompleta da matéria orgânica (BARNES; SANTOS JÚNIOR; KRUG, 2014).

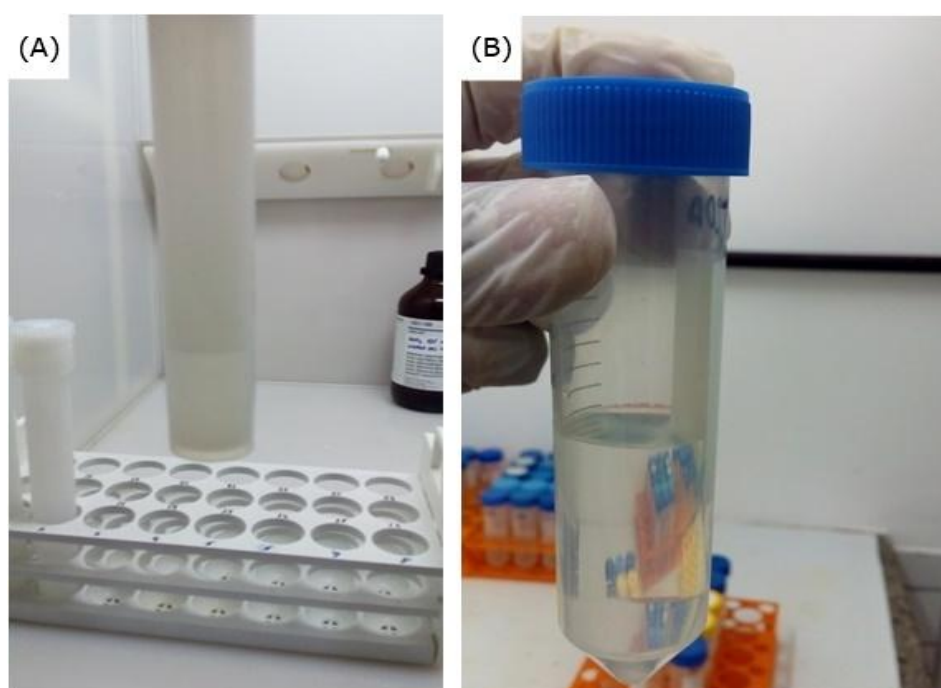


Figura 16. (A) Solução da amostra em frasco de PFA após decomposição em forno micro-ondas. (B) Solução resultante após diluição com água ultrapura em frasco de polipropileno.

Um parâmetro amplamente empregado para avaliar a eficiência de um procedimento de decomposição é a verificação da quantidade de carbono remanescente nas amostras digeridas. O teor de carbono residual foi determinado por ICP OES e os resultados obtidos são apresentados na Figura 17. Os experimentos 1 a 9 mostrados na Figura 17 são os respectivos experimentos do planejamento de misturas. Já os experimentos 10 (PC) e 11 (Ref) correspondem à média do ponto central do planejamento e ao valor médio obtido para o método referência, respectivamente.

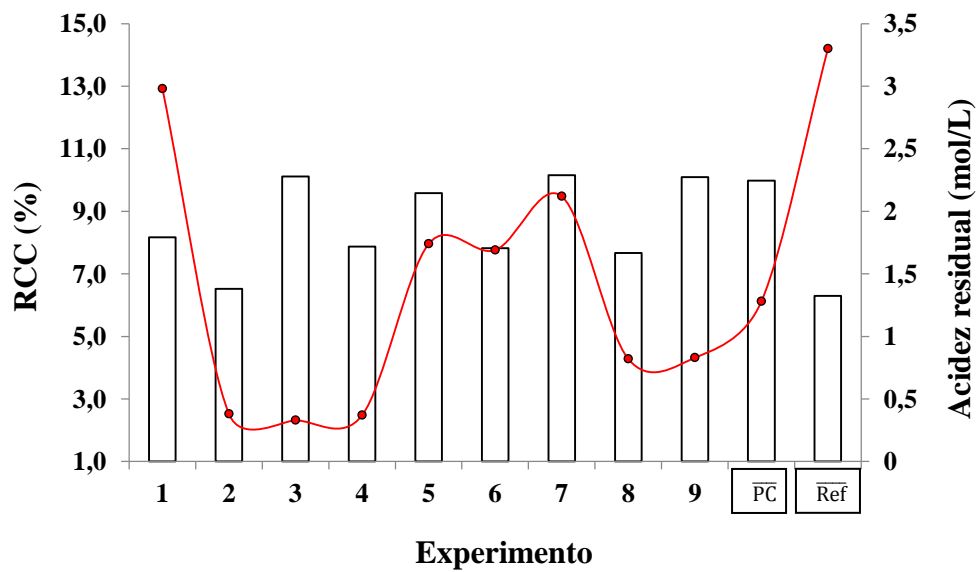


Figura 17: Teor de carbono residual (barras) e acidez residual (pontos vermelhos) da solução resultante em cada experimento do planejamento de misturas. RCC = teor de carbono residual; PC = valor médio obtido para o ponto central; Ref = valor médio obtido para o procedimento referência (n=3).

Elevados teores de carbono residual podem afetar as condições de excitação no plasma e causar interferências espectrais às linhas analíticas de alguns elementos, principalmente quando se utiliza tocha com configuração axial, em que a sensibilidade é mais alta (KNAPP; MAICHIN; BAUMGARTNER, 1998; SILVA *et al.*, 2002). Após a decomposição de amostras de plantas empregando ácido nítrico diluído e radiação micro-ondas, Araújo *et al.* (2002) verificaram que teores de carbono residual de até 12% não causaram interferências na determinação de Ca, K, Mg, S, Cu, Fe, Mn e Zn por ICP OES.

No presente trabalho, os teores de carbono residual para todo o domínio experimental estudado (0,9, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0 e 7,2 mol L⁻¹) foram sempre inferiores a 11%, conforme mostra a figura 17 (barras). Partindo do pressuposto que 12% é um valor considerado adequado para se trabalhar com ICP OES, esses resultados indicam que todas as condições utilizadas conduziram a uma satisfatória decomposição da amostra. O procedimento proposto (experimento 2) se destaca por apresentar teor de carbono residual de apenas 6,5%. Utilizando o método referência com ácido nítrico concentrado (experimento 11), o teor médio de carbono residual obtido foi 6,3%. Deste modo, pode-se afirmar que a eficiência de decomposição da matéria orgânica foi

praticamente igual ao se utilizar HNO₃ concentrado e diluído (auxiliados por H₂O₂) para a decomposição de amostras de sementes de guaraná assistida por radiação micro-ondas. Esses resultados reforçam a hipótese de regeneração *in situ* do ácido nítrico.

Para a determinação de As, Cd, Hg e Pb em amostras de sementes de guaraná por ICP-MS, Muller *et al.* (2015) propuseram um procedimento de decomposição assistida por radiação micro-ondas utilizando 6,0 mL de uma solução de HNO₃ 4,0 mol L⁻¹. Nesse trabalho, o programa de aquecimento aplicado consistiu de três etapas: (1) potência fixada em 1400 W e rampa de aquecimento com duração de 20 minutos até atingir uma temperatura de 200 °C; (2) as condições de temperatura e potência da etapa anterior foram mantidas por 20 minutos; e (3) os frascos foram resfriados por um período de 20 minutos com potência de 0 W. De acordo com os autores, essas condições promoveram a decomposição satisfatória de aproximadamente 500 mg de amostra (DOC < 320 mg L⁻¹). Considerando a massa utilizada e o volume de aferição da amostra após decomposição (25 mL), o valor de DOC obtido corresponde a um RCC de aproximadamente 9 %. Em comparação com os resultados obtidos no presente estudo, verifica-se que a adição de H₂O₂ como reagente auxiliar possibilitou uma maior eficiência de decomposição (RCC < 7%) reduzindo-se tanto o tempo e a temperatura aplicada no forno micro-ondas, como também a concentração de HNO₃ utilizada, mas com uma massa de amostra duas vezes menor (250 mg).

A concentração de ácido na solução resultante é outro importante fator que deve ser levado em consideração para avaliar a eficiência de decomposição. Soluções de ácido diluído são desejáveis quando se trabalha com ICP OES, pois podem eliminar problemas associados à interferência de transporte na etapa de introdução de amostra e também prevenir possíveis danos aos componentes instrumentais (NÓBREGA e DONATI, 2011; MORAES *et al.*, 2016). A acidez residual foi determinada por método volumétrico de neutralização e os resultados são mostrados na Figura 17. Os valores variaram de 0,3 a 3,3 mol L⁻¹ para o experimento com o pseudocomponente H₂O (HNO₃ 0,9 mol L⁻¹) e experimento com HNO₃ 65% (HNO₃ 14,4 mol L⁻¹), respectivamente. É possível observar uma tendência já esperada na diminuição da acidez residual a medida que soluções mais diluídas são empregadas para a decomposição da amostra. Com a aplicação do procedimento proposto, o digerido final apresentou acidez residual inferior a 0,4 mol L⁻¹, sendo totalmente adequada para a análise multielementar por ICP OES.

A aplicação do procedimento proposto representa uma redução de aproximadamente 87% na utilização de HNO₃ em relação ao procedimento adotado como referência para o preparo de amostras de guaraná. Adicionalmente, a baixa acidez residual obtida contribui para a geração de resíduos menos agressivos ao meio ambiente, atendendo requisitos propostos pela Química Verde.

5.4. Validação do método analítico

O método proposto foi validado através dos parâmetros analíticos apresentados na Tabela 15.

Tabela 15: Concentração equivalente ao sinal de fundo (BEC), limites de detecção e de quantificação (LD e LQ), desvio padrão relativo (RSD, n=7) e faixa linear de trabalho para o procedimento proposto.

Analito	BEC (mg L ⁻¹)	LD		LQ		RSD (%)	Faixa linear de trabalho (mg L ⁻¹)	R ²
		(mg L ⁻¹)	(mg kg ⁻¹)	(mg L ⁻¹)	(mg kg ⁻¹)			
Ca	0,138	0,072	7,2	0,24	24,0	5,1	0,24 – 30	0,9997
Cu	0,005	0,0050	0,50	0,017	1,7	3,7	0,017 - 2,5	0,9998
Fe	0,008	0,0024	0,24	0,008	0,8	3,8	0,008 – 5	1,0000
K	0,017	0,012	1,2	0,04	4,0	2,1	0,04 – 40	0,9995
Mg	0,006	0,006	0,6	0,02	2,0	3,0	0,02 – 20	0,9998
Mn	0,001	0,0002	0,02	0,0006	0,07	3,2	0,0006 - 2,5	0,9999
P	0,059	0,024	2,4	0,08	8,0	2,8	0,08 – 20	0,9998
S	0,143	0,049	4,9	0,16	16,0	2,7	0,16 – 10	0,9998
Zn	0,011	0,003	0,30	0,01	1,0	4,1	0,01 - 3,75	0,9999

Os valores de LD e LQ variaram de 0,02 a 7,2 mg kg⁻¹ e 0,07 a 24,0 mg kg⁻¹, respectivamente. Esses baixos valores refletem que o método possui alta sensibilidade. Isso pode ser justificado basicamente por dois fatores: a utilização de HNO₃ bastante diluído para o preparo de amostra, resultando na obtenção de baixos valores de branco (BIZZI; NÓBREGA; BARIN, 2014); e a utilização de um nebulizador (OneNeb) que produz um aerossol ‘mais fino’, melhorando a eficiência de transporte da amostra para o

plasma e, conseqüentemente, fornecendo maior sensibilidade ao espectrômetro em relação aos nebulizadores de vidro tradicionais (MOFFET; RUSSELL; LENER, 2011).

O método proposto também mostrou-se bastante preciso, tendo em vista que os valores do desvio padrão relativo (RSD) foram sempre inferiores a 5,2% para todos os elementos determinados.

A robustez do plasma foi avaliada efetuando-se a razão entre as intensidades Mg II/Mg I, e posterior multiplicação pelo fator 1,8. Esse valor é recomendado na literatura para corrigir a diferença entre a sensibilidade da linha iônica (280,270) e atômica (285,213) do Mg quando se utiliza espectrômetros comercializados pela Varian (DENNAUD *et al.*, 2001). Para todas as amostras analisadas, o valor obtido foi sempre superior a 8, evidenciando que o plasma estava operando sob condições robustas. Isso significa que a transferência de energia do plasma para a amostra não estava sendo afetada, ou seja, os processos de excitação e ionização dos analitos estavam ocorrendo de forma eficaz (DENNAUD *et al.*, 2001).

Para avaliação de efeitos de matriz, a inclinação das curvas analíticas de calibração externa e com adição de analito foi comparada estatisticamente, aplicando-se teste F e teste t. Ambas as curvas foram preparadas em triplicata. Para todos os elementos, os valores calculados para F foram inferiores ao F crítico. Deste modo, assume-se que não há diferença significativa entre as variâncias ao nível de 95% de confiança e o teste t é aplicado admitindo-se que as variâncias são equivalentes. Os valores de t calculados foram todos inferiores ao valor de t crítico ao nível de 95% de confiança, mostrando que não há diferença estatisticamente significativa entre as inclinações das curvas analíticas de calibração preparadas em meio aquoso e com adição de analito na matriz da amostra. Os coeficientes das equações geradas pelas curvas de calibração e os testes estatísticos realizados são mostrados nas Tabelas 16 e 17, respectivamente.

Tabela 16: Coeficientes das equações geradas pelas curvas de calibração externa e com adição de analito

Analito	Curva aquosa		R ²	Curva com adição de analito		R ²
	A	B		A	B	
Ca	7607 (±36)	1207 (±45)	0,9987	7607 (±71)	8215 (±177)	0,9991
K	398296 (±1689)	81906(±3781)	0,9997	397448 (±4418)	734490 (±9007)	0,9985
Mg	2626 (±25)	510 (±79)	0,9993	2569 (±23)	10161 (±145)	0,9993
P	335 (±2)	5,3 (±0,6)	0,9996	330 (±5)	1616 (±3)	0,9991
S	74 (±1)	9 (±1)	0,9996	74 (±1)	178 (±2)	0,9992
Cu	16472 (±110)	266 (±66)	0,9997	16413 (±194)	1994 (±156)	0,9994
Mn	115380 (±840)	-551 (±123)	0,9997	113914 (±1507)	18993 (±1246)	0,9998
Zn	12234 (±99)	348 (±40)	0,9995	12586 (±243)	3027 (±154)	0,9999
Fe	29393 (±141)	564 (±26)	0,9997	29298 (±98)	31702 (±505)	0,9995

a = inclinação da curva analítica de calibração. b = coeficiente linear da curva analítica de calibração.

Tabela 17: Testes estatísticos aplicados aos analitos nas curvas de calibração

Elemento	Testes estatísticos			
	F _{calc}	F _{95%}	t _{calc}	t _{95%}
Ca	3,79	19	0,01	2,78
Mg	1,16		0,48	
K	8,44		2,0	
P	4,0		1,97	
S	9,57		0,0	
Cu	4,50		2,55	
Mn	3,99		1,41	
Zn	5,42		2,47	
Fe	5,42		0,95	

F_{calc} = valor de F calculado; F_{95%} = valor crítico de F ao nível de 95% de confiança;
t_{calc} = valor calculado para t; t_{95%} = valor crítico de t ao nível de 95% de confiança

Esses resultados mostram que a sensibilidade do equipamento para os analitos estudados não foi alterada significativamente ao se utilizar curva de calibração com adição de analito. Deste modo, pode-se afirmar que a matriz não causou interferência na determinação dos elementos e, portanto, o método de calibração externa pode ser utilizado (THOMPSON e BARNES, 1992).

Devido a indisponibilidade comercial de CRM de guaraná, a exatidão do procedimento foi avaliada através da análise dos materiais de referência certificados de farinha de arroz (*Rice Flour*, NIST 1568b), agulhas de pinheiro (*Pine Needles*, NIST 1575a) e cereal matinal certificado (*Fortified Breakfast Cereal*, NIST 3233). Os valores encontrados pelo método proposto e os valores certificados nos materiais de referência são apresentados na Tabela 18. Uma avaliação estatística utilizando o teste t mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa a um nível de 95% de confiança.

A exatidão também foi avaliada através de ensaios de adição e recuperação em uma amostra de guaraná selecionada de forma aleatória. Para a realização desse teste, foram adicionadas alíquotas de solução padrão dos analitos aos frascos de PFA antes da decomposição da amostra no forno micro-ondas. A recuperação foi avaliada em dois níveis de concentração: 0,1 e 0,2 mg L⁻¹ para os microelementos Cu, Fe, Mn e Zn; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹ para os macroelementos Ca, Mg, K, P e S. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 19, onde é possível observar que todos os elementos adicionados na amostra foram recuperados satisfatoriamente (94 a 108%), confirmando a exatidão do método proposto.

Tabela 18: Comparação entre os valores encontrados com o método proposto (média \pm IC, $n=3$) e os valores certificados nos CRM's de farinha de arroz (*Rice Flour*, 1568b), agulhas de pinheiro (*Pine Needles*, 1575a) e cereal matinal fortificado (*Fortified Breakfast Cereal*, 3233).

Elemento	NIST 1568b		NIST 1575 ^a		NIST 3233	
	Valor certificado (mg kg ⁻¹)	Valor encontrado (mg kg ⁻¹)	Valor certificado	Valor Encontrado	Valor certificado (mg kg ⁻¹)	Valor encontrado (mg kg ⁻¹)
K	1282 \pm 11	1220 \pm 54	0,417 \pm 0,007 ^a	0,416 \pm 0,019	3060 \pm 140	3105 \pm 50
S	1200 \pm 10	1193 \pm 8	Nc	940 \pm 7	nc	1026 \pm 57
P	1530 \pm 40	1560 \pm 33	0,107 \pm 0,008 ^a	0,106 \pm 0,003	2592 \pm 68	2516 \pm 49
Mg	559 \pm 10	550 \pm 4	0,106 \pm 0,017 ^a	0,090 \pm 0,006	1093 \pm 37	1151 \pm 43
Ca	118,4 \pm 3,1	120,5 \pm 6,0	0,25 \pm 0,01 ^a	0,26 \pm 0,02	36910 \pm 920	37212 \pm 937
Cu	2,35 \pm 0,16	2,24 \pm 0,12	2,8 \pm 0,2 ^b	2,7 \pm 0,1	3,97 \pm 0,28	3,62 \pm 0,30
Fe	7,42 \pm 0,44	7,83 \pm 0,12	46 \pm 2 ^b	44 \pm 1	766 \pm 36	769 \pm 11
Mn	19,2 \pm 1,8	19,1 \pm 0,8	488 \pm 12 ^b	470 \pm 10	33,1 \pm 1,1	30,0 \pm 2,3
Zn	19,42 \pm 0,26	18,80 \pm 0,42	38 \pm 2 ^b	37 \pm 4	628 \pm 16	625 \pm 7

^aconcentração expressa em %; ^bconcentração expressa em mg kg⁻¹; nc = não certificado.

Tabela 19: Teste de adição e recuperação dos analitos em dois níveis de concentração (média \pm desvio padrão, $n=3$).

Analito	C_{inicial}* (mg L ⁻¹)	Adição 1 (0,1 mg L ⁻¹)	Rec (%)	Adição 2 (0,2 mg L ⁻¹)	Rec (%)	Adição 1 (1,0 mg L ⁻¹)	Rec (%)	Adição 2 (2,0 mg L ⁻¹)	Rec (%)
Cu	0,125 \pm 0,005	0,227 \pm 0,004	102 \pm 1	0,331 \pm 0,009	103 \pm 5	-	-	-	-
Fe	0,328 \pm 0,010	0,430 \pm 0,011	101 \pm 5	0,532 \pm 0,012	101 \pm 9	-	-	-	-
Mn	0,159 \pm 0,004	0,261 \pm 0,002	102 \pm 3	0,362 \pm 0,011	101 \pm 6	-	-	-	-
Zn	0,181 \pm 0,009	0,281 \pm 0,017	100 \pm 11	0,392 \pm 0,004	105 \pm 3	-	-	-	-
Ca	7,75 \pm 0,15	-	-	-	-	8,76 \pm 0,24	94 \pm 4	9,92 \pm 0,45	100 \pm 10
Mg	6,63 \pm 0,12	-	-	-	-	7,71 \pm 0,10	108 \pm 2	8,68 \pm 0,07	102 \pm 3
K	54,22 \pm 0,68	-	-	-	-	55,31 \pm 0,231	107 \pm 3	56,12 \pm 0,22	103 \pm 2
P	15,36 \pm 0,36	-	-	-	-	16,29 \pm 0,08	98 \pm 6	17,24 \pm 0,21	99 \pm 4
S	12,08 \pm 0,18	-	-	-	-	13,10 \pm 0,06	98 \pm 3	14,07 \pm 0,19	96 \pm 8

* Concentração do analito na amostra antes da adição; Rec = recuperação; (-) indica que a recuperação do analito não foi avaliada na respectiva concentração adicionada

5.5. Aplicação do método analítico em amostras de guaraná produzidas na Bahia

O método proposto foi aplicado para a determinação de macro e microelementos nutrientes (K, Ca, Mg, P, S, Cu, Fe, Mn e Zn) em 72 amostras de sementes de guaraná produzidas em quatro diferentes municípios da região do Baixo Sul do estado da Bahia. Os valores determinados, expressos em média e intervalo de confiança ($n=3$), são apresentados na Tabela 20 para as amostras provenientes dos municípios de Nilo Peçanha e Valença, e nas Tabelas 21 e 22 para as amostras coletadas nos municípios de Taperoá e Camamu, respectivamente.

Para investigar possíveis relações entre as amostras e tendências de separação de grupos em função da concentração dos macro e micronutrientes analisados, foi aplicada a Análise de Componentes Principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*) para o estudo exploratório dos dados. Com o auxílio do software Statistica, foi gerada uma matriz de dados constituída por 72 amostras, correspondentes aos valores médios ($n = 3$) de concentração (mg kg^{-1}), e 9 variáveis (K, Ca, Mg, P, S, Cu, Fe, Mn e Zn). Os dados foram pré-processados efetuando-se o autoescalamento para que todas as variáveis apresentassem o mesmo peso, independentemente da magnitude da resposta (VIGNI, DURANTE e COCCHI, 2013). Os gráficos de pesos e escores gerados pelo software são mostrados nas figuras 13 e 14, respectivamente.

Tabela 20: Valores médios da concentração dos analitos nas amostras de guaraná provenientes dos municípios de Nilo Peçanha e Valença.

Amostra	Concentração \pm IC (mg kg ⁻¹)								
	Cu	Fe	Mn	Zn	Ca	K	Mg	P	S
NP-1 ^a	11,0 \pm 0,3	28,9 \pm 2,9	11,1 \pm 0,5	19,6 \pm 1,0	669 \pm 42	6961 \pm 138	902 \pm 32	1354 \pm 35	1129 \pm 71
NP-2 ^s	12,4 \pm 0,8	28,2 \pm 3,8	28,2 \pm 0,3	17,7 \pm 1,3	1569 \pm 221	7079 \pm 106	852 \pm 30	1193 \pm 72	1164 \pm 76
NP-3 ^a	12,5 \pm 0,4	32,6 \pm 1,9	19,5 \pm 0,4	16,9 \pm 0,8	918 \pm 62	6349 \pm 161	926 \pm 38	1293 \pm 74	1143 \pm 10
NP-4 ^s	13,8 \pm 0,9	36,0 \pm 2,7	15,8 \pm 0,8	18,4 \pm 0,9	2071 \pm 102	8304 \pm 124	993 \pm 36	1452 \pm 83	1219 \pm 87
NP-5 ^s	11,5 \pm 0,5	45,7 \pm 2,4	12,0 \pm 0,7	18,4 \pm 0,9	1201 \pm 198	7851 \pm 402	1062 \pm 13	1461 \pm 66	1129 \pm 37
NP-6 ^s	13,1 \pm 0,6	48,1 \pm 3,4	26,1 \pm 1,3	19,4 \pm 3,1	1085 \pm 35	7045 \pm 86	935 \pm 11	1262 \pm 120	1128 \pm 64
NP-7 ^s	11,7 \pm 0,7	45,9 \pm 3,2	22,1 \pm 0,4	14,5 \pm 1,9	644 \pm 66	5999 \pm 196	817 \pm 30	1441 \pm 50	1059 \pm 27
NP-8 ^s	10,7 \pm 0,5	44,2 \pm 2,3	12,6 \pm 0,3	19,3 \pm 1,5	1001 \pm 146	7699 \pm 395	997 \pm 51	1423 \pm 109	1112 \pm 62
NP-9 ^s	12,0 \pm 0,9	42,6 \pm 2,0	22,5 \pm 2,1	14,5 \pm 0,7	1137 \pm 196	6455 \pm 104	911 \pm 1	1343 \pm 77	1008 \pm 20
V-1 ^a	13,4 \pm 0,1	58,5 \pm 2,5	13,1 \pm 0,2	21,6 \pm 3,1	799 \pm 54	5975 \pm 43	854 \pm 11	1265 \pm 91	1008 \pm 92
V-2 ^a	12,4 \pm 0,1	51,1 \pm 2,8	16,2 \pm 0,7	19,9 \pm 1,3	564 \pm 26	7333 \pm 383	848 \pm 12	1222 \pm 21	1044 \pm 62
V-3 ^a	16,2 \pm 0,3	84,6 \pm 6,0	22,1 \pm 0,3	18,8 \pm 0,7	767 \pm 57	5247 \pm 265	927 \pm 24	1503 \pm 47	1206 \pm 52
V-4 ^a	11,7 \pm 1,2	53,3 \pm 5,5	12,0 \pm 0,4	20,9 \pm 1,0	545 \pm 35	6077 \pm 437	935 \pm 43	1632 \pm 89	1209 \pm 75
V-5 ^a	11,6 \pm 0,5	40,3 \pm 4,5	18,0 \pm 1,8	20,0 \pm 0,6	1354 \pm 114	7251 \pm 353	872 \pm 5	1391 \pm 141	1162 \pm 18
V-6 ^c	8,3 \pm 0,2	56,6 \pm 4,1	24,6 \pm 1,8	22,2 \pm 1,2	914 \pm 35	7593 \pm 448	879 \pm 38	1484 \pm 75	1298 \pm 136
V-7 ^c	11,8 \pm 0,5	60,6 \pm 3,1	17,9 \pm 1,3	25,8 \pm 2,0	1064 \pm 26	8257 \pm 372	1119 \pm 36	1905 \pm 39	1310 \pm 28
V-8e	12,4 \pm 0,5	63,6 \pm 2,2	14,0 \pm 1,0	20,7 \pm 2,1	1340 \pm 29	7124 \pm 84	819 \pm 35	1413 \pm 43	1222 \pm 33
V-9 ^a	10,2 \pm 0,2	45,4 \pm 4,1	17,6 \pm 0,7	20,0 \pm 1,7	958 \pm 53	6426 \pm 169	778 \pm 32	1258 \pm 69	1099 \pm 87
V-10 ^a	11,8 \pm 0,9	57,5 \pm 6,2	15,2 \pm 0,5	23,5 \pm 3,1	816 \pm 119	7303 \pm 346	895 \pm 65	1502 \pm 131	1268 \pm 62
V-11 ^a	11,3 \pm 0,7	44,0 \pm 2,4	13,8 \pm 0,3	25,0 \pm 0,9	733 \pm 125	7272 \pm 494	767 \pm 44	1563 \pm 51	1192 \pm 35
V-12 ^a	12,8 \pm 0,4	56,2 \pm 4,1	21,5 \pm 1,6	21,7 \pm 1,0	635 \pm 76	7558 \pm 456	925 \pm 44	1493 \pm 96	1273 \pm 97

NP = Nilo Peçanha/BA; V = Valença/BA; ^a secagem em agudá; ^s secagem ao sol; ^c secagem em estufa natural; IC = intervalo de confiança (n = 3).

Tabela 21: Valores médios da concentração dos analitos nas amostras de guaraná provenientes do município de Taperoá.

Amostra	Concentração \pm IC (mg kg ⁻¹)								
	Cu	Fe	Mn	Zn	Ca	K	Mg	P	S
T-1 ^e	11,5 \pm 1,1	60,3 \pm 4,3	15,4 \pm 0,8	20,3 \pm 0,8	970 \pm 64	7663 \pm 622	913 \pm 80	1465 \pm 45	1301 \pm 20
T-2 ^e	8,0 \pm 0,4	52,7 \pm 3,5	19,0 \pm 1,1	20,4 \pm 0,8	1551 \pm 84	6151 \pm 26	745 \pm 51	1193 \pm 63	1165 \pm 51
T-3 ^e	10,0 \pm 0,9	60,7 \pm 5,8	10,8 \pm 0,7	23,1 \pm 1,2	949 \pm 119	8141 \pm 115	921 \pm 37	1791 \pm 105	1334 \pm 68
T-4 ^e	8,9 \pm 0,5	52,1 \pm 2,3	18,3 \pm 0,9	19,7 \pm 1,3	1420 \pm 187	6015 \pm 299	763 \pm 19	1190 \pm 79	1172 \pm 114
T-5 ^e	10,8 \pm 1,1	76,7 \pm 3,7	13,2 \pm 0,1	26,5 \pm 2,6	1000 \pm 31	7726 \pm 362	913 \pm 6	1599 \pm 97	1365 \pm 70
T-6 ^e	8,0 \pm 0,1	462 \pm 29	18,6 \pm 0,8	18,9 \pm 1,2	1036 \pm 140	6207 \pm 223	789 \pm 62	1219 \pm 36	1229 \pm 57
T-7 ^e	12,4 \pm 1,4	57,3 \pm 5,0	29,7 \pm 2,9	23,1 \pm 1,5	807 \pm 62	6101 \pm 391	1163 \pm 58	1556 \pm 68	1316 \pm 30
T-8 ^e	11,6 \pm 0,6	25,9 \pm 2,4	9,0 \pm 0,6	23,3 \pm 1,9	664 \pm 36	8169 \pm 648	957 \pm 90	1765 \pm 109	1256 \pm 82
T-9 ^a	8,9 \pm 0,3	37,0 \pm 1,9	12,4 \pm 0,6	19,2 \pm 1,0	851 \pm 130	7399 \pm 232	898 \pm 2	1469 \pm 70	1227 \pm 24
T-10 ^s	15,5 \pm 0,3	33,8 \pm 2,1	18,2 \pm 0,8	18,8 \pm 0,9	794 \pm 56	8434 \pm 140	946 \pm 11	1269 \pm 58	1301 \pm 42
T-11 ^s	9,4 \pm 0,2	43,6 \pm 2,6	19,0 \pm 1,2	17,7 \pm 1,7	808 \pm 115	6365 \pm 527	755 \pm 55	1161 \pm 92	1223 \pm 100
T-12 ^s	9,4 \pm 0,5	69,7 \pm 4,3	8,1 \pm 0,4	21,2 \pm 0,6	739 \pm 45	6858 \pm 203	923 \pm 18	1540 \pm 59	1312 \pm 63
T-13 ^s	10,0 \pm 0,9	141 \pm 11	14,9 \pm 1,0	17,5 \pm 0,7	829 \pm 45	6796 \pm 317	837 \pm 30	1288 \pm 55	1300 \pm 90
T-14 ^s	9,5 \pm 0,5	65,1 \pm 2,0	14,1 \pm 0,5	17,8 \pm 0,8	778 \pm 78	6890 \pm 53	820 \pm 29	1162 \pm 70	1198 \pm 35
T-15 ^s	7,2 \pm 0,3	68,7 \pm 3,6	21,3 \pm 1,9	22,8 \pm 1,0	879 \pm 101	5663 \pm 78	897 \pm 27	1495 \pm 40	1150 \pm 39
T-16 ^s	11,7 \pm 0,8	98,8 \pm 9,3	18,6 \pm 1,3	20,9 \pm 2,9	776 \pm 73	7792 \pm 515	894 \pm 66	1456 \pm 88	1220 \pm 47
T-17 ^s	11,6 \pm 1,0	133 \pm 3	28,2 \pm 1,8	17,8 \pm 2,4	814 \pm 108	6279 \pm 15	842 \pm 39	1118 \pm 56	1190 \pm 92
T-18 ^s	13,2 \pm 0,2	62,0 \pm 4,2	15,3 \pm 0,7	23,9 \pm 1,8	1053 \pm 121	7752 \pm 125	1029 \pm 55	1760 \pm 139	1237 \pm 61
T-19 ^s	13,1 \pm 1,0	75,5 \pm 3,8	18,7 \pm 0,7	18,7 \pm 0,9	798 \pm 26	8184 \pm 302	956 \pm 26	1441 \pm 26	1294 \pm 72
T-20 ^s	10,2 \pm 0,8	34,9 \pm 4,0	32,5 \pm 2,4	16,2 \pm 1,5	739 \pm 34	7377 \pm 312	687 \pm 33	1249 \pm 25	1177 \pm 37
T-21 ^s	10,6 \pm 0,2	41,9 \pm 2,6	30,0 \pm 2,5	15,4 \pm 0,9	657 \pm 51	7277 \pm 98	763 \pm 16	1299 \pm 28	1150 \pm 22
T-22 ^s	10,0 \pm 0,3	38,7 \pm 2,5	6,9 \pm 0,4	21,5 \pm 0,9	1128 \pm 111	7203 \pm 132	653 \pm 40	1406 \pm 13	1117 \pm 79
T-23 ^s	10,4 \pm 0,3	43,3 \pm 3,9	6,5 \pm 0,5	22,1 \pm 1,6	2356 \pm 217	7861 \pm 610	699 \pm 60	1471 \pm 73	1213 \pm 76
T-24 ^s	10,4 \pm 0,9	35,2 \pm 2,4	26,5 \pm 0,7	14,8 \pm 0,8	1104 \pm 152	6447 \pm 195	564 \pm 16	1283 \pm 34	1150 \pm 33

T = Taperoá/BA; ^a secagem em aguidá; ^e secagem em estufa natural; ^s secagem ao sol; IC = intervalo de confiança (n=3)

Tabela 22: Valores médios da concentração dos analitos nas amostras de guaraná provenientes do município de Camamu

Amostra	Concentração ± IC (mg kg ⁻¹)								
	Cu	Fe	Mn	Zn	Ca	K	Mg	P	S
C-1 ^s	13,3 ± 0,8	80,2 ± 2,8	14,2 ± 0,3	21,0 ± 0,7	657 ± 69	7146 ± 231	870 ± 15	1385 ± 125	1272 ± 17
C-2 ^s	12,9 ± 0,4	46,4 ± 4,8	18,7 ± 0,7	21,3 ± 1,2	676 ± 61	7035 ± 446	909 ± 63	1421 ± 61	1247 ± 36
C-3 ^s	14,0 ± 0,8	48,1 ± 1,9	20,3 ± 0,9	19,7 ± 1,8	712 ± 28	7666 ± 90	812 ± 25	1283 ± 55	1227 ± 30
C-4 ^s	15,3 ± 0,8	82,0 ± 2,4	15,0 ± 1,6	20,6 ± 1,4	813 ± 94	6711 ± 519	970 ± 65	1423 ± 11	1303 ± 46
C-5 ^s	12,0 ± 0,4	42,1 ± 3,3	17,6 ± 1,0	18,3 ± 1,0	666 ± 90	6595 ± 320	811 ± 55	1262 ± 44	1179 ± 27
C-6 ^s	13,5 ± 0,4	63,8 ± 7,0	16,6 ± 0,2	20,5 ± 0,7	670 ± 104	5781 ± 80	822 ± 16	1445 ± 43	1184 ± 104
C-7 ^s	11,5 ± 1,0	214 ± 5	16,9 ± 0,7	22,6 ± 0,9	786 ± 97	6871 ± 261	913 ± 60	1277 ± 110	1157 ± 55
C-8 ^s	13,3 ± 0,2	92,8 ± 4,9	10,8 ± 0,2	19,5 ± 0,9	1097 ± 166	7116 ± 125	929 ± 14	1371 ± 100	1298 ± 13
C-9 ^s	12,1 ± 0,7	50,3 ± 3,2	12,3 ± 0,1	20,0 ± 2,4	761 ± 87	7492 ± 89	746 ± 73	1459 ± 27	1181 ± 105
C-10 ^a	14,4 ± 1,5	74,2 ± 4,4	13,0 ± 0,3	22,0 ± 1,5	424 ± 51	7482 ± 264	793 ± 17	1242 ± 61	1208 ± 50
C-11 ^s	12,9 ± 1,2	43,9 ± 2,0	14,5 ± 1,0	20,4 ± 1,3	811 ± 85	6549 ± 398	946 ± 79	1317 ± 52	1251 ± 82
C-12 ^s	12,7 ± 0,2	118 ± 7	16,5 ± 0,8	18,7 ± 2,0	625 ± 33	6687 ± 11	899 ± 9,5	1282 ± 26	1256 ± 24
C-13 ^s	11,6 ± 1,0	74,6 ± 2,0	13,6 ± 0,4	18,8 ± 2,5	810 ± 43	6814 ± 252	835 ± 48	1247 ± 86	1177 ± 39
C-14 ^s	14,5 ± 1,3	118 ± 12	18,0 ± 0,5	21,1 ± 1,6	788 ± 132	7630 ± 503	1039 ± 50	1450 ± 89	1262 ± 70
C-15 ^s	13,8 ± 0,2	89,6 ± 2,4	14,5 ± 0,9	19,8 ± 1,1	713 ± 120	6571 ± 191	934 ± 50	1203 ± 44	1220 ± 91
C-16 ^s	12,6 ± 0,2	121 ± 4	13,7 ± 0,3	16,3 ± 0,7	786 ± 63	7209 ± 153	917 ± 36	1366 ± 23	1298 ± 50
C-17 ^s	9,6 ± 0,8	49,5 ± 4,5	16,2 ± 0,3	14,0 ± 0,9	762 ± 96	6579 ± 116	852 ± 21	1195 ± 20	1218 ± 35
C-18 ^a	11,4 ± 0,6	55,8 ± 1,9	17,4 ± 0,5	19,3 ± 0,6	856 ± 30	7329 ± 273	867 ± 35	1367 ± 16	1233 ± 41
C-19 ^s	10,9 ± 0,2	101 ± 7	14,5 ± 0,8	18,7 ± 1,5	661 ± 62	6442 ± 566	873 ± 70	1219 ± 83	1281 ± 14
C-20 ^s	13,6 ± 0,5	77,6 ± 1,9	14,9 ± 0,6	20,1 ± 0,9	1482 ± 250	7779 ± 21	941 ± 17	1441 ± 36	1314 ± 60
C-21 ^s	9,8 ± 0,1	137 ± 3	13,3 ± 0,1	15,7 ± 0,6	2199 ± 242	7336 ± 249	751 ± 27	1289 ± 71	1226 ± 108
C-22 ^s	11,8 ± 0,4	27,1 ± 2,8	19,0 ± 0,1	17,4 ± 1,1	774 ± 44	6610 ± 463	885 ± 91	1284 ± 61	1248 ± 35
C-23 ^s	11,4 ± 0,3	91,9 ± 3,4	16,8 ± 0,4	16,3 ± 0,8	886 ± 65	7818 ± 53	912 ± 22	1344 ± 26	1312 ± 64
C-24 ^s	9,4 ± 0,7	36,5 ± 3,6	26,0 ± 0,7	13,7 ± 0,8	957 ± 95	6816 ± 126	771 ± 25	1328 ± 47	1174 ± 98
C-25 ^s	14,3 ± 0,1	201 ± 4	21,6 ± 0,4	21,0 ± 0,7	1015 ± 100	7012 ± 334	953 ± 26	1527 ± 12	1437 ± 10
C-26 ^a	12,5 ± 0,4	31,2 ± 2,0	17,3 ± 0,4	17,1 ± 1,4	820 ± 139	6687 ± 77	983 ± 16	1494 ± 71	1325 ± 74,3
C-27 ^e	12,6 ± 0,6	35,7 ± 2,1	16,6 ± 0,2	19,0 ± 0,7	814 ± 31	6677 ± 243	931 ± 23	1490 ± 42	1259 ± 26,6

C = Camamu/BA; ^s secagem ao sol; ^a secagem em aguidá; ^e secagem em estufa natural; IC = intervalo de confiança (n=3)

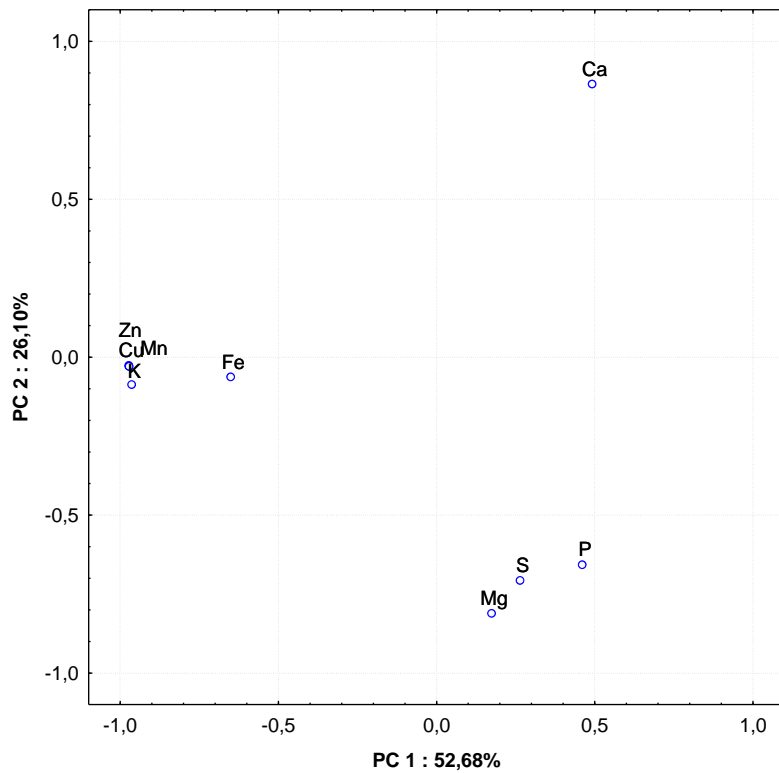


Figura 18: Gráfico de pesos PC1 x PC2 com as variáveis Mg, S, P, Ca, K, Cu, Mn, Fe e Zn.

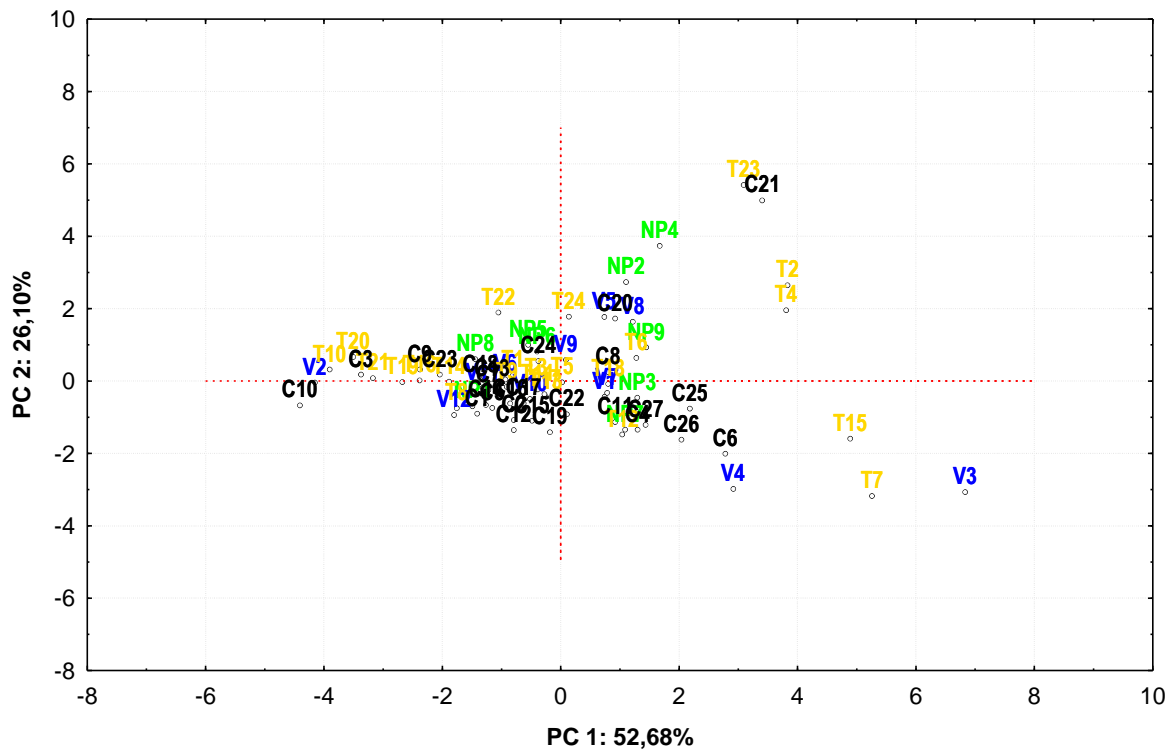


Figura 19: Gráfico de escores PC1 x PC2 das amostras de guaraná. Amostras de Taperoá, Valença, Camamu e Nilo Peçanha são mostradas nas cores amarela, azul, preto e verde, respectivamente.

O gráfico de pesos da Figura 18 mostra que as duas primeiras componentes principais explicam, respectivamente, 52,68 e 26,10 % da variância total, acumulando aproximadamente 78,8 % da informação. A PC3 explicou 10,07 % da variação total, mas os gráficos PC1 x PC3 não foram apresentados devido ao baixo poder de discriminação. Na primeira PC, as variáveis Ca, Mg, S e P apresentaram pesos positivos, separando-se das variáveis Cu, Fe, Mn, Zn e K, que apresentaram pesos negativos. Em PC2, a variável Ca foi separada com peso positivo das variáveis P, S e Mg, que apresentaram pesos negativos. Analisando-se o gráfico de escores da Figura 19, é possível observar uma tendência de separação de um pequeno grupo constituído pelas amostras T7, T15 e V3. Essas amostras foram separadas com pesos positivos em PC1 e negativos em PC2 em função da concentração de Mg, S e P. De acordo com informações dos produtores, a amostra V3 foi submetida a secagem em aguidá, enquanto que as amostras T7 e T15 passaram por processo de secagem em estufa e ao sol, respectivamente. Apesar de serem submetidas a procedimentos de secagem distintos, as amostras foram alocadas em um mesmo grupo. Outra tendência de formação de grupo pode ser observada entre as amostras NP2, NP4, T2, T4, T23 e C21, cuja separação ocorreu com pesos positivos em PC1 e PC2 em função da concentração de Ca.

Esses resultados sugerem que fatores como características do solo do município produtor ou procedimento de secagem na qual as sementes de guaraná são submetidas não causaram discriminação das amostras em função da concentração dos macro e microelementos nutrientes determinados. O fato de não ocorrer separação entre amostras de diferentes municípios já era esperada, tendo em vista que se tratam de municípios vizinhos e, conseqüentemente, apresentam características edafoclimáticas semelhantes. É possível que amostras de sementes de guaraná secas por diferentes procedimentos sejam separadas em função da concentração de constituintes orgânicos, principalmente catequina e epicatequina, que são compostos fenólicos voláteis. Entretanto, adotando os teores de K, Ca, Mg, S, P, Cu, Fe, Mn e Zn como marcadores, a tendência de separação de amostras também não foi observada.

5.5.1. Avaliação da concentração dos macro e microelementos nutrientes

De um modo geral, foram encontradas elevadas concentrações de K em todas as amostras analisadas, variando de $5247 \pm 265 \text{ mg kg}^{-1}$ para a amostra V-3 a $8434 \pm 140 \text{ mg kg}^{-1}$ para a amostra T-10. A concentração dos macronutrientes P e S foi bastante similar e se manteve praticamente constante nas amostras produzidas em todos os municípios, variando de 1161 a 1905 mg kg^{-1} e 1008 a 1437 mg kg^{-1} , respectivamente. Para os microelementos Cu e Zn, os valores determinados também não apresentaram grandes discrepâncias entre os municípios, variando de 7,2 a 15,5 mg kg^{-1} e 14,0 a 25,8 mg kg^{-1} , respectivamente. O mesmo comportamento foi observado para Mg, cuja variação foi de 564 a 1163 mg kg^{-1} . Por outro lado, foram encontradas discretas variações na concentração de Mn (6,5 – 32,5 mg kg^{-1}) e Ca (424 – 2356 mg kg^{-1}). Foi observada uma discrepância bastante pronunciada no teor de Fe, cuja variação foi de $28,2 \pm 3,8$ para a amostra NP-2 a $462 \pm 29 \text{ mg kg}^{-1}$ para a amostra T-6.

A faixa de concentração (valor mínimo e máximo) dos macro e microelementos nas amostras de guaraná coletadas em cada município é mostrada na Tabela 23.

Tabela 23: Faixa de concentração dos elementos nas amostras de guaraná coletadas em cada município e faixa geral de concentração.

Analito	Municípios produtores				Geral ^e (mg kg^{-1})
	Nilo Peçanha ^a (mg kg^{-1})	Valença ^b (mg kg^{-1})	Taperoá ^c (mg kg^{-1})	Camamu ^d (mg kg^{-1})	
Cu	11,0 - 13,8	8,3 - 16,2	7,2 - 15,5	9,4 - 15,3	7,2 - 16,2
Fe	28,2 - 48,1	40,3 - 84,6	25,9 – 462	27,1 – 214	25,9 – 462
Mn	11,1 - 28,2	13,1 - 24,6	6,5 - 32,5	12,3 - 26,0	6,5 - 32,5
Zn	14,5 - 19,6	18,8 - 25,8	14,8 - 26,5	13,7 - 22,6	13,7 - 26,5
Ca	644 - 2071	564 – 1354	657 – 2356	424 – 2199	424 – 2356
K	6349 - 7699	5247 – 8257	6015 – 8434	5781 – 7818	5247 – 8434
Mg	817 - 1062	767 – 1119	564 – 1163	746 – 1039	564 – 1163
P	1193 - 1461	1222-1905	1118 – 1760	1195 – 1494	1118 – 1905
S	1008 - 1219	1008 – 1310	1117 – 1365	1157 – 1437	1008 – 1437

^a (n=9); ^b (n=12); ^c (n=24); ^d (n=27); ^e faixa geral de concentração, considerando todas as amostras analisadas (n=72)

Analisando-se a Tabela 22, é possível observar que também existem algumas discretas variações na concentração de elementos como Mn, Ca e Mg em amostras de guaraná produzidas no mesmo município (Mn e Mg em Taperoá, e Ca em todos os municípios). Essas variações podem estar associadas às diferentes formas de processamento pós-colheita na qual as sementes são submetidas, uma vez que não há total padronização das etapas de processamento entre os diferentes produtores. Outro motivo pode ser a diversidade genética das plantas (guaranazeiro) cultivadas nas diferentes propriedades produtoras dentro do município.

As discrepâncias mais pronunciadas ocorreram com a concentração de Fe nas amostras coletadas em Camamu e, especialmente, em Taperoá. As amostras C-7 ($214 \pm 5 \text{ mg kg}^{-1}$), C-12 ($118 \pm 7 \text{ mg kg}^{-1}$), C-14 ($118 \pm 12 \text{ mg kg}^{-1}$), C-16 ($121 \pm 4 \text{ mg kg}^{-1}$), C-21 ($137 \pm 3 \text{ mg kg}^{-1}$) e C-25 ($201 \pm 4 \text{ mg kg}^{-1}$) se destacaram por apresentar teores relativamente elevados de Fe, em relação as demais sementes de guaraná produzidas no município de Camamu. De acordo com os produtores, todas essas sementes foram submetidas à secagem ao sol (Tabela 7). As amostras T-13 e T-17, ambas submetidas à secagem ao sol, segundo produtores, também apresentaram elevadas concentrações de Fe (141 ± 11 e $133 \pm 3 \text{ mg kg}^{-1}$, respectivamente) comparando-se com as outras amostras coletadas em Taperoá. A amostra T-6, cujo procedimento de secagem foi realizado em estufa natural, se destacou por apresentar o maior teor de Fe ($462 \pm 29 \text{ mg kg}^{-1}$) entre as 72 amostras analisadas. Segundo informações de produtores de guaraná e técnicos agrônômicos do território do Baixo Sul, algumas propriedades dessa região apresentam manchas de solo “cascalhento”, ricos em óxidos de ferro. É possível que as sementes contendo elevados teores de Fe sejam provenientes de guaranazeiros cultivados nessas localidades.

Um estudo com folhas de guaranazeiros (*Paullinia cupana* var. *Sorbilis*) foi realizado por Oliveira e Oliveira (2004). Neste trabalho, os autores avaliaram a concentração de macro e micronutrientes em dez amostras de folhas selecionadas aleatoriamente em um Sistema Agroflorestal, localizado no município de Manaus/AM. Os valores médios obtidos para Cu, Fe, Zn e P (23, 137, 41 e 1300 mg kg^{-1} , respectivamente) foram similares aos valores determinados no presente estudo com sementes de guaraná. A concentração média de Mn nas folhas analisadas foi de 160 mg kg^{-1} , correspondendo a um valor quase cinco vezes superior do que a maior concentração determinada nas sementes ($32,5 \pm 2,4 \text{ mg kg}^{-1}$). Elevados teores de Ca

(6000 mg kg⁻¹) e Mg (3600 mg kg⁻¹) também foram encontrados nas folhas. Para o macroelemento K, o valor médio determinado nas folhas (3000 mg kg⁻¹) foi inferior à concentração encontrada para as sementes no presente trabalho.

Após realizar um procedimento de decomposição em bloco digestor, Somera *et al* (2012) aplicaram um método de extração em ponto nuvem para a pré-concentração de Cu, visando sua determinação em amostras de guaraná em pó comercial por FAAS. Foram adquiridas duas amostras de marcas distintas no comércio de Londrina/PR, e os valores determinados para Cu foram $15,17 \pm 0,86$ e $13,54 \pm 0,92$ para as marcas A e B, respectivamente. Esses valores estão de acordo com os resultados obtidos para o elemento Cu no presente trabalho.

Em um estudo realizado em 2013, Leal *et al.* determinaram 28 elementos em algumas plantas de uso medicinal, incluindo sementes de guaraná (*Paullinia cupana*), adquiridas em estabelecimentos comerciais de Belo Horizonte/MG. A quantidade de amostras analisadas não foi informada pelos autores. Os elementos Ca, K, Mg, Fe, Mn, e Zn foram determinados empregando-se análise por ativação neutrônica (NAA-k₀). Os valores obtidos (em mg kg⁻¹) foram, respectivamente: 4890 ± 461 , 6446 ± 823 , 901 ± 50 , 230 ± 12 , 19 ± 1 e 21 ± 1 . Esses resultados corroboram com os valores obtidos neste trabalho, exceto para Ca, onde os autores encontraram uma concentração aproximadamente duas vezes superior, considerando o maior valor determinado no presente estudo (2356 ± 217 mg kg⁻¹).

Mais recentemente, Gois *et al.* (2016) determinaram Mn, Ni, Rb e Sr em amostras de guaraná em pó empregando espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em fonte contínua de alta resolução com amostragem direta de sólidos (SS-HR-CS ETAAS). Foi analisado um total de oito amostras de guaraná em pó comercial, adquiridas em mercados e feiras de Florianópolis/SC. O valor determinado para Mn variou de 14,1 a 37,8 mg kg⁻¹, sendo bastante similares com os resultados encontrados neste trabalho.

Um trabalho desenvolvido por Tfouni *et al* (2007), no qual foram analisadas 13 amostras de guaraná em pó adquiridas nos comércios de Campinas/SP e Ribeirão Preto/SP, mostrou que o consumo de 15 g de pó de guaraná (quantidade recomendada pela maioria dos fabricantes) pode contribuir com até 551 mg de cafeína, dependendo da marca do produto. Considerando os valores estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (WHO) e os resultados encontrados no presente trabalho para sementes de

guaraná, essa mesma porção pode contribuir com aproximadamente 8 e 5% da ingestão diária recomendada para os macroelementos essenciais K e Mg, respectivamente. Para essa comparação, a concentração média de cada elemento foi estimada, desconsiderando-se os valores que mais se distanciaram das demais determinações. A Tabela 24 mostra a contribuição de uma porção de 15 g de pó de guaraná (sementes finamente trituradas) para a % IDR de cada elemento nutriente determinado.

Tabela 24: Estimativa da porcentagem de contribuição para a IDR de Ca, Mg, K, P, Cu, Fe, Mn e Zn considerando o consumo de 15 g de uma amostra de guaraná (sementes trituradas)

Elemento	Concentração média^a (mg kg ⁻¹)	IDR (mg dia ⁻¹)	Contribuição IDR (%)
Ca	857	1000	0,12
Mg	880	260 ^b	5,0
K	7033	1300	8,0
P	1367	700	3,0
S	1218	Ni	-
Cu	12,0	0,9	19,5
Fe	47,0	19 ^b	1,9
Mn	17,0	2,3 ^b	11,0
Zn	20,0	7 ^b	4,3

^a concentração média estimada de cada elemento em amostras de sementes de guaraná, desconsiderando os valores com maior discrepância ($n \geq 50$); ^b valor máximo recomendado pela WHO; IDR = ingestão diária recomendada pela WHO; ni = não há informações

Esses dados indicam que as sementes de guaraná podem ser consideradas como boas fontes de elementos nutrientes essenciais ao organismo humano. A Tabela Brasileira de Composição de Alimentos da Unicamp (TACO) traz uma série de dados referentes à composição centesimal de alimentos diversos altamente consumidos pela população brasileira. Entretanto, não existem dados referentes à composição mineral de guaraná. Deste modo, os resultados obtidos neste trabalho podem contribuir para a inserção de mais um produto nessa tabela, trazendo informações relevantes acerca da concentração de macro e micronutrientes em amostras de sementes de guaraná.

6. CONCLUSÕES

A aplicação da metodologia de decomposição assistida por radiação micro-ondas empregando ácido nítrico diluído combinado com peróxido de hidrogênio mostrou-se bastante eficaz para o preparo de amostra de sementes de guaraná.

A utilização do planejamento de misturas com pseudocomponentes associada com a função desejabilidade permitiu estabelecer uma proporção ideal entre os componentes HNO_3 , H_2O_2 e H_2O que atendesse simultaneamente 10 respostas. A melhor condição experimental foi obtida por uma mistura ternária com adição de apenas 1,0 mL de HNO_3 9,0 mol L^{-1} , atendendo às recomendações da Química Verde. Essa condição conduziu a uma decomposição extremamente satisfatória, com teor de carbono residual inferior a 7% e acidez residual de aproximadamente 0,4 mol L^{-1} .

O método proposto apresentou elevada sensibilidade e precisão evidenciadas pelos baixos valores de LQ e RSD, respectivamente. Além disso, os valores encontrados na análise dos materiais de referência certificados NIST 1568b, NIST 1575a e NIST 3233 não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação aos valores certificados, demonstrando que o método também apresentou boa exatidão.

A partir da aplicação da Análise de Componentes Principais, foi possível concluir que não houve tendência de formação de grupos entre amostras de sementes de guaraná produzidas em diferentes municípios da região do Baixo Sul ou submetidas a diferentes procedimentos de secagem, em função dos elementos nutrientes estudados.

Apesar de ser bastante apreciado especialmente pelo alto teor de cafeína, foi demonstrado que o guaraná também é uma boa fonte de elementos essenciais ao organismo humano. Este trabalho apresenta resultados inéditos acerca da composição mineral de amostras de sementes de guaraná produzidas na região do Baixo Sul do estado da Bahia. A concentração de macroelementos determinada nas amostras apresentou a seguinte sequência (em ordem decrescente): $\text{K} > \text{P} > \text{S} > \text{Mg} > \text{Ca}$. Para os microelementos determinados, a seguinte sequência foi observada: $\text{Fe} > \text{Zn} > \text{Mn} > \text{Cu}$.

PERSPECTIVAS FUTURAS

- Apresentar os resultados deste trabalho na Associação de Produtores de guaraná do Baixo Sul da Bahia, no município de Taperoá/BA e também na Câmara Setorial do Guaraná da Mata Atlântica, no município de Nilo Peçanha/BA
- Desenvolver um procedimento eletroanalítico para a avaliação da capacidade antioxidante das amostras de guaraná produzidas na região do Baixo Sul do estado da Bahia
- Investigar as diferenças de composição mineral e da capacidade antioxidante das sementes de guaraná produzidas no território Baixo Sul da Bahia e em diferentes regiões geográficas do Brasil.
- Avaliar a influência do processamento pós-colheita na qualidade do guaraná produzido no sul da Bahia

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, J. P. L. Notas e comunicações: Tabela de composição de alimentos da Amazônia. **Acta Amazônica**, 26 (1996), 121-126.
- ALMEIDA, J. **Saberes e Fazeres: o guaraná de Maués**. São Paulo: Museu da Pessoa, 2007. 97p.
- ARAÚJO, G. C. L.; GONZALEZ, M. H.; FERREIRA, A. G.; NOGUEIRA, A. R. A.; NÓBREGA, J. A. Effect of acid concentration on closed vessels microwave-assisted digestion of plant materials. **Spectrochimica Acta Part B**, 57 (2002), 2121-2132.
- BARBOSA, J. T. P.; SANTOS, C. M. M.; PERALVA, V. N.; FLORES, E. M. M.; KORN, M.; NÓBREGA, J. A.; KORN, M. G. A. Microwave-assisted diluted acid digestion for trace element analysis of edible soybean products. **Food Chemistry**, 175 (2015), 212-217.
- BARIN, J. S.; BIZZI, C. A.; FLORES, E. M. M.; NÓBREGA, J. A.; KRUG, F. J. Decomposição de materiais orgânicos por via úmida. Em: KRUG, F. J.; ROCHA, F. R. P. (EdS). **Métodos de Preparo de Amostras para Análise Elementar**. São Paulo/SP: EditSBQ, 2016, p. 279-312
- BARNES, R. M.; SANTOS JÚNIOR, D.; KRUG, F. J. Introduction to sample preparation for trace element determination. In: FLORES, E. M. M (Ed.). **Microwave-assisted Sample Preparation for Trace Element Determination**. Amsterdam : Elsevier, 2014, p. 1-58.
- BARROS NETO, B.; SCARMÍNIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 2ª ed. Campinas: Editora da Unicamp, 2001. 412 p.
- BASILE, A.; FERRARA, L.; DEL PEZZO, M.; MELE, G.; SORBO, S.; BASSI, P.; MONTESANO, D. Antibacterial and antioxidante activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart. **Journal of Ethnopharmacology**, 102 (2005), 32-36.
- BENDICHO, C.; LAVILLA, I.; PENA-PEREIRA, F.; ROMERO, V. Green chemistry in analytical atomic spectrometry: a review. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 27 (2012), 1831-1857.
- BEZERRA, M. A.; CASTRO, J. T.; MACEDO, R. C.; DA SILVA, D. G. Use of constrained mixture design for optimization of method for determination of zinc and manganese in tea leaves employing slurry sampling. **Analytica Chimica Acta**, 670 (2010), 33-38.
- BEZERRA, M. A.; SANTELLI, R. E.; OLIVEIRA, E. P.; VILLAR, L. S.; ESCALEIRA, L. A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, 76 (2008), 965-977.

BEZERRA, M. A.; SOUZA, A. D. S.; OLIVEIRA, R. V.; OLIVEIRA, D. M.; CARDOSO, L. A. M.; SOUSA FILHO, H. R. Use of Doehlert and constrained mixture designs in the development of a photo-oxidation procedure using UV radiation/H₂O₂ for decomposition of landfill leachate samples and determination of metals by flame atomic absorption spectrometry. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 87 (2015), 3-13.

BITTENCOURT, L. S.; BORTOLIN, R. C.; KOLLING, E. A.; SCHNORR, C. E.; ZANOTTO-FILHO, A.; GELAIN, D. P.; MOREIRA, J. C. F. Antioxidant profile characterization of a commercial Paullinia cupana (guarana) extracts. **Journal of Natural Products and Resources**, 2 (2016), 47-52.

BIZZI, C. A. Emprego de oxigênio e peróxido de hidrogênio como auxiliares na decomposição de amostras biológicas por via úmida assistida por radiação micro-ondas. **Tese de Doutorado**, Universidade Estadual de Santa Maria, 2012, 164p.

BIZZI, C. A.; BARIN, J. S.; GARCIA, E. E.; NÓBREGA, J. A.; DRESSLER, V. L.; FLORES, E. M. M. Improvement of microwave-assisted digestion of milk powder with diluted nitric acid using oxygen as auxiliary reagent. **Spectrochimica Acta Part B**, 66 (2011a), 394-398.

BIZZI, C. A.; BARIN, J. S.; MULLER, E. I.; SCHMIDT, L.; NÓBREGA, J. A.; FLORES, E. M. M. Evaluation of oxygen pressurized microwave-assisted digestion of botanical materials using diluted nitric acid. **Talanta**, 83 (2011c), 1324-1328.

BIZZI, C. A.; FLORES, E. L. M.; NÓBREGA, J. A.; OLIVEIRA, J. S. S.; SCHMIDT, L.; MORTARI, S. R. Evaluation of a digestion procedure based on the use of diluted nitric acid solutions and H₂O₂ for the multielement determination of whole milk powder and bovine liver by ICP-based techniques. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 29 (2014), 332-338.

BIZZI, C. A.; FLORES, E. M. M.; BARIN, J. S.; GARCIA, E. E.; NÓBREGA, J. A. Understanding the process of microwave-assisted digestion combining diluted nitric acid and oxygen as auxiliary reagent. **Microchemical Journal**, 99 (2011b), 193-196.

BIZZI, C. A.; NÓBREGA, J. A.; BARIN, J. S. Diluted acids in microwave-assisted wet digestion. In: FLORES, E. M. M (Ed.). **Microwave-assisted Sample Preparation for Trace Element Determination**. Amsterdam : Elsevier, 2014, p. 179-204.

BOUMANS, P. W. J. M. Measuring detection limits in inductively coupled plasma emission spectrometry using the “SBR-RSDB approach” – I. A tutorial discussion of the theory. **Spectrochimica Acta Part B**, 46 (1991), 431-445.

BOUMANS, P. W. J. M.; IVALDI, J. C.; SLAVIN, W. Measuring detection limits in inductively coupled plasma emission spectrometry – II. Experimental data and their interpretation. **Spectrochimica Acta Part B**, 46 (1991), 641-665.

BRESSY, F. C.; BRITO, G. B.; BARBOSA, I. S.; TEIXEIRA, L. S. G.; KORN, M. G. A. Determination of trace element concentrations in tomato samples at different stages of maturation by ICP OES and ICP-MS following microwave-assisted digestion. **Microchemical Journal**, 109 (2013), 145-149.

CALADO, V.; MONTGOMERY, D. C. **Planejamento de experimentos usando o Statistica**. Rio de Janeiro: E-papers, 2003. 260 p.

CANDIOTI, L. V.; DE ZAN, M. M.; CÁMARA, M. S.; GOICOECHEA, C. Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. **Talanta**, 124 (2014), 123-138.

CASTRO, J. T.; BEZERRA, M. A.; LIMA NETO, M. A.; KORN, M. G. A.; NOVAES, C. G.; SANTELLI, R. E. Use of constrained mixture design to optimize a procedure for closed vessel microwave-assisted digestion of vegetal leaves. **Current Microwave Chemistry**, 4 (2017) 000-000.

CASTRO, J. T.; SANTOS, E. C.; SANTOS, W. P. C.; COSTA, L. M.; KORN, M.; NÓBREGA, J. A.; KORN, M. G. A. A critical evaluation of digestion procedures for coffee samples using diluted nitric acid in closed vessels for inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Talanta**, 78 (2009), 1378-1382.

CINDRIC, I. J.; ZEINER, M.; KRPETIC, M.; STINGEDER, G. ICP-AES determination of minor and major elements in Cornelian cherry (*Cornus mas* L.) after microwave assisted digestion. **Microchemical Journal**, 105 (2012a), 72-76.

CINDRIC, I. J.; KRIZMAN, I.; ZEINER, M.; KAMPIC, S.; MEDUNIC, G. S. ICP-AES determination of minor and major elements in apples after microwave-assisted digestion. **Food Chemistry**, 135 (2012b), 2675-2680.

Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. Guaraná. Conjuntura mensal. Janeiro (2017). Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_02_13_15_29_28_castanha_de_caju_janeiro_2017.pdf> Acesso em 16 de janeiro de 2017.

Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Formulário: guaraná, 2007.

Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Guaraná. Conjuntura mensal. Maio (2013). Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_06_12_16_16_04_guarana_mai2013.pdf> Acesso em 08 de setembro de 2016.

CORNELL, J. A. **Experiments with Mixtures: Designs, Models and the Analysis of Mixture Data**. 3rd ed. New York: John Wiley & Sons, 2002. 674 p.

COSTA, S. S. L. PEREIRA, A. C. L.; PASSOS, E. A.; ALVES, J. P. H.; GARCIA, C. A. B.; ARAÚJO, R. G. O. Multivariate optimization of an analytical method for the analysis of dog and cat foods by ICP OES. **Talanta**, 108 (2013), 157-164.

DA SILVA, S. V.; MATTANNA, P.; BIZZI, C. A.; RICHARDS, N. S. P. S.; BARIN, J. S. Evaluation of the mineral composition of infant formulas consumed in Brazil. **Journal of Dairy Science**, 96 (2013), 3498-3505.

- DENNAUD, J.; HOWES, A.; POUSSEL, E.; MERMET, J. Study of ionic-to-atomic line intensity ratios for two axial viewing-based inductively coupled plasma atomic emission spectrometers. **Spectrochimica Acta Part B**, 56 (2001), 101-112.
- DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous optimization of several response variables. **Journal of Quality Technology**, 12 (1980), 214-219.
- DUCKE, A. Diversidade dos guaranás. **Rodriguésia**, 10 (1937), 155-159.
- DUGO, G.; DI BELLA, G.; RANDO, R.; SAITTA, M. Sample preparation for the determination of metals in food samples. In: PAWLISZYN, J. (ed). **Comprehensive sampling and sample preparation**. Vol 4. Amsterdam: Elsevier, 2012, p. 495-519.
- Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola – EBDA. Câmara Setorial do Guaraná da Bahia. Taperoá/BA, 2013.
- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA. Amazônia Ocidental. **Cultura do guaranazeiro no Amazonas. 4ª edição**. Manaus, 2005. 44p.
- FECHER, P. A.; SCHLEMMER, G. C.; SCHOEBERL, K. S. Safety aspects, quality control and quality assurance using microwave-assisted sample preparation systems. In: FLORES, E. M. M (Ed.). **Microwave-assisted Sample Preparation for Trace Element Determination**. Amsterdam : Elsevier, 2014, p. 345-384.
- FERREIRA, M. M. C. **Quimiometria - Conceitos, Métodos e Aplicações**. Campinas: Editora da Unicamp, 2015, 496 p.
- FERREIRA, S. L. C. **Introdução às Técnicas de Planejamento de Experimentos**. Salvador: Vento Leste, 2015. 190 p.
- FLORES, E. M. M.; FLORES, E. L. M.; PANIZ, J. N. G.; BARIN, J. S.; MESKO, M. F.; KRUG, F. J. Decomposição de materiais orgânicos por combustão. Em: KRUG, F. J.; ROCHA, F. R. P. (EdS). **Métodos de Preparo de Amostras para Análise Elementar**. São Paulo/SP: EditSBQ, 2016, p. 387-472
- Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO. World Health Organization – WHO. **Vitamin and mineral requirements in human nutrition**. 2nd ed. Geneva, 2004. 362 p.
- GHANJAOU, M. E.; CERVERA, M. L.; EL RHAZI, M.; DE LA GUARDIA, M. Validated fast procedure for trace element determination in basil powder. **Food Chemistry**, 125 (2011), 1309-1313.
- GOIS, J. S.; ALMEIDA, T. S.; ANDRADE, R. M.; TOALDO, I. M.; BORDIGNON-LUIZ, M. T.; BORGES, D. L. G. Direct solid analysis for the determination of Mn, Ni, Rb and Sr in powdered stimulant plants using high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry followed by chemometric classification based on elemental composition, polyphenol content and antioxidant activity. **Microchemical Journal**, 124 (2016), 283-289.

GONÇALVES, J. R. C. **A cultura do guaraná**. Vol 2. Belém: Gráfica Falangola, 1971, 24p.

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

HENMAN, A. R. Guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbillis*): ecological and social perspectives on an economic plant of the Central Amazon basin. **Journal of Ethnopharmacology**, 6 (1982), 311-338.

HOENIG, M.; BAETEN, H.; VANHENTENRIJK, E.; VASSILEVA, E.; QUEVAUVILLER, P. Critical discussion on the need for an efficient mineralization procedure for the analysis of plant material by atomic spectrometric methods. **Analytica Chimica Acta**, 358 (1998), 85-94.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Sistema de Recuperação Automática – SIDRA. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola, 2016. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/prevsaf/>> Acesso em 09 de setembro de 2016.

IUPAC, Analytical Chemistry Division. Commission on Spectrochemical and Optical Procedures for Analysis. Nomenclature, symbols, units and their usage in spectrochemical analysis-II. Data interpretation. **Spectrochimica Acta Part B**, 33 (1978), 242-245.

IUPAC, Analytical, Applied, Clinical, Inorganic and Physical Chemistry Divisions. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. Technical Report. **Pure and Applied Chemistry**, 74 (2002), 835-855.

KEBBEKUS, B. B. Preparation of samples for metals analysis. In: MITRA, S. **Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2003, p. 227-264.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; MELLO, J. C. P. Development of an analytical method using reversed-phase HPLC-PDA for a semipurified extract of *Paullinia cupana* var. *sorbillis* (guaraná). **Talanta**, 88 (2012), 502-506.

KNAPP, G.; MAICHIN, B.; BAUMGARTNER, U. Interferences in ICP OES by organic residue after microwave-assisted sample digestion. **Atomic Spectroscopy**, 19 (1998), 220-222.

KOHLMEIER, M. **Handbook of Nutrients: Nutrient Metabolism – Structure, Functions and Genes**. 2nd ed. Londres: Academic Press, 2015. 870 p.

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

KURI, C. M. B. The guaraná industry in Brazil. **International Business & Economics Research Journal**, 7 (2008), 87-98.

KUSKOSKI, E. M.; ROSEANE, F.; GARCIA, A. A.; TRONCOSO, G. A. M. Propiedades químicas y farmacológicas del fruto guaraná (*Paullinia cupana*). **Revista de la Facultad de Química Farmacéutica**, 12 (2005), 45-52.

LEAL, A. S.; PRADO, G.; GOMES, T. C. B.; SEPE, F. P.; DAMÁZIO, I. Determination of metals in medicinal plants highly consumed in Brazil. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 49 (2013), 599-607.

LEARDI, R. Experimental design in chemistry: a tutorial. **Analytica Chimica Acta**, 652 (2009), 161-172.

LEME, A. B. P.; BIANCHI, S. R.; CARNEIRO, R. L.; NOGUEIRA, A. R. A. Optimization of Sample Preparation in the Determination of Minerals and Trace Elements in Honey by ICP-MS. **Food Analytical Methods**, 7 (2014), 1009-1015.

LOW, K. H.; ZAIN, S. M.; ABAS, M. R. Evaluation of metal concentrations in red tilapia (*Oreochromis spp*) from three sampling sites in Jebebu, Malaysia using principal component analysis. **Food Analytical Methods**, 4 (2011), 276-285.

MAJHENIC, L.; SKERGET, M.; KNEZ, Z. Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. **Food Chemistry**, 104 (2007), 1258-1268.

MARTINS, C. A.; CERVEIRA, C.; SCHEFFLER, G. L.; POZEBON, D. Metal determination in tea, wheat and wheat flour using diluted nitric acid, high-efficiency nebulizer and axially viewed ICP OES. **Food Analytical Methods**, 8 (2015), 1652-1660.

MATTEI, R.; DIAS, R. F.; ESPÍNOLA, E. B.; CARLINI, E. A.; BARROS, S. B. M. Guarana (*Paullinia cupana*): toxic behavioral effects in laboratory animals and antioxidant activity in vitro. **Journal of Ethnopharmacology**, 60 (1998), 111-116.

McDOWELL, L. R. **Minerals in Animal and Human Nutrition**. Amsterdam: Elsevier, 2003. 632 p.

MEIRA, L. A.; DIAS, F. S. Application of constrained mixture design and Doehlert matrix in the optimization of dispersive liquid-liquid microextraction assisted by ultrasound for preconcentration and determination of cadmium in sediment and water samples by FAAS. **Microchemical Journal**, 130 (2017), 56-63.

MELLO, P. A.; BARIN, J. S.; GUARNIERI, R. A. Microwave heating. In: FLORES, E. M. M (Ed.). **Microwave-assisted Sample Preparation for Trace Element Determination**. Amsterdam : Elsevier, 2014, p. 77-98. .

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Sistema Integrado de Legislação. Portaria 70 (19 de março de 1982). Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=305705907>> Acesso em 19 de agosto de 2016.

MOFFET, J.; RUSSELL, G.; LENER, J. P. Evaluation of a novel nebulizer using an inductively coupled plasma optical emission spectrometer. **Application Note**, Agilent Technologies (2011) 1-5.

MONTGOMERY, D. C. **Design and Analysis of Experiments**. 5th ed. New York: John Wiley & Sons, 2001. 684 p.

MORAES, D. P.; BIZZI, C. A.; NÓBREGA, J. A.; FLORES, E. M. M.; NOGUEIRA, A. R. A.; BARIN, J. S.; MESKO, M. F. Preparo de amostras assistido por radiação micro-ondas. Em: KRUG, F. J.; ROCHA, F. R. P. (EdS). **Métodos de Preparo de Amostras para Análise Elementar**. São Paulo/SP: EditSBQ, 2016, p. 315-383

MULLER, A. L. H.; MULLER, E. I.; BARIN, J. S.; FLORES, E. M. M. Microwave-assisted digestion using diluted acids for toxic element determination in medicinal plants by ICP-MS in compliance with United States pharmacopeia requirements. **Analytical Methods**, 7 (2015), 5218-5225.

MULLER, E. I.; MESKO, M. F.; MORAES, D. P.; KORN, M. G. A.; FLORES, E. M. M.; Wet digestion using microwave heating. In: FLORES, E. M. M (Ed.). **Microwave-assisted Sample Preparation for Trace Element Determination**. Amsterdam : Elsevier, 2014, p. 99-142.

MYERS, R. H.; MONTGOMERY, D. C.; ANDERSON-COOK, C. M. **Response Surface Methodology: Process and product optimization using designed experiments**. 3rd ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2009. 680 p.

NAOZUKA, J.; VIEIRA, E. C.; NASCIMENTO, A. N.; OLIVEIRA, P. V. Elemental analysis of nuts and seeds by axially viewed ICP OES. **Food Chemistry**, 124 (2011), 1667-1672.

NASCIMENTO, A.; MOTA, C.; COELHO, I.; GUEIFÃO, S.; SANTOS, M.; MATOS, A.; GIMENEZ, A.; LOBO, M.; SAMMAN, N.; CASTANHEIRA, I. Characterisation of nutrient profile of quinoa (*Chenopodium quinoa*), amaranth (*Amaranthus caudatus*), and purple corn (*Zea mays* L.) consumed in the North of Argentina: Proximates, minerals and trace elements. **Food Chemistry**, 148 (2014), 420-426.

NÓBREGA, J. A.; DONATI, G. L. Microwave-assisted sample preparation for spectrochemistry. In: MEYERS, R. A. (Ed.). **Encyclopedia of Analytical Chemistry**. Nova Jersey: John Wiley & Sons, 2011, p. 16504.

NÓBREGA, J. A.; PIROLA, C.; FIALHO, L. L.; ROTA, G.; JORDÃO, C. E. K. M. A. C. POLLO, F. Microwave-assisted digestion of organic samples: how simple can it become? **Talanta**, 98 (2012), 272-276.

NOVAES, C. G.; BEZERRA, M. A.; DA SILVA, E. G. P.; SANTOS, A. M. P.; ROMÃO, I. L. S.; SANTOS NETO, J. H. A review of multivariate designs applied to the optimization of methods based on inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES). **Microchemical Journal** (2016), doi: 10.1016/j.microc.2016.05.015

OJEDA, C. B.; ROJAS, F. S. Sample dissolution for elemental analysis – microwave digestion. In: REEDIJK, J. (ed). **Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering**. Amsterdam: Elsevier, 2014, p. 1-14.

OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A. Associação micorrízica e teores de nutrientes nas folhas de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) e guaranazeiro (*Paullinia cupana*) de um sistema agroflorestal em Manaus, Amazonas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 28 (2004), 1063-1068.

OLIVEIRA, E. Sample preparation for atomic spectroscopy: evolution and future trends. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 14 (2003), 174-182.

PEIXOTO, R. R. A.; OLIVEIRA, A.; CADORE, S. Multielemental determinations in chocolate drink powder using multivariate optimization and ICP OES. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 60 (2012), 8117-8122.

PEREIRA FILHO, E. R. **Planejamento Fatorial em Química**. São Carlos: EdUfscar, 2015. 88 p.

PEREIRA JR., J. B.; DANTAS, K. G. F. Evaluation of inorganics elements in cat's claw teas using ICP OES and GFAAS. **Food Chemistry**, 196 (2016), 331-337.

PHAN-TIEN, K.; WRIGTH, G. C.; LEE, N. A. Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) and -optical emission spectroscopy (ICP-OES) for determination of essential minerals in closed acid digestates of peanuts (*Arachis hypogaea* L.). **Food Chemistry**, 134 (2012), 453-460.

Plano Territorial de Desenvolvimento Sustentável – PTDS. **Território do Baixo Sul**. Bahia, 2010. 136p.

ROCHA, F. R. P.; NÓBREGA, J. A.; KAMOGAWA, M. Y. Fundamentos de preparo de amostras. Em: KRUG, F. J.; ROCHA, F. R. P. (EdS). **Métodos de Preparo de Amostras para Análise Elementar**. São Paulo/SP: EditSBQ, 2016, p. 35-54

SANTOS, J. OLIVA-TELES, M. T.; DELERUE-MATOS, C.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; Multi-elemental analysis of ready-to-eat “baby leaf” vegetables using microwave digestion and high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry. **Food Chemistry**, 151 (2014), 311-316.

SANTOS, L.; SANTOS, Q. O.; MORENO, I.; NOVAES, C. G.; SANTOS, M. J. S.; BEZERRA, M. A. Multivariate optimization of a simultaneous cloud point extraction procedure of Cd, Cu and Ni from sediments samples and determination by ICP OES. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 27 (2016), 745-752.

SANTOS, W. P. L.; SANTOS, D. C. M. B.; FERNANDES, A. P.; CASTRO, J. T.; KORN, M. G. A. Geographical Characterization of Beans Based on Trace Elements After Microwave-Assisted Digestion Using Diluted Nitric Acid. **Food Analytical Methods**, 6 (2013), 1133-1143.

SCHIMPL, F. C.; DA SILVA, J. F.; GONÇALVES, J. F. C.; MAZZAFERA, P. Review. Guarana: revisiting a highly caffeinated plant from the Amazon. **Journal of Ethnopharmacology**, 150 (2013), 14-31.

SILVA, F. V.; TREVIZAN, L. C.; SILVA, C. S.; NOGUEIRA, A. R. A.; NÓBREGA, J. A. Evaluation of inductively coupled plasma optical emission spectrometers with axially and radially viewed configurations. **Spectrochimica Acta Part B**, 57 (2002), 1905-1913.

SIQUEIRA, J. S.; PEREIRA JR., J. B.; LEMOS, M. S.; DANTAS FILHO, H. A.; DANTAS, K. G. F. Optimization of a digestion method using diluted acid in bee pollen samples for determination of Fe, Mn and Zn by flame atomic absorption spectrometry. **Food Analytical Methods** (2016). DOI: 10.1007/s12161-016-0625-0

SOMERA, B. F.; OLIVEIRA, F. M.; BARRETO, W. J.; BARRETO, S. R. G.; TARLEY, C. R. T. Extração/pré-concentração de íons cobre no ponto nuvem explorando a formação de complexos com DMIT [4,5-dimercapto-1,3-ditiol-2-tionato]. **Química Nova**, 35 (2012), 1600-1605.

SOUZA, S. N. P.; NASCENTES, C. C.; COSTA, L. M. Validation of a microwave assisted digestion procedure of pâté samples using diluted HNO₃ for Fe and Zn determination by FS FAAS. **Analytical Methods**, 5 (2013), 6411-6415.

STAT-EASE. **Handbook for Experimenters**. Version 6.8. Stat-Ease, Inc. Minneapolis, 2005. 90p. Disponível em: <http://www.statease.com/pubs/handbk_for_exp_v06.8.pdf> Acesso em 27 de dezembro de 2016.

Superintendência da Zona Franca de Manaus – SUFRAMA. **Potencialidades regionais – estudo de viabilidade econômica: guaraná**. Manaus, 2003. 18p.

Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO. 4^a ed. Campinas/SP: NEPA-Unicamp, 2011. 164p.

TARANTINO, T. B.; BARBOSA, I. S.; LIMA, D. C.; PEREIRA, M. G.; TEIXEIRA, L. S. G.; KORN, M. G. A. Microwave-assisted digestion using diluted nitric acid for multielement determination in rice by ICP OES and ICP-MS. **Food Analytical Methods** (2016). doi: 10.1007/s12161-016-0658-4

TFOUNI, S. A. V.; CAMARGO, M. C. R.; VITORINO, S. H. P.; MENEGÁRIO, T. F.; TOLEDO, M. C. F. Contribuição do guaraná em pó (*Paullinia cupana*) como fonte de cafeína na dieta. **Revista de Nutrição Campinas**, 20 (2007), 63-68.

THOMPSON, M.; BARNES, R. M. Analytical performance of inductively coupled plasma – atomic emission spectrometry. In: MONTASER, A.; GOLIGHTLY, D. W. **Inductively Coupled Plasmas in Analytical Atomic Spectrometry**. 2nd ed. New York: VCH Publishers, 1992, p. 249-297.

VIGNI, M. L.; DURANTE, C.; COCCHI, M. Exploratory data analysis. In: MARINI, F. (ed.). **Chemometrics in Food Chemistry**. Amsterdam: Elsevier, 2014, p. 55-126

VILLA, J. E. L.; PEIXOTO, R. R. A.; CADORE, S. Cadmium and lead in chocolates commercialized in Brazil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 62 (2014), 8759-8763.

WECKERLE, C. S.; STUTZ, M. A.; BAUMANN, T. W. Purine alkaloids in *Paullinia*. **Phytochemistry**, 64 (2003), 735-742.

WEI, Y. H.; ZHANG, J. Y.; ZHANG, D. W.; LUO, L. G.; TU, T. H. Simultaneous determination of Se, trace elements and major elements in Se-rich rice by dynamic reaction cell inductively coupled mass spectrometry (DRC-ICP-MS) after microwave digestion. **Food Chemistry**, 159 (2014), 507-511.

World Health Organization – WHO. Trace elements in human nutrition and health. Geneva, 1996. 360 p.

ZANARIAH, C. W.; NGAH, C. W.; YAHYA, M. A. Optimization of digestion method for determination of arsenic in shrimp paste sample using atomic absorption spectrometry. **Food Chemistry**, 134 (2012), 2406-2410.