



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**



**LUANA SANTOS MOREIRA**

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA DE PREPARO DE AMOSTRA PARA  
DETERMINAÇÃO DE Cu, Fe e Mn EM CASTANHA DE CAJU  
(*Anacardium occidentale* L.) POR ICP OES**

**ILHÉUS**  
**2016**

**LUANA SANTOS MOREIRA**

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA DE PREPARO DE AMOSTRA PARA  
DETERMINAÇÃO DE Cu, Fe e Mn EM CASTANHA DE CAJU  
(*Anacardium occidentale* L.) POR ICP OES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química. Área de concentração: Química Analítica Aplicada. Linha de pesquisa: Desenvolvimento de Métodos Analíticos

**Orientador: Prof. Dr. Erik Galvão Paranhos da Silva**  
**Co-orientador: Prof. Dr. Fábio Alan Carqueija Amorim**

**ILHÉUS**

**2016**

M838

Moreira, Luana Santos.

Desenvolvimento de metodologia de preparo de amostra para determinação de Cu, Fe e Mn em castanha de caju (*Anacardium occidentale* L.) por ICP OES / Luana Santos Moreira. – Ilhéus, BA: UESC, 2016.

66f. ; Il.

Orientador: Erik Galvão Paranhos da Silva.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui referências.

1. Metais – Análise. 2. Castanha-de-caju – Efeito dos metais pesados. 3. Análise multivariada. 4. Espectrômetros ópticos. I. Título.

CDD 543.081

LUANA SANTOS MOREIRA

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA DE PREPARO DE  
AMOSTRA PARA DETERMINAÇÃO DE Cu, Fe E Mn EM  
CASTANHA DE CAJU (*Anacardium occidentale L.*) POR ICP  
OES**

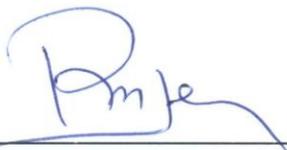
Ilhéus-BA, 29 de julho de 2016.

COMISSÃO EXAMINADORA:



---

Prof(a). Dr. Erik Galvão Paranhos da Silva  
Doutor em Química Alítica (UFBA)  
Universidade Estadual de Santa Cruz  
Orientador



---

Prof(a). Dr. Rildo Mota de Jesus (UESC)  
Doutor em Química Analítica (UFBA)  
Universidade Estadual de Santa Cruz



---

Prof(a). Dr. Anderson Santos Souza (UFBA)  
Doutor em Química (UFBA)  
Universidade Federal da Bahia

*Dedico esta dissertação a minha Mãe Elvira, por ser meu exemplo de vida e minha principal incentivadora, e aos meus irmãos Sara e Gabriel, por estarem sempre ao meu lado e por acreditarem junto comigo neste sonho.*

*Tenha bom ânimo e coragem: você vencerá todas as dificuldades!*

*A vida apresenta problemas difíceis, mas dificuldade superada é problema resolvido.*

*Jamais desanime: você há de vencer galhardamente todos os problemas que apareçam. Se o problema for complexo, divida-o em partes, e vença cada uma delas separadamente. Mas não desanime jamais!*

*Uma boa palavra, um sorriso, um incentivo, um pensamento construtor são, muitas vezes, o ponto de partida para grandes vitórias. Se observar tristeza ou preocupação, procure ajudar. Se não puder agir, fale. Se não puder falar, ao menos pense firmemente desejando a felicidade e estará atingindo o seu objetivo.*

*Autoria Desconhecida*

## AGRADECIMENTOS

A **DEUS**, que em Sua infinita bondade me concedeu a graça de concluir essa importante etapa em minha vida.

Aos meus pais **Elvira** e **Janio**, irmãos **Sara** e **Gabriel** e minha avó **Almerinda** por todo amor e dedicação, por todas as orações, palavras de incentivo e por acreditarem que sou capaz. Vocês sempre serão meu porto seguro. Amo vocês família!

Ao **Prof. Dr. Erik Galvão Paranhos da Silva**, por ter me dado a oportunidade de ingressar na pesquisa acadêmica e por todo apoio que até aqui foi dispensado a mim. Agradeço a orientação, paciência, confiança na minha capacidade em realizar os trabalhos durante esses anos de parceria (IC, TCC e mestrado) e, sobretudo, sua valiosa amizade.

Ao **Prof. Dr. Raildo Mota de Jesus**, por todos os preciosos momentos de ajuda para que este trabalho viesse a ser desenvolvido. Agradeço o suporte, paciência e constante disponibilidade. Obrigada por todas as conversas, conselhos e por ter sido além de professor, um amigo que sempre pude contar.

À **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luana Novaes Santos**, pelos bons momentos e por todo apoio e disponibilidade para que este trabalho fosse finalizado, além disso, agradeço a avaliação, colaboração e participação durante o Exame de Qualificação.

Ao **Prof. Dr. Ivon Pinheiro Lôbo**, por todas as sugestões dadas durante o desenvolvimento dos meus trabalhos de pesquisa e pelos valiosos ensinamentos passados durante a minha formação acadêmica. Também agradeço a avaliação, colaboração e participação durante o Exame de Qualificação.

Ao **Prof. Dr. Fábio Alan Carqueija Amorim**, pelo aceite da co-orientação e ensinamentos passados durante a minha formação acadêmica.

Ao **Prof. Dr. Sérgio Luís Costa Ferreira**, que por duas vezes me concedeu a oportunidade de realizar uma parte dos experimentos em seu laboratório de pesquisa na Universidade Federal da Bahia (UFBA).

À **Danilo Junqueira Leão**, por todo suporte, ensinamentos com a técnica de Fluorescência, discussões e principalmente por ter me acompanhado durante o desenvolvimento do trabalho na UFBA.

Aos integrantes e ex-integrantes do Grupo de Pesquisas em Química Analítica do Sul da Bahia, e aos amigos de laboratório, **Madson, Herick, Clissiane, Givaldo, Bruna, Milana, André, Luiz Henrique, José Lucas e Mayara Fernandes**, por todo conhecimento compartilhado, companheirismo e por todos os bons momentos de descontração. Em especial, quero agradecer a **Herick, Clissiane, Bruna e Madson** pela imprescindível ajuda e socorro nos momentos mais difíceis. Sem vocês a meu lado, eu não teria conseguido cumprir essa missão no tempo que me foi determinado. Muito obrigada!

Ao Grupo de Pesquisa em Química e Quimiometria (UFBA), por ter me acolhido tão bem durante o período de realização do trabalho e por todo conhecimento compartilhado.

À minha amiga **Marina**, por todas as risadas, conversas, apoio e por todas as palavras de incentivo nos momentos em que mais precisei. Obrigada pela imensa ajuda colega!

Aos amigos de graduação, **Pablo, Ívero, Sayonara, Juliana e Wellington** pelo apoio, torcida e bons momentos.

À república em Itabuna, **Clissiane, Glêydison, Analú, Tatielle, Mayara Costa, Pedro e Marcos**, por terem me recebido tão bem e por terem contribuído para que esses dois últimos meses fossem mais felizes, apesar de todas as adversidades.

À Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), por ter me proporcionado toda a base da minha formação acadêmica. Sinto-me honrada em ter feito parte dessa instituição. Obrigada a todos os professores do Departamento de Ciências Exatas e Tecnológicas pelos ensinamentos passados e convivência durante todo o período da graduação e mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), pela bolsa de estudo concedida.

E a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para que esse momento se tornasse realidade.

**Muito obrigada!!!**

## RESUMO

Neste trabalho, foi desenvolvido um método de preparo de amostra para a determinação de cobre, ferro e manganês em castanhas de caju empregando a espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES). Planejamento de mistura Simplex-Centróide com restrição foi aplicado para otimizar o preparo da amostra por digestão em forno micro-ondas, com a finalidade de avaliar a melhor proporção entre os reagentes HNO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O. O programa de aquecimento do micro-ondas foi realizado em quatro etapas (temperatura/°C; rampa/min.; tempo/min.): 1 (120; 10; 10); 2 (150; 5; 15); 3 (180; 5; 35); 4 (0; 0; 15). As respostas avaliadas foram os sinais de intensidade para os elementos supracitados. As respostas obtidas foram normalizadas e o software Statistica 7.0 foi utilizado para processar os resultados. Após otimização, os valores experimentais estabelecidos para compor a mistura foram: 1,0 mL de HNO<sub>3</sub>, 4,5 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 4,5 mL de H<sub>2</sub>O. Os limites de detecção obtidos foram 0,63, 4,3 e 0,37 mg kg<sup>-1</sup>, e de quantificação 2,1, 14 e 1,2 mg kg<sup>-1</sup> para cobre, ferro e manganês, respectivamente. Para uma amostra de castanha contendo 10,7, 44,3 e 11,0 mg kg<sup>-1</sup> de cobre, ferro e manganês, respectivamente, a repetibilidade obtida foi de 1,84%, 2,31% e 2,73%. A exatidão do método foi confirmada por análise do material de referência certificado NIST 1568b de farinha de arroz. O método proposto foi aplicado para a determinação de cobre, ferro e manganês em vinte e quatro amostras de castanha de caju, cujas concentrações encontradas variaram de 10,7 a 19,4, 44,3 a 67,2 e 11,0 a 21,4 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente. PCA e HCA foram aplicadas para verificar a classificação das amostras e as RNA's foram utilizadas como complemento para melhor visualizar a separação dos grupos.

Palavras-chave: preparo de amostra, castanha de caju, ICP OES, análise multivariada.

## ABSTRACT

In this paper, a sample preparation method is proposed for the determination of copper, iron and manganese in cashew nuts employing optical emission spectrometry with inductively coupled plasma (ICP OES). Simplex-Centroid mixture planning restriction was applied to optimize the sample preparation by digestion in a microwave, in order to evaluate the best ratio of HNO<sub>3</sub> reagents, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O. The heating program of microwave was conducted in four steps (temperature/°C; ramp/min.; hold/min.): 1 (120; 10; 10); 2 (150; 5; 15); 3 (180; 5; 35); 4 (0, 0, 15). The responses evaluated were the intensity signals for these elements. The responses were normalized and Statistica 7.0 software was used to process the results. After optimization, the experimental values set for composing the mixture were: 1.0 mL of HNO<sub>3</sub>, 4.5 mL of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 4.5 mL H<sub>2</sub>O. The obtained detection limits were 0.63, 4.3 and 0.37 mg kg<sup>-1</sup> and quantifying 2.1, 14 and 1.2 mg kg<sup>-1</sup> for copper, iron and manganese, respectively. For a sample containing chestnut 10.7, 44.3 and 11.0 mg kg<sup>-1</sup> of copper, iron and manganese, respectively, repeatability obtained was 1.84%, 2.31% and 2.73%. The accuracy of the method was confirmed by analysis of the certified reference material rice flour (NIST 1568b). The proposed method was applied for the determination of copper, iron and manganese in twenty-four cashew samples with obtained concentrations varied between 10.7 and 19.4, 44.3 and 67.2 and 11.0 and 21.4 mg kg<sup>-1</sup>, respectively. PCA and HCA were applied to verify the classification of samples and RNA's were used as a complement to better visualize the separation of the groups.

Keywords: sample preparation, cashew nut, ICP OES, multivariate analysis.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema ilustrativo do cajueiro, indicando as partes que compõem o caju e a castanha de caju .....	22
Figura 2 - Fluxograma dos produtos obtidos a partir da industrialização da castanha e do pedúnculo do caju .....	22
Figura 3 - Fluxograma do processamento da castanha de caju para obtenção da amêndoa. Fonte: Adaptado do texto Mini fábrica de processamento de castanha de caju – EMBRAPA .....	23
Figura 4 - Gráficos de contorno e respostas estimadas obtidos no procedimento de otimização do preparo de amostra .....	43
Figura 5 - Gráfico de valores preditos versus valores observados para os dados obtidos com o planejamento de mistura na otimização das variáveis associadas ao preparo de amostra .....	47
Figura 6 - Gráfico que representa a relação entre os dois fatores (PC1 e PC2) e as variáveis estudadas.....	54
Figura 7 - Gráfico de escores considerando as duas componentes (PC1 x PC2) obtidas para as amostras de castanha de caju com as variáveis estudadas .....	55
Figura 8 - Dendograma da matriz de distâncias obtido pelo método de agrupamento por ligação simples.....	56
Figura 9 - A esquerda temos o Gráfico U-matrix e a direita o Gráfico obtido depois da partição K-means .....	58
Figura 10 - Planos de componentes dos dados analisados, juntamente com o gráfico de separação de clusteres .....	59

Figura 11 - Disposição das amostras no mapa da rede e planos de componentes dos elementos estudados .....59

Figura 12 - Gráfico com os valores dos índices de silhueta .....61

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados do Levantamento Sistemático da Produção Agrícola (LSPA) para a castanha de caju no Brasil, no Nordeste e nos seus principais estados produtores .24	24
Tabela 2 - Parâmetros operacionais e instrumentais utilizados no ICP OES .....37	37
Tabela 3 - Programa de aquecimento utilizado no forno micro-ondas para decomposição das amostras.....40	40
Tabela 4 - Planejamento de mistura utilizado na otimização do procedimento para o preparo de amostra .....41	41
Tabela 5 - Valores dos coeficientes e respectivos erros padrão calculados para o planejamento de mistura .....42	42
Tabela 6 - Valores experimentais e previstos do planejamento de mistura para validação do modelo usando o método da regressão linear .....43	43
Tabela 7 - Análise de variância (ANOVA) para os dados obtidos, com o planejamento de mistura, no procedimento de otimização do preparo de amostra ..45	45
Tabela 8 - Comparação entre os modelos matemáticos para ajuste do planejamento de mistura com os respectivos valores de erros, efeitos e coeficientes de determinação.....47	47
Tabela 9 - Parâmetros das curvas de calibração analíticas: coeficiente de correlação ( $R^2$ ) e limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) obtidos a partir da análise de 10 brancos analíticos para os microelementos estudados após determinação por ICP OES.....49	49

Tabela 10 - Concentrações obtidas a partir da análise do material de referência certificado de farinha de arroz (NIST 1568b) para Cu, Fe e Mn (média ± intervalo de confiança, n=3).....	50
Tabela 11 - Resultados de concentração de Cu, Fe e Mn (mg kg <sup>-1</sup> ) determinados por ICP OES em amostras de castanha de caju (média ± intervalo de confiança, n=3) .	51
Tabela 12 - Autovalores e percentual da variância explicada para cada componente .....	53
Tabela 13 - Valores dos pesos nas componentes principais (PC) .....	53
Tabela 14 - Parâmetros de treinamento da rede Kohonen .....	57

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS	Espectrometria de Absorção Atômica (do inglês: <i>Atomic absorption spectrometry</i> )
ACC	Amêndoa de castanha de caju
ANOVA	Análise de variância (do inglês: <i>Analysis of variance</i> )
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICP OES	Espectrômetro de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (do inglês: <i>Inductively coupled plasma optical emission spectrometry</i> )
ICP-MS	Espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado (do inglês: <i>Inductively coupled plasma mass spectrometry</i> )
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada (do inglês: <i>International union of pure and applied chemistry</i> )
LCC	Líquido da casca da castanha
LSPA	Levantamento Sistemático da Produção Agrícola
MSR	Metodologia de superfície de resposta
NIST	National Institute of Standards and Technology
RSD	Desvio Padrão Relativo (do inglês: <i>Relative standard deviation</i> )
SIDRA	Sistema IBGE de Recuperação Automática
SINDICAJU	Sindicato das Indústrias de Beneficiamento de Castanha de Caju e Amêndoas Vegetais do Estado do Ceará

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>Introdução</b> .....	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>Objetivos</b> .....	<b>20</b>
2.1	Objetivo geral.....	20
2.2	Objetivos específicos.....	20
<b>3</b>	<b>Referencial Teórico</b> .....	<b>21</b>
3.1	Castanha de caju: do extrativismo à sua relação com a nutrição e saúde .....	21
3.2	A importância dos elementos no metabolismo humano.....	25
3.2.1	Cobre.....	25
3.2.2	Ferro.....	26
3.2.3	Manganês.....	26
3.3	Preparo de amostra para determinação de metais em sólidos.....	27
3.4	Otimização de métodos analíticos empregando estratégia multivariada .....	29
3.5	Análise exploratória não-supervisionada .....	30
3.5.1	Análise de componentes principais e análise de agrupamento hierárquico ...	31
3.5.2	Redes neurais artificiais.....	31
3.6	Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado .....	32
<b>4</b>	<b>Parte Experimental</b> .....	<b>36</b>
4.1	Instrumentação .....	36
4.2	Reagentes e preparo das soluções .....	37
4.3	Amostras.....	38
4.4	Otimização multivariada do procedimento para o preparo de amostra.....	38
4.5	Validação do método .....	39
4.6	Decomposição assistida por radiação micro-ondas em sistema fechado.....	40

<b>5</b>	<b>Resultados e Discussão .....</b>	<b>41</b>
5.1	Otimização multivariada do procedimento para o preparo de amostra .....	41
5.2	Procedimento de decomposição assistida por radiação micro-ondas em sistema fechado .....	48
5.3	Validação .....	48
5.3.1	Limites de detecção e de quantificação .....	48
5.3.2	Exatidão .....	49
5.3.3	Precisão .....	50
5.4	Aplicação nas amostras .....	50
5.5	Análise exploratória não-supervisionada .....	52
5.5.1	Análise de componentes principais e análise de agrupamento hierárquico ...	52
5.5.2	Redes neurais artificiais .....	57
<b>6</b>	<b>Conclusão .....</b>	<b>63</b>
<b>7</b>	<b>Sugestões de Trabalhos Futuros .....</b>	<b>65</b>
<b>8</b>	<b>Referências .....</b>	<b>66</b>

# 1 INTRODUÇÃO

---

Os alimentos são importantes fontes de substâncias necessárias para o desempenho de diversas funções no corpo humano. Dentre essas substâncias se destacam os nutrientes, os quais são componentes químicos que podem ser aproveitados pelo nosso organismo proporcionando energia ou contribuindo para o crescimento, desenvolvimento e manutenção da saúde e da vida. Esses nutrientes podem ser classificados como não essenciais, àqueles que podem ser produzidos pelo corpo humano a partir de outros compostos, e essenciais, os quais o organismo humano não é capaz de produzir, sendo necessário obtê-los por meio da alimentação. Nesse sentido, é necessário o conhecimento a respeito da concentração desses elementos para estabelecer as recomendações de ingestão alimentar e necessidades do organismo [1-3].

As nozes são consideradas como uma fonte de nutrientes, tendo em sua maior composição proteínas, gorduras, vitaminas e minerais, tais como fósforo, potássio, magnésio e ferro. São também importantes fontes de alguns elementos essenciais para a nutrição humana, como exemplo B, Se, Cu, Zn, Fe e Mn. Por apresentarem essas características, as nozes têm se tornado popular nas dietas tidas como saudáveis [4].

Os métodos analíticos convencionais analisam as amostras na forma de solução, às quais são preparadas, de forma clássica, por técnicas de digestão em meio ácido. Esse método consiste no aquecimento da amostra na presença de um ácido mineral oxidante concentrado, de misturas de ácidos oxidantes, ou mistura de um ácido oxidante com peróxido de hidrogênio. A decomposição da amostra por via úmida pode ser realizada de duas formas: em sistema aberto ou fechado, sendo este último mais vantajoso por utilizar altas temperaturas e pressão no processo de digestão e por não apresentar problemas com a perda de analitos voláteis [5].

A determinação de elementos totais, de metais e metaloides, essenciais ou tóxicos, em matrizes ambientais, de alimentos, energéticas e materiais biológicos é uma exigência crescente da sociedade. A determinação de níveis muito baixos de metais, normalmente, é realizada através de técnicas da espectrometria atômica,

tais como a espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) e a espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES). Essas técnicas apresentam qualidades bem particulares como a sensibilidade e a capacidade para determinações multielementares. As técnicas com o plasma indutivamente acoplado ainda apresentam como vantagens baixa interferência matricial, proporcionam análises rápidas, amplo intervalo linear de resposta e maior sensibilidade quando comparada ao FAAS [6].

Diante do exposto, este trabalho apresenta o desenvolvimento, otimização e aplicação de um método de preparo de amostra para a determinação de elementos essenciais em amostras de castanha de caju, empregando a espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado.

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver estratégia analítica baseada na aplicação da otimização multivariada sobre o procedimento do preparo de amostras para determinação de elementos essenciais em castanha de caju por espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES).

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Empregar técnicas de planejamento de mistura na otimização das variáveis envolvidas no processo de preparo de amostra;
- Avaliar o procedimento de decomposição de amostras de castanhas de caju empregando radiação micro-ondas;
- Estabelecer um procedimento analítico para determinação de Cu, Fe e Mn em amostras de castanha de caju utilizando a espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES);
- Aplicar o método desenvolvido no preparo das amostras de castanhas de caju;
- Aplicar análise de componentes principais (PCA), análise de agrupamento hierárquico (HCA) e redes neurais artificiais (RNA's) como ferramentas de análise exploratória para estabelecer comparações entre as amostras dos diferentes estados do Nordeste.

### 3.1 CASTANHA DE CAJU: DO EXTRATIVISMO À SUA RELAÇÃO COM A NUTRIÇÃO E SAÚDE

O cajueiro, de nome científico *Anacardium occidentale* L., é uma planta rústica e típica de clima tropical. Pertencente à família Anacardiaceae, a sua árvore pode alcançar até 20 m de altura e possuir como principais características ser bem ramificada, apresentar tronco inclinado e tortuoso e copa arredondada que, às vezes, pode alcançar o solo. Apesar de ter sua origem no Brasil, sendo característica das regiões costeiras do Norte e Nordeste, hoje, encontra-se disseminada em grande parte das regiões tropicais do mundo [7-9]. É considerada como uma das primeiras árvores frutíferas a ser amplamente distribuída ao longo dos trópicos a partir das rotas marítimas estabelecidas em todo o mundo pelos primeiros aventureiros portugueses e espanhóis que aqui chegaram. Apresenta grande importância socioeconômica para o Brasil, principalmente no Nordeste, por ser responsável por gerar empregos, no campo e na cidade, renda e impostos provenientes da industrialização dos produtos do seu fruto e pseudofruto [10].

A parte carnosa do caju, o pseudofruto formado pelo pedúnculo, possui alto teor de vitamina C e apresenta coloração variante entre o amarelo e o vermelho. É muito consumida na forma *in natura*, ou ainda, na forma de suco (cajuada), sorvete, refrigerante (cajuína), doces em calda, pasta, cristalizados, vinagre e pratos salgados. Já a castanha (fruto), fonte de vitaminas e outros nutrientes, também considerada especiaria de luxo, é indispensável na culinária nordestina e muito difundida em todo o mundo (Figura 1) [11].

De acordo com o Sindicato das Indústrias de Beneficiamento de Castanha de Caju e Amêndoas Vegetais do Estado do Ceará – SINDICAJU, a castanha de caju *in natura* é a matéria prima utilizada pela indústria de processamento, que dela obtém a amêndoa de castanha de caju (ACC), e extrai o líquido da casca da castanha (LCC), produtos destinados, em sua maior parte, à exportação [12]. Na Figura 2, é apresentado um fluxograma onde é possível observar os principais produtos

derivados da industrialização do caju e na Figura 3, é apresentado o fluxograma dos processos empregados para obtenção da ACC. Embora essa cultura tenha origem no Brasil, foi a Índia que, no início do século XX, observou um grande aumento no interesse do comércio internacional pelas castanhas, e começou a exportá-las [10].



Figura 1 - Esquema ilustrativo do cajueiro, indicando as partes que compõem o caju e a castanha de caju. Fonte: Disponível em <http://www.cerratinga.org.br/caju/>.

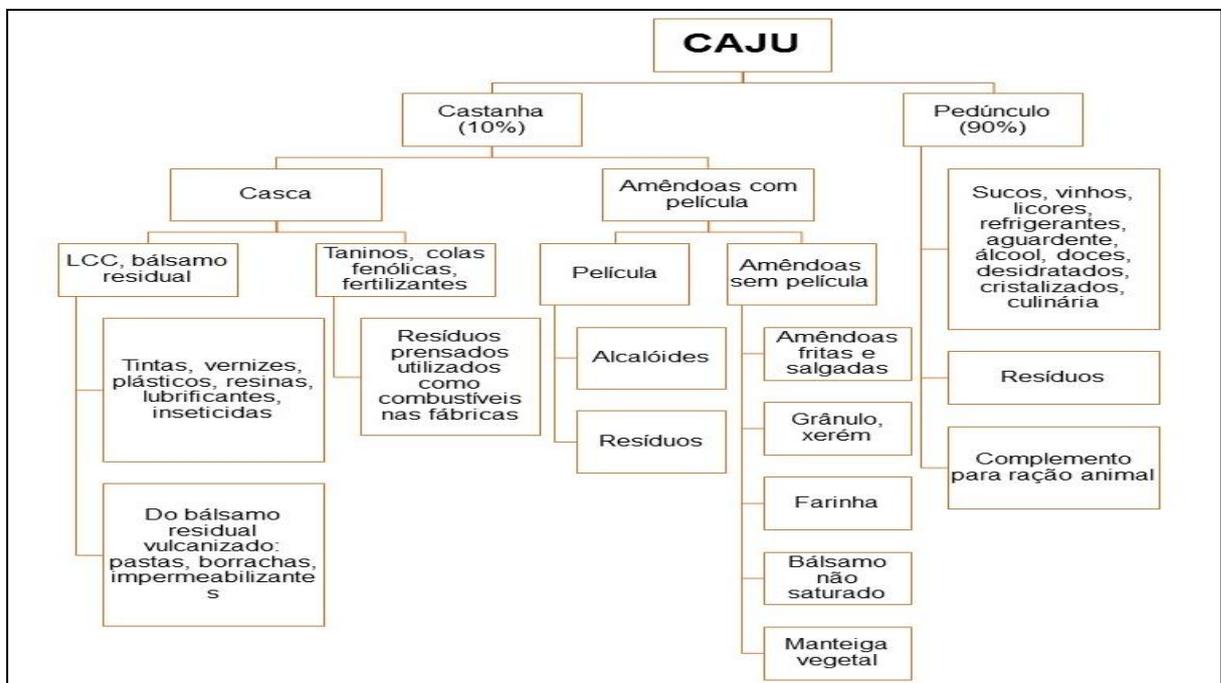


Figura 2 - Fluxograma dos produtos obtidos a partir da industrialização da castanha e do pedúnculo do caju. Fonte: Aproveitamento industrial do caju – EMBRAPA.

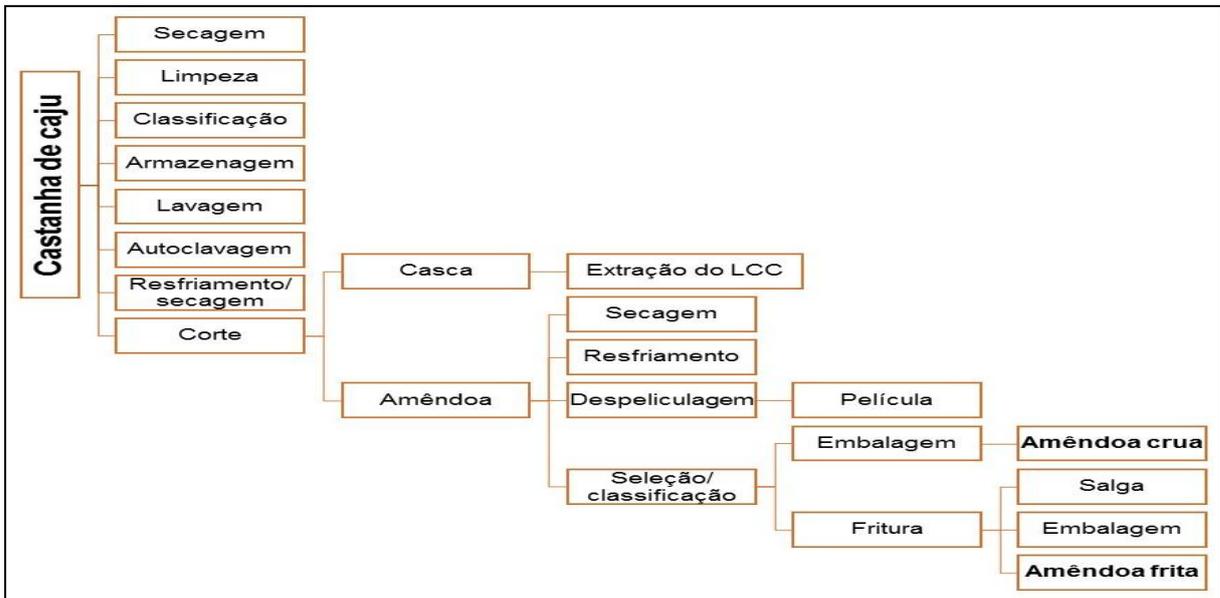


Figura 3 - Fluxograma do processamento da castanha de caju para obtenção da amêndoa. Fonte: Adaptado do texto Mini fábrica de processamento de castanha de caju – EMBRAPA. Disponível em: [http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Minifabrica\\_castanha\\_000fyri1q6902wx5ok0pvo4k364paqth.pdf](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Minifabrica_castanha_000fyri1q6902wx5ok0pvo4k364paqth.pdf).

No cenário mundial, os maiores produtores de caju são a Índia, Indonésia, Brasil, China, Moçambique, Tanzânia, Sri Lanka e Vietnã. Outros países nos continentes Asiáticos e Africanos também cultivam essa planta em menor escala. A produção mundial de castanha de caju bruta é de aproximadamente 1,09 milhões de toneladas por ano. A Índia é responsável por quase metade dessa produção (47%) e por isso é, hoje, considerada como o maior país produtor, processador, exportador e segundo maior consumidor de caju no mundo [9,10,13].

O Brasil ocupa o terceiro lugar na produção mundial de castanha de caju *in natura*, e também na oferta de ACC, sendo reconhecido pela boa qualidade de seus produtos. Na região Nordeste, o caju é cultivado em aproximadamente 700 mil hectares, correspondendo a mais de 95% da produção nacional, distribuídos nos estados do Ceará, Piauí, Rio Grande do Norte, Maranhão e Bahia, proporcionando uma safra anual de castanhas de caju maior que 220 mil toneladas [14,15]. Os dados da produção agrícola da castanha de caju no Brasil, no Nordeste e nos seus principais estados produtores, são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Dados do Levantamento Sistemático da Produção Agrícola (LSPA) para a castanha de caju no Brasil, no Nordeste e nos seus principais estados produtores

Ano/Safra	Produção (t)		Área plantada (ha)		Área colhida (ha)		Rendimento médio (kg/ha)	
	2014	2015	2014	2015	2014	2015	2014	2015
BR	107.48	229.09	680.27	644.86	626.46	626.33	172	366
NE	105.81	227.46	677.05	641.68	623.43	623.34	170	365
CE	51.21	148.61	410.27	409.90	378.09	396.24	135	375
PI	12.35	33.55	101.23	87.51	92.34	87.48	134	384
RN	27.41	30.87	114.81	99.15	107.02	96.34	256	320
MA	5.18	5.17	14.44	13.80	14.44	13.80	359	374
BA	5.28	4.55	25.99	20.93	22.69	20.71	233	220

Fonte: IBGE 2015 – Sistema IBGE de Recuperação Automática - SIDRA. BR: Brasil, NE: Nordeste; CE: Ceará; PI: Piauí; RN: Rio Grande do Norte; MA: Maranhão; BA: Bahia.

A castanha de caju apresenta em sua composição 47% de gorduras, 21% de proteínas e 22% de carboidratos, além de uma combinação certa de aminoácidos, minerais e vitaminas. Apesar de quase metade de sua composição ser de gordura, 82% desse valor corresponde aos ácidos graxos insaturados, e, portanto, não pode ser considerado como uma influência para o aumento do colesterol. O teor de gordura insaturada não só elimina a possibilidade de aumento do colesterol, como também equilibra e reduz o colesterol total no sangue. Dessa forma, quanto ao seu valor nutricional, pode ser comparada ao leite, carne e ovos. Por possuir baixo teor de carboidratos, contendo apenas 1% de açúcar solúvel, o consumo da castanha não leva a obesidade e estudos apontam que pode controlar o diabetes. Com isso, a castanha de caju tem sido considerada como um excelente lanche e um bom aperitivo [16].

### 3.2 A IMPORTÂNCIA DOS ELEMENTOS NO METABOLISMO HUMANO

Os alimentos são as fontes de nutrientes para os seres vivos e, por esse motivo, uma avaliação das espécies elementares presentes neles é de fundamental importância. Esses minerais são elementos químicos essenciais para um bom funcionamento metabólico do corpo humano. Eles devem ser fornecidos pela dieta (alimentos e bebidas) sobre valores regulares, variando de gramas por dia para macroelementos e miligramas ou microgramas por dia para os microelementos [17].

O aspecto fundamental que deve ser ressaltado relaciona-se aos valores de ingestão diários recomendados. Segundo a Dietary Reference Intakes (DRI), os valores recomendados são de  $900 \mu\text{g dia}^{-1}$  de cobre para adultos,  $8 \text{ mg dia}^{-1}$  de ferro para homens de todas as faixas etárias e mulheres em pós-menopausa e  $18 \text{ mg dia}^{-1}$  para mulheres em pré-menopausa. Para o manganês, não foi possível definir um valor para a necessidade média diária e, por esse motivo, um valor de ingestão recomendada foi definida com base na ingestão mediana relatada pela Food and Drug Administration Total Diet Study como sendo de 2,3 e  $1,8 \text{ mg dia}^{-1}$  para homens e mulheres, respectivamente [17,18].

Dentre os diversos alimentos, as nozes comestíveis apresentam teor considerável de diversos minerais, tais como cobre, ferro e manganês. Dentre esses, destaca-se a composição em ferro devido a sua importância na prevenção de carências nutricionais de relevância em saúde coletiva [16].

#### 3.2.1 COBRE

No corpo humano, cerca de 90% do Cu está localizado em músculos, ossos e fígado. Ele contribui para a formação de glóbulos vermelhos e à manutenção dos vasos sanguíneos, nervos, ossos e sistema imunológico. A sua deficiência é rara, mas existem doenças relacionadas com a diminuição da absorção de Cu, tais como doença celíaca, fibrose cística ou até mesmo o seguimento de dietas restritivas. A

toxicidade também é muito rara e, geralmente, ocorre por ingestão de água e alimentos contaminados [19].

### 3.2.2 FERRO

O ferro atua como um catalisador para as funções metabólicas. Consiste em um componente da hemoglobina e é necessário para o transporte do oxigênio, essencial para a respiração celular. Existem dois tipos de ferro: o heme, presente em alimentos de origem animal (vísceras, carne vermelha, peixe e marisco) e o não-heme, encontrado principalmente em vegetais, grãos integrais, nozes e sementes. A deficiência de Fe pode causar retardamento na síntese de hemoglobina, o que resulta no aparecimento de anemias nutricionais, ou seja, a diminuição da concentração de hemoglobinas é resultado da carência de um ou mais importantes nutrientes. O excesso de Fe no fígado leva a fibrose e cirrose, na pele a excesso de pigmentação, no pâncreas a diabetes e no coração a deficiência cardíaca e arritmias fatais [18,20].

### 3.2.3 MANGANÊS

O manganês é essencial como cofator para enzimas e está presente em metaloproteínas, também atua na transmissão de impulsos nervosos. É encontrado principalmente em cereais, pão preto, nozes, gengibre e chá. Casos de deficiência de Mn em humanos são escassos, mas pode causar perda de peso, dermatite, retardo de crescimento do cabelo e unhas e diminuição de lipídios no sangue. Ele não é tóxico quando administrado por via oral, mas pode levar a transtornos psiquiátricos em pessoas superexpostas a níveis mais elevados [19,20].

### 3.3 PREPARO DE AMOSTRA PARA DETERMINAÇÃO DE METAIS EM SÓLIDOS

A determinação de metais em amostras de origem alimentícia, biológica ou animal é considerada uma problemática analítica, devido às baixas concentrações em que são encontrados. A análise de amostras sólidas apresenta uma série de dificuldades e limitações, entre elas o efeito de matriz e a perda de analitos voláteis. Nesse sentido, a escolha do preparo de amostra e da técnica utilizada para determinação deverá ser realizada de forma minuciosa [21,22].

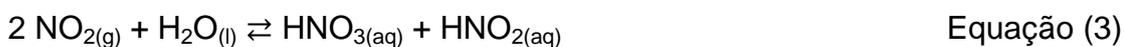
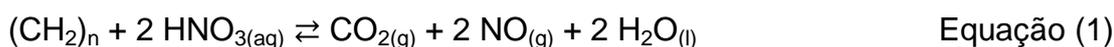
Os métodos analíticos convencionais analisam as amostras na forma de solução, às quais são preparadas, de forma clássica, por métodos de digestão em meio ácido. Esse método consiste no aquecimento da amostra na presença de um ácido mineral oxidante concentrado, de misturas de ácidos oxidantes, ou mistura de um ácido oxidante com peróxido de hidrogênio. São comumente empregados para tal fim os ácidos clorídrico, nítrico e sulfúrico [5]. Dessa forma, os elementos a serem determinados são, então, liberados na solução ácida em formas apropriadas para análise.

A decomposição da amostra por via úmida pode ocorrer de duas formas: em sistema aberto ou sistema fechado.

Os procedimentos convencionais de digestão em sistema aberto são considerados como uma das técnicas mais antigas e mais utilizadas. Neles, o calor é transferido por condução e as paredes dos tubos de digestão são aquecidas antes da transferência de calor para as soluções. Esse aquecimento é desnecessário e provoca a perda de energia do sistema. Além disso, é necessária a utilização de grandes quantidades de reagentes devido às perdas por evaporação. O risco de contaminação da solução da amostra por fonte externa é eminente, podendo afetar a precisão. No que se refere à sistema fechado para decomposição de amostras, o sistema de mineralização assistido por micro-ondas como fonte de energia, é tido como um avanço na área e se apresenta como uma alternativa efetiva aos procedimentos convencionais de digestão. A digestão por forno micro-ondas faz uso de altas temperaturas e pressões em seu sistema. Apresenta entre outras vantagens, os baixos valores em branco (devido ao uso de reduzidas quantidades

dos reagentes), a possibilidade de se trabalhar em temperaturas acima do ponto de ebulição do reagente (proporcionando reações com duração relativamente curta), a redução de contaminação por fontes externas e da perda de analitos voláteis [5,23-25].

Métodos envolvendo o uso de ácidos diluídos também foram desenvolvidos, e tem apresentado grande eficiência na decomposição de amostras [26,27]. Apesar de ser diluída, a mistura oxidante de ácido nítrico com peróxido de hidrogênio apresenta um elevado poder de oxidação aumentando a pressão e a temperatura no interior dos vasos fechados durante a digestão da amostra. Além disso, a água é uma molécula de dipolo adaptada para interagir eficientemente com a radiação de micro-ondas e para aumentar o aquecimento causado por ele, aumentando rapidamente o poder oxidante da mistura  $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$ . Como consequência, o teor de matéria orgânica das amostras é decomposto por pequenas quantidades de reagentes diluídos quando um forno micro-ondas com recipiente fechado é adotado na etapa de pré-tratamento da amostra [24,28]. Nas Equações 1- 4 são apresentadas as reações químicas que ocorrem no processo de decomposição da amostra, no interior dos tubos de digestão quando se faz uso de ácidos diluídos e forno micro-ondas.

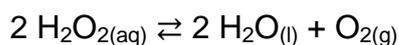


Ao avaliar as reações das equações 1 a 4, foi possível observar que há uma regeneração de ácido nítrico no sistema, o que permite a eficácia e permanência do ciclo de reação, enquanto matéria orgânica a ser oxidada pelo  $\text{HNO}_3$  estiver presente. As equações mostram que, durante a oxidação dos compostos orgânicos

da amostra pela ação do  $\text{HNO}_3$ , ocorre a formação de  $\text{NO}$  gasoso. O  $\text{NO}$  é removido do meio reacional aquecido e reage com o  $\text{O}_2$  presente na fase gasosa do frasco de reação. A seguir, o  $\text{NO}_2$  é gerado e reabsorvido na solução, resultando na formação de  $\text{O}_2$  na fase gasosa do sistema [5].

Com base nesse mecanismo de regeneração de ácido nítrico, é sugerido que um aumento na concentração de oxigênio disponível na fase gasosa possa melhorar reações de regeneração. Neste sentido, a possibilidade de introdução de concentrações mais elevadas de oxigênio dentro do recipiente de digestão pode ser também associada a reações de reciclagem do ácido nítrico, que poderia melhorar o poder oxidante das soluções diluídas, permitindo, dessa forma, que uma quantidade menor de ácido nítrico pudesse ser usada para digerir a mesma quantidade de compostos orgânicos [5,24].

O peróxido de hidrogênio é um reagente amplamente utilizado em procedimentos de digestão, normalmente associadas com ácido nítrico, para auxiliar na oxidação da matéria orgânica. Embora o peróxido de hidrogênio seja reconhecido devido ao seu forte poder oxidante em meio ácido, ele também sofre uma decomposição catalítica, tendo como produtos da reação a  $\text{H}_2\text{O}_{(l)}$  e  $\text{O}_{2(g)}$ , como pode ser observado na Equação 5. Assim, o peróxido de hidrogênio tem sido proposto como uma fonte alternativa de oxigênio [29].



Equação (5)

### 3.4 OTIMIZAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS EMPREGANDO ESTRATÉGIA MULTIVARIADA

Em todas as áreas de pesquisa que envolvam ciência experimental, existe a necessidade de conhecer as variáveis que são importantes e que influenciam no sistema proposto. Essa avaliação é realizada a partir da determinação das melhores condições dessas variáveis para a análise. São duas as metodologias utilizadas na otimização desses métodos: a univariada, onde cada fator é otimizado por vez, e a

multivariada, a qual permite que todos os fatores sejam estudados simultaneamente, sendo ainda possível o estudo das interações entre esses fatores [30,31].

Na otimização univariada, com exceção do fator a ser estudado, cujo valor irá variar nos diferentes níveis, todos os fatores envolvidos no processo terão seus valores fixados. Este método apresenta como vantagens a simplicidade e a facilidade de interpretação dos dados obtidos. No entanto, o maior gasto de reagentes, a maior demanda de tempo para realização dos experimentos e o fato de não considerar as interações que ocorrem entre os fatores, são pontos negativos à uma maior utilização deste procedimento nos laboratórios de pesquisa [32].

Já as técnicas de otimização multivariada vêm sendo amplamente utilizadas em química analítica na otimização de variáveis químicas associadas a procedimentos em diversas áreas [33-35]. Estas metodologias permitem eficiência e economia no processo experimental, resultando em objetividade científica. Baseia-se na triagem dos fatores estudados a fim de obter o efeito significativo do sistema de análise, onde após determinar os fatores significativos, as condições ótimas de operação são obtidas usando planejamentos experimentais mais complexos como Matriz Doehlert, Desenho Composto Central e Desenho Box-Behnken. Desta forma, os métodos de otimização multivariada envolvem projetos nos quais os níveis de todas as variáveis são alterados simultaneamente. A desvantagem que pode ser encontrada na utilização desta técnica, está associada a complexidade dos dados obtidos, no entanto, existem muitos softwares que facilitam o entendimento desses dados, tais como Octave, Matlab e Statistica.

Devido a necessidade de uma nova ferramenta que facilitasse o processo de escolha e otimização do experimento a ser utilizado, bem como a avaliação dos resultados obtidos, surge então a Quimiometria, que é definida como uma ciência que faz uso de fundamentos matemáticos e estatísticos com o auxílio de recursos da informática para a identificação de informações relevantes de um problema em estudo [30,36].

### **3.5 ANÁLISE EXPLORATÓRIA NÃO-SUPERVISIONADA**

Os experimentos químicos envolvem de modo geral a análise de grande número de variáveis, devido a essa circunstância aplica-se em grande vantagem os métodos multivariados. A análise multivariada verifica a existência de similaridades entre as amostras que, por sua vez, correspondem às semelhanças na composição química. Existem vários métodos de análise multivariada, com finalidades bem diversas entre si. Quando o interesse é verificar como as amostras se relacionam, ou seja, o quanto estas são semelhantes segundo as variáveis utilizadas no trabalho, destacam-se dois métodos: a análise de componentes principais (PCA), também conhecido como método de extração de características, e análise de agrupamentos hierárquicos (HCA) [37-39].

### 3.5.1 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS E ANÁLISE DE AGRUPAMENTO HIERÁRQUICO

Em se tratando da análise exploratória, a base dos métodos modernos é o PCA (Análise de Componentes Principais), que consiste numa manipulação da matriz de dados com objetivo de representar as variações presentes em muitas variáveis, através de um número menor de "fatores", construindo-se um novo sistema de eixos para representar as amostras, visualizada em poucas dimensões [40]. Uma técnica complementar a PCA é a HCA (Análise de Agrupamento Hierárquico), a qual interliga as amostras por suas associações, produzindo um dendograma onde as amostras semelhantes são agrupadas. A suposição básica é de que quanto menor a distância entre os pontos, maior a semelhança entre as amostras. Os dendogramas são especialmente úteis na visualização de semelhanças entre amostras ou objetos representados por pontos no espaço com dimensão maior que três, onde a representação de gráficos convencionais não é possível [37].

### 3.5.2 REDES NEURAIAS ARTIFICIAIS

Dentre os métodos quimiométricos encontram-se ainda as redes neurais artificiais (RNA's), as quais são baseadas no comportamento do cérebro humano, sendo os mapas auto-organizáveis de Kohonen, um tipo de rede neural, um tipo de algoritmo que emprega aprendizagem não-supervisionada [41]. A estratégia de aprendizagem para esses métodos é a de aprendizagem competitiva, onde em linhas gerais, é apresentada repetidamente à rede um conjunto de padrões de entrada junto com a categoria a qual um pertence. Em seguida, apresenta-se um padrão nunca visto, mas que pertence a um conjunto de padrões utilizados para o treinamento. Com isto, a rede é capaz de identificar a categoria daquele padrão particular a partir da informação extraída no aprendizado. O processo de aprendizado consiste em reforçar as ligações que levam o sistema a produzir respostas mais eficientes [42].

### **3.6 ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓTICA COM PLASMA INDUTIVAMENTE ACOPLADO**

A espectroscopia atômica se divide em espectrometria atômica ótica e espectrometria de massas atômica. Ambas são fundamentadas na interação entre radiação eletromagnética e átomos gasosos ou íons elementares livres. Na espectrometria atômica ótica, que envolve técnicas de absorção e emissão atômica, o tipo de informação obtida depende da transição envolvida.

A Espectrometria de Emissão Atômica (EA) é amplamente usada em análise elementar. O Plasma Indutivamente Acoplado (ICP) é atualmente a fonte mais popular para a EA, embora outras estratégias sejam empregadas para casos particulares. A introdução das amostras em uma fonte de plasma pode ser feita na forma de aerossol líquido ou vapor, seguindo diferentes procedimentos. As amostras na forma líquida facilitam o processo de homogeneização e aplicação de procedimentos de quantificação com soluções padrão, método da adição de analito e diluição isotópica. Sistemas de amostragem em sólidos também podem ser empregados, os quais utilizam processos de dissolução ou ainda a ação de laser ou centelha em dispositivos apropriados [43].

Um dos pré-tratamentos mais usuais consiste em transformar a amostra líquida em gotículas dispersas em gás por meio de nebulizadores. Estes dispositivos, geralmente são acoplados a câmaras onde as gotículas maiores da amostra são condensadas e descartadas, sendo um volume grande da amostra descartado (> 95%). As gotículas menores formam uma nuvem mais homogênea do aerossol, onde são transportadas para a tocha. Entre as propriedades do aerossol são importantes: o tamanho e a distribuição das gotículas, as quantidades de amostra e solvente transferidas para o plasma e as flutuações do sistema de nebulização. A qualidade do aerossol produzido depende do nebulizador, enquanto que a seleção da parte do aerossol transferido para o plasma depende da câmara de nebulização. São quatro os nebulizadores normalmente utilizados fazendo-se o bombeamento com bomba peristáltica: concêntrico, fluxo cruzado, disco poroso e babington [44].

O plasma é uma fonte de emissão ideal e adequada para análises rápidas e multielementares. Consiste em um gás, altamente ionizado, contendo igual número de elétrons e íons positivos, sendo altamente condutivo e afetado pelo campo magnético. Duas configurações de observação são possíveis, uma radial e outra axial. Ambas apresentam vantagens e desvantagens no seu uso, a qual é determinada pelos objetivos da análise: melhor estabilidade e precisão das radiais, ou menores limites de detecção das axiais [43,44].

Os processos que envolvem a introdução da amostra em um ICP, tem início com o bombeamento da amostra para o nebulizador por uma bomba peristáltica através de um tubo capilar. Este, converte a amostra em um fino aerossol e as partículas serão separadas na câmara de nebulização (gotículas maiores serão descartadas). As gotículas do aerossol de tamanhos uniformes são inicialmente dessolvatadas no plasma à alta temperatura, para remoção do solvente da amostra, resultando em partículas de sais microscópicas. Em seguida, ocorre a vaporização das partículas sólidas e a dissociação dos compostos em átomos livres em uma região do plasma onde o elemento, que está no estado fundamental, está apto para absorver radiação de determinado comprimento de onda. Após o aerossol da amostra ocorre a excitação ou ionização [43,45].

O detector mais amplamente utilizado é o detector de estado sólido. Esses dispositivos baseiam seu uso nas cargas desenvolvidas em um cristal de silício e

como resultado de absorção de fótons, são dispositivos de dimensão física reduzida. Possibilita a detecção simultânea de todo o espectro e opera a baixa temperatura. Podem ser de dois tipos: Dispositivo de Carga Acoplada: (CCD) onde cargas geradas se movem em direção a um amplificador sensível à carga a ser medida; Dispositivo de Injeção de Cargas: (CID) onde é medida da variação de voltagem resultante do movimento de cargas da região sob um eletrodo até a região sob o outro [44].

As interferências típicas em ICP OES podem ser espectrais e não espectrais. As interferências espectrais em emissão atômica são produzidas por superposição espectral entre linhas emitidas pelos diferentes elementos da amostra, sendo uma das principais causas de erros nas medições. Os espectros de linhas do ICP são muito complexos, devido à temperatura atingida no plasma. Diferentes situações de interferências podem ocorrer, entre elas, a coincidência total ou parcial de linhas, proximidade de uma linha que afeta o fundo em um dos extremos da linha de interesse e o aumento do fundo [45].

As interferências oriundas de mudanças das propriedades físicas da solução da amostra (viscosidade, densidade e tensão superficial), que alteram a transferência de amostra para o plasma, temperatura, ou o número de elétrons no plasma, são chamadas não espectrais. Estas interferências aumentam ou diminuem o sinal do analito por supressão, alterações das condições de nebulização e excitação. Interferências não espectrais têm sido expressas em termos de efeito de matriz, relacionado com todas as etapas do processo de medição em ICP OES (nebulização, transporte, dessolvatação, vaporização, atomização, ionização, excitação e emissão). A fim de amenizar ou corrigir as interferências não espectrais vários recursos podem ser utilizados: correção de matriz, uso de padrão interno, calibração por adição de padrão, adição de surfactantes, diluição da amostra, separação de matriz e correção com modelos matemáticos [45].

A versatilidade da técnica de ICP OES deve-se não somente ao grande número de elementos que podem ser determinados de forma rápida, principalmente quando se dispõe de espectrômetros que fazem medições simultâneas, com vistas de observação radial e axial. Deve-se também à variedade de tipos de amostras de diferentes áreas que podem ser analisadas. Como exemplo, amostras botânicas

[46], leite [47], castanha do Brasil [48], petróleo bruto [49], óleos vegetais e biodiesel [50], entre outras.

De forma geral, os espectrômetros de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) apresentam como características o baixo nível de radiação de fundo, baixo limite de detecção, análise multielementar e rápida, ampla faixa de calibração e apresenta poucas interferências.

## 4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

---

### 4.1 INSTRUMENTAÇÃO

Foi empregado nesse trabalho um espectrômetro de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado com visão axial, Varian 710-ES, (Varian, Mulgrave, Austrália). Esse equipamento é equipado com um gerador de radiofrequência de 40 MHz usado na faixa de 1200-1400 W para o estudo proposto e um detector de estado sólido com dispositivo de carga acoplada (CCD).

Argônio (99,998%, White Martins, Praxair, Brasil) foi usado como gás gerador do plasma e no sistema de nebulização. O sistema de nebulização empregado foi constituído por um nebulizador do tipo OneNeb (Agilent Technologies, Santa Clara, Estados Unidos) associado com uma câmara de nebulização Ciclônica – Single Pass (Agilent Technologies, Santa Clara, Estados Unidos). A tocha foi alinhada horizontal e verticalmente com uma solução padrão de Mn de concentração 5000 mg L<sup>-1</sup>. O sistema ótico do ICP OES foi calibrado com solução estoque multielementar de padrões rastreados. As linhas espectrais foram selecionadas considerando ausência de interferências espectrais e sensibilidade adequada para a determinação de elementos em baixas e altas concentrações. A taxa de injeção de amostra utilizada foi de aproximadamente 5 mL min<sup>-1</sup>. Todas as condições operacionais, características instrumentais do ICP OES e as linhas escolhidas de cada elemento encontram-se resumidamente descritas na Tabela 2.

A decomposição ácida das amostras assistida por radiação micro-ondas foi realizada em um forno de micro-ondas com cavidade (Mars Xpress, Matthews, Estados Unidos). Esse forno possui capacidade para 40 tubos de polímero perfluoroalcoxi (PFA) e limites operacionais para a potência e temperatura de 1600 W e 180°C, respectivamente.

Todos os procedimentos de pesagem foram realizados em balança analítica (Shimadzu do Brasil, São Paulo, Brasil, modelo AUW-D Series) com precisão de até

cinco casas decimais e capacidade máxima de 210 g. As amostras foram trituradas em um moinho analítico (IKA, Modelo A11 basic) por 30 segundos.

Tabela 2 - Parâmetros operacionais e instrumentais utilizados no ICP OES

Parâmetro	Condição
Radiofrequência do gerador (MHz)	40
Potência do gerador de radiofrequência (W)	1400
Câmara de nebulização	Ciclônica (Single Pass)
Nebulizador	OneNeb
Tempo de integração do sinal (s)	5
Vazão do argônio principal (L min <sup>-1</sup> )	15
Vazão do argônio auxiliar (L min <sup>-1</sup> )	1,5
Pressão de nebulização (kPa)	150
Velocidade da bomba peristáltica (rpm)	15
Detector	CCD
Linhas (nm)	Cu I 327,395 Fe II 238,204 Mn II 257,610

I – Linha atômica; II – Linha iônica

## 4.2 REAGENTES E PREPARO DAS SOLUÇÕES

Todas as vidrarias e os materiais de laboratório utilizados nos experimentos foram lavados e mantidos em solução de HNO<sub>3</sub> 10% (v v<sup>-1</sup>) por um período mínimo de 24 horas. Após esse período, foram enxaguados com água ultrapura e secos.

Para o preparo das soluções foram usados reagentes de grau analítico. A solução de ácido nítrico (65% v v<sup>-1</sup>, Merck, Darmstadt, Germany) foi utilizada para o preparo de soluções de referência e na etapa de decomposição das amostras. Uma

solução de peróxido de hidrogênio (30% v v<sup>-1</sup>, Merck, Darmstadt, Germany) também foi utilizada no procedimento de decomposição das amostras. Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura (18,2 MΩ cm) obtida a partir de um sistema purificador de água Milli-Q (Milipore Corporation, Bedford, Estados Unidos).

As soluções de referência utilizadas na curva de calibração do equipamento foram preparadas a partir de diluições de soluções estoque contendo 1000 mg L<sup>-1</sup> de Cu, Fe e Mn (SpecSol, Quimlab Química e Metrologia, São José dos Campos, Brasil) em meio de 1,0 mol L<sup>-1</sup> de ácido nítrico.

### 4.3 AMOSTRAS

Foram estudadas amostras de castanha de caju (*Anacardium occidentale* L.) adquiridas no período entre Janeiro de 2015 a Janeiro de 2016. A amostragem foi realizada em feiras livres dos principais municípios dos estados da Bahia, Sergipe, Alagoas e Ceará totalizando vinte e quatro amostras. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos e levadas ao laboratório para a etapa de pré-tratamento. Essa etapa envolveu o processamento das mesmas utilizando um triturador de alimentos para redução de tamanho e melhor homogeneização, o que facilitou o processo de mineralização. As amostras foram preservadas sob refrigeração em freezer até o momento da análise.

### 4.4 OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA DO PROCEDIMENTO PARA O PREPARO DE AMOSTRA

Planejamento de mistura Simplex-Centróide com restrição foi aplicado para otimizar o preparo da amostra de castanha de caju por digestão em forno micro-ondas. Para obtenção da melhor composição da mistura para a digestão das amostras, o planejamento foi aplicado na otimização das proporções dos componentes: ácido nítrico, peróxido de hidrogênio e água, variando entre 10 e 80%, considerando a composição final de 100%. As respostas avaliadas foram os sinais

de intensidade para os elementos Cu, Fe e Mn. O número total de experimentos foi igual a nove, sendo sete os experimentos exigidos pelo planejamento (considerando um ponto central) mais duas medições realizadas no ponto central para avaliar o erro experimental. A resposta múltipla foi elaborada a partir do somatório do sinal de emissão normalizado de cada analito em cada experimento, conforme apresentado na Equação 6, a seguir. O software Statistica 7.0 foi utilizado para processar os resultados.

Equação (6):

$$RN = \frac{\text{Sinal de emissão Cu}}{\text{Sinal de emissão máximo Cu}} + \frac{\text{Sinal de emissão Fe}}{\text{Sinal de emissão máximo Fe}} + \frac{\text{Sinal de emissão Mn}}{\text{Sinal de emissão máximo Mn}}$$

Em que, RN é a resposta múltipla normalizada, Sinal de emissão Fe é o sinal de intensidade medido para Fe em cada experimento e Sinal de emissão máximo Fe é o sinal máximo de intensidade de Fe em todo o planejamento. Essa regra foi aplicada aos demais elementos estudados.

#### 4.5 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

O material de referência certificado de farinha de arroz (NIST 1568b), obtido do *National Institute of Standards and Technology* (NIST), foi empregado para avaliação da exatidão do método proposto. Outros parâmetros de desempenho como limites de detecção e de quantificação e a precisão também foram avaliados para a validação do método. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram determinados a partir do desvio padrão resultante da análise de 10 brancos analíticos. A precisão foi avaliada com base no desvio padrão relativo.

#### 4.6 DECOMPOSIÇÃO ASSISTIDA POR RADIAÇÃO MICRO-ONDAS EM SISTEMA FECHADO

Após a etapa de pré-tratamento, as amostras foram pesadas diretamente em tubos de digestão. A digestão total das amostras foi realizada empregando 250 mg de castanha de caju, 1,0 mL de ácido nítrico P.A., 4,5 mL de peróxido de hidrogênio e 4,5 mL de água ultrapura. Os frascos contendo essa mistura foram fechados apropriadamente e colocados no forno para execução do programa de aquecimento apresentado na Tabela 3. Os digeridos obtidos foram diluídos para o volume final de 25 mL e refrigerados à aproximadamente 4°C até o momento da análise. A concentração de Cu, Fe e Mn foi determinada na solução final por ICP OES. As amostras foram analisadas em triplicata (n=3).

O material de referência certificado também foi submetido ao mesmo procedimento de digestão. A acidez residual foi determinada a partir de titulação ácido-base com solução padronizada de hidróxido de sódio 0,100 mol L<sup>-1</sup>.

Tabela 3 - Programa de aquecimento utilizado no forno micro-ondas para decomposição das amostras

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (min.)	Tempo (min.)
1	120	10	10
2	150	5	15
3	180	5	35
4	0	0	15

min. - minutos

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

### 5.1 OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA DO PROCEDIMENTO PARA O PREPARO DE AMOSTRA

Um planejamento de mistura Simplex-Centróide foi empregado para a otimização do procedimento de preparo da amostra, onde foram estudadas as proporções de  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$  que foram utilizadas na digestão das amostras de castanha. Os parâmetros operacionais do ICP OES foram os recomendados pelo fabricante. Os domínios experimentais para cada fator foram definidos com base em dados da literatura [28]. A matriz experimental, com os valores codificados e valores reais, bem como sinais analíticos (intensidade) está apresentada na Tabela 4. As replicatas no ponto central foram realizadas para possibilitar uma melhor avaliação do efeito de um fator dentro do domínio experimental estudado por meio da estimativa da variância e do erro experimental.

Para avaliação dos resultados, foram realizados os cálculos para os coeficientes de regressão, sendo todos expressos com os respectivos erros padrão. Os resultados obtidos com esses cálculos estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 4 - Planejamento de mistura utilizado na otimização do procedimento para o preparo de amostra

Experimento	$\text{HNO}_3$ (mL)	$\text{H}_2\text{O}$ (mL)	$\text{H}_2\text{O}_2$ (mL)	Resposta Normalizada*
1	0 (1)	0 (1)	1 (8)	2,705
2	1 (8)	0 (1)	0 (1)	2,727
3	0 (1)	1 (8)	0 (1)	2,716
4	0 (1)	0,5 (4,5)	0,5 (4,5)	2,992
5	0,5 (4,5)	0 (1)	0,5 (4,5)	2,553
6	0,5 (4,5)	0,5 (4,5)	0 (1)	2,805
7 (PC)	0,333 (3,3)	0,333 (3,3)	0,333 (3,3)	2,828
8 (PC)	0,333 (3,3)	0,333 (3,3)	0,333 (3,3)	2,816
9 (PC)	0,333 (3,3)	0,333 (3,3)	0,333 (3,3)	2,803

\* Resposta normalizada para os valores de intensidade obtidos no experimento

Tabela 5 - Valores dos coeficientes e respectivos erros padrão obtidos para o planejamento de mistura

Variável e/ou interação	Coefficiente	Erro padrão
HNO <sub>3</sub> *	2,73	0,0117
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> *	2,71	0,0117
H <sub>2</sub> O*	2,70	0,0117
HNO <sub>3</sub> x H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> *	0,357	0,0510
HNO <sub>3</sub> x H <sub>2</sub> O*	-0,629	0,0510
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> x H <sub>2</sub> O*	1,15	0,0510

\*Variáveis e/ou interações significativas

Dessa forma, e com base nos dados da Tabela 5, foi possível obter a Equação 7 que apresenta o modelo quadrático estabelecido para o planejamento de mistura, considerando os fatores significativos.

Equação (7):

$$\text{Resposta Normalizada} = 2,72_{(\pm 0,0117)}[\text{HNO}_3] + 2,71_{(\pm 0,0117)}[\text{H}_2\text{O}_2] + 2,70_{(\pm 0,0117)}[\text{H}_2\text{O}] + 0,357_{(\pm 0,0510)}[\text{HNO}_3][\text{H}_2\text{O}_2] - 0,629_{(\pm 0,0510)}[\text{HNO}_3][\text{H}_2\text{O}] + 1,15_{(\pm 0,0510)}[\text{H}_2\text{O}_2][\text{H}_2\text{O}]$$

A Equação 7 ilustra a relação entre as três variáveis estudadas (concentração de HNO<sub>3</sub> e volumes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O) com o sinal analítico (intensidade), considerando os valores reais. Essa equação revela os pontos críticos da superfície de resposta para cada variável, e a partir dela, também foi possível realizar os cálculos para os valores preditos, que em seguida, foram aplicados no método da regressão linear para avaliar o modelo estabelecido. Os valores previstos para cada experimento são apresentados na Tabela 6. O tratamento dos dados pelo software Statistica 7.0 forneceu a superfície de resposta apresentadas na Figura 4.

Tabela 6 - Valores experimentais e previstos do planejamento de mistura para validação do modelo usando o método da regressão linear

Experimento	HNO <sub>3</sub> (mL)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mL)	H <sub>2</sub> O (mL)	Valor experimental	Valor previsto
1	0	0	1	2,705	2,704
2	1	0	0	2,727	2,726
3	0	1	0	2,716	2,715
4	0	0,5	0,5	2,992	2,997
5	0,5	0	0,5	2,553	2,558
6	0,5	0,5	0	2,805	2,810
7	0,333	0,333	0,333	2,828	2,812
8	0,333	0,333	0,333	2,816	2,812
9	0,333	0,333	0,333	2,803	2,812

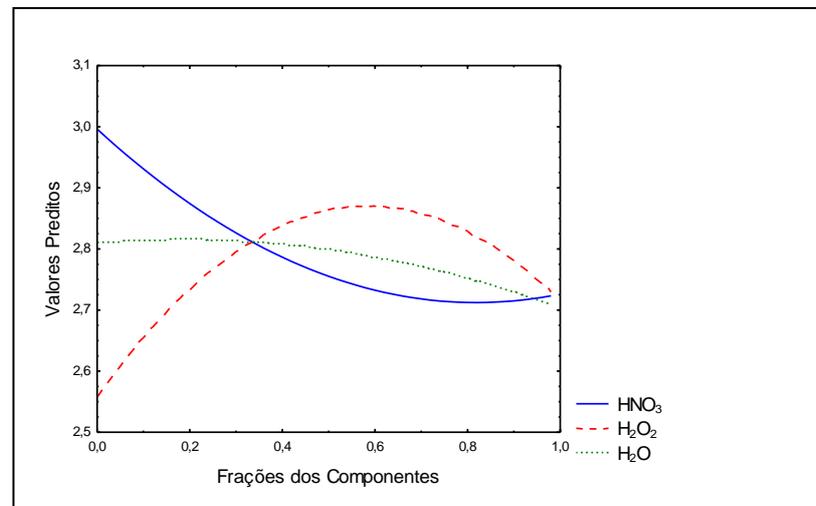
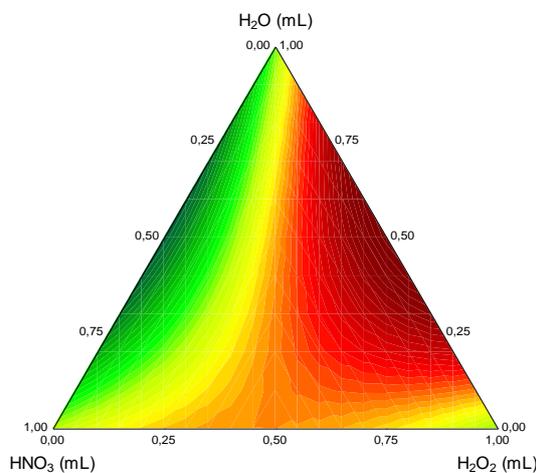


Figura 4 - Gráficos de contorno e respostas estimadas obtidos no preparo de amostra

O gráfico das curvas de nível, apresentado na Figura 4, indica que a mistura mais eficiente para disponibilizar a maior quantidade dos metais, que é obtida quando há uma completa digestão das amostras de castanha (elucidada pela cor vermelha), deve ser composta por um maior volume de água, seguido por um aumento no volume de peróxido, sem quase haver necessidade da presença de

ácido nítrico na mistura. O resultado obtido está de acordo com os já reportados na literatura no que se refere à avaliação da composição mineral de sementes e nozes comestíveis por técnicas espectrométricas [28,51,52].

Por se tratar de uma amostra que contém uma grande quantidade de gorduras, uma completa decomposição da castanha será obtida com um maior volume de água, uma vez que a presença da mesma na mistura oxidante aumenta a temperatura do meio e, conseqüentemente, a pressão dentro do tubo de reação promovendo a elevação do potencial oxidante. Um maior potencial oxidante também é conseguido com a presença do  $H_2O_2$ , que a partir da sua reação de decomposição libera  $O_{2(g)}$  dentro do tubo de digestão. Esse  $O_{2(g)}$  começa a reagir com os produtos da digestão e participa do ciclo de regeneração do  $HNO_3$  [5].

As informações acima discutidas podem ser confirmadas ao se fazer a análise do gráfico de curvas de nível em conjunto com o gráfico de respostas estimadas, ambos apresentados na Figura 4.

Uma análise da superfície de resposta e dos gráficos de contorno e respostas estimadas permitiu concluir que a mistura para a digestão das amostras deveria ser composta por 10% de  $HNO_3$ , 45% de  $H_2O_2$  e 45% de  $H_2O$ . A mistura, nestas proporções, foi utilizada na digestão das amostras para a determinação de Cu, Fe e Mn por ICP OES.

A aplicação do método da regressão linear nos dados experimentais e valores preditos (Tabela 6), que foram confrontados para estabelecer o modelo quadrático, resultou na Equação 8:

$$y = (0,9960 \pm 0,05504)x + (0,01125 \pm 0,1527) \quad \text{Equação (8)}$$

A avaliação da Equação 8 demonstrou que, o coeficiente angular ( $0,9960 \pm 0,05504$ ) admite o número 1, enquanto que o coeficiente linear ( $0,01125 \pm 0,1527$ ) admite o número zero. Com isso, se pode afirmar que não existe diferença significativa entre os valores experimentais obtidos no planejamento e os valores preditos calculados utilizando esse modelo. Outra avaliação foi realizada

considerando o coeficiente de determinação ( $R^2 = 0,9901$ ), e evidenciou uma correlação satisfatória, uma vez que  $R^2$  apresentou valor maior que 0,90.

A validação do modelo proposto foi feita a partir da verificação do ajuste entre os dados experimentais e os valores preditos. Para isso, foi feita uma análise na tabela de ANOVA bem como na correlação existente entre os valores preditos e valores observados. Além disso, e como discutido anteriormente, o método da regressão linear foi aplicado para obtenção da equação de uma reta que também possibilitou a avaliação do ajuste para o modelo proposto.

A análise de variância, ANOVA (Tabela 7) para os dados obtidos com o planejamento de mistura, indicou que o valor de p para a falta de ajuste é maior que 0,05, o que significa que os dados obtidos estão sendo satisfatoriamente descritos. Através da análise do gráfico de valores preditos versus valores observados (Figura 5), foi possível verificar que houve boa concordância dos valores observados em relação aos valores previstos pelo modelo, o que indica que o modelo quadrático proposto está bem ajustado aos dados experimentais obtidos no planejamento.

Tabela 7 - Análise de variância (ANOVA) para os dados obtidos, com o planejamento de mistura, no procedimento de otimização do preparo de amostra

Fator	SS	Df	MS	F	F <sub>tab</sub>	P
Modelo	0,112599	5	0,022520	161,6362	9,01	0,000761
Erro total	0,000418	3	0,000139			
Falta de ajuste	0,000105	1	0,000105	0,6715	18,51	0,498635
Erro puro	0,000313	2	0,000156			
Total ajustado	0,113017	8	0,014127			

O teste de Fischer (teste F) foi aplicado para verificar o ajuste do modelo proposto, no qual o valor de F calculado para o modelo foi de 161,6, enquanto que o F tabelado foi de 9,01. A razão entre esses valores é da ordem de 17 vezes, o que indica que a regressão é bastante significativa. Já o valor de F calculado para a falta de ajuste foi de 0,67. Este valor é menor que F tabelado de 18,51, o que indica que o erro puro se confunde com a falta de ajuste, ou seja, o modelo proposto não apresenta falta de ajuste e descreve a região experimental adequadamente.

Na Tabela 8, estão apresentados os modelos matemáticos utilizados no ajuste do planejamento de mistura. A escolha de qual modelo seria o mais adequado foi realizada utilizando os critérios de  $R^2$  ajustado e da menor média quadrática de erro (MQE). No presente trabalho, foram testados os modelos linear, quadrático e cúbico especial, sendo o modelo quadrático àquele que melhor ajustou o planejamento.

Outra forma de avaliar a qualidade do modelo utilizado na descrição dos dados é realizando uma avaliação dos resíduos deixados pelo mesmo. Se um modelo deixar resíduos muito grandes ou tendenciosos ele se torna inadequado para fazer inferências precisas sobre o comportamento dos dados no campo experimental em questão.

Para o modelo quadrático aplicado, foi possível inferir que os valores dos resíduos apresentaram uma tendência para a distribuição normal variando bem próximo ao zero, o que indica que o modelo proposto está bem ajustado. Dessa forma, é possível afirmar que os valores ótimos obtidos são válidos, pois os mesmos foram obtidos de modelos matemáticos com ajuste satisfatório para o planejamento de mistura aplicado na otimização do procedimento do preparo de amostra.

Tabela 8 - Comparação entre os modelos matemáticos para ajuste do planejamento de mistura com os respectivos valores de erros, efeitos e coeficientes de determinação

Modelo	SS Efeito	df Efeito	MS Efeito	SS Erro	df Erro	MS Erro	F	p	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Ajustado
Linear	0,017939	2	0,008969	0,095078	6	0,015846	0,5660	0,595405	0,158726	0,000000
<b>Quadrático</b>	<b>0,094660</b>	<b>3</b>	<b>0,031553</b>	<b>0,000418</b>	<b>3</b>	<b>0,000139</b>	<b>226,4751</b>	<b>0,000494</b>	<b>0,996302</b>	<b>0,990138</b>
Cúbico especial	0,000105	1	0,000105	0,000313	2	0,000156	0,6715	0,498635	0,997231	0,988925
Total ajustado	0,113017	8	0,014127							

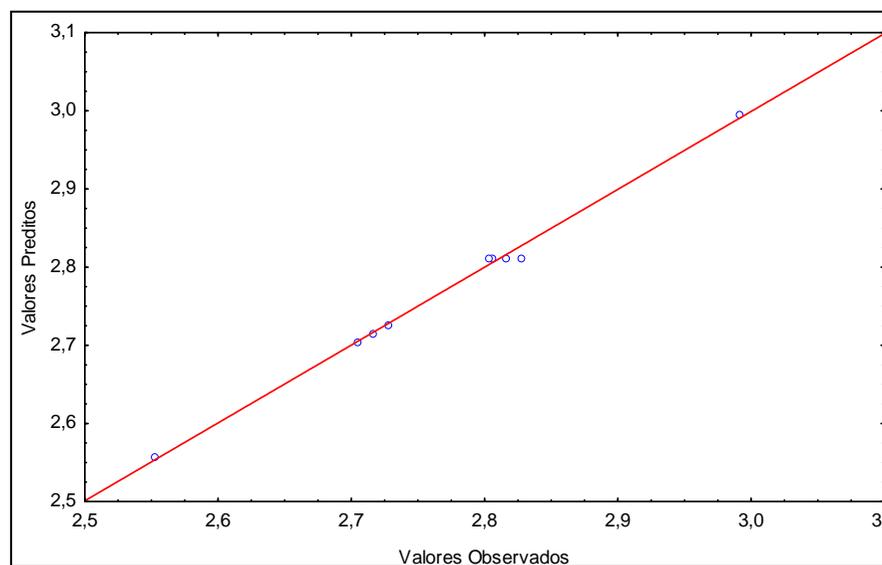


Figura 5 - Gráfico de valores preditos versus valores observados para os dados obtidos com o planejamento de mistura na otimização das variáveis associadas ao preparo de amostra

## 5.2 PROCEDIMENTO DE DECOMPOSIÇÃO ASSISTIDA POR RADIAÇÃO MICRO-ONDAS EM SISTEMA FECHADO

O estudo da proporção dos reagentes para a digestão das amostras foi avaliado com base no aspecto visual das soluções dos digeridos e na acidez residual. Para isso, a metodologia desenvolvida foi aplicada em uma amostra escolhida de forma aleatória.

A solução dos digeridos finais se apresentou límpida e sem partículas dispersas. O objetivo era conseguir baixa acidez final, uma vez que elevados teores de acidez nos digeridos podem gerar danos aos espectrômetros, exigindo limpeza da tocha, tubulações e da interface frequentemente, além de causar interferências na intensidade do sinal de emissão para determinação de alguns elementos. A metodologia desenvolvida neste trabalho apresentou acidez residual de  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ , valor esse associado ao uso do ácido nítrico diluído. A baixa acidez residual caracteriza essa metodologia com vantagens no quesito menor diluição das amostras com consequente maior poder de detecção, desde que comparado com metodologias que utilizam o ácido nítrico concentrado. Após avaliação, a metodologia desenvolvida foi então aplicada nas etapas seguintes do trabalho.

## 5.3 VALIDAÇÃO

### 5.3.1 LIMITES DE DETECÇÃO E DE QUANTIFICAÇÃO

Na Tabela 9, são apresentados os valores de limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) obtidos a partir do desvio padrão de 10 brancos analíticos para cobre, ferro e manganês após análise por ICP OES.

Tabela 9 - Parâmetros das curvas de calibração analíticas: coeficiente de correlação ( $R^2$ ) e limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) obtidos a partir da análise de 10 brancos analíticos para os microelementos estudados após determinação por ICP OES

Elemento	Curva analítica	$R^2$	Limite de detecção (mg kg <sup>-1</sup> )	Limite de quantificação (mg kg <sup>-1</sup> )
Cu	$y = 20466x + 1319,8$	0,9994	0,63	2,1
Fe	$y = 29888x + 684,25$	0,9997	4,3	14
Mn	$y = 145592x + 1476,7$	0,9999	0,37	1,2

A partir dos resultados, foi possível verificar que foram obtidos baixos valores de LD's e LQ's. Essa característica foi associada ao uso de ácido nítrico diluído e consequentemente de menores diluições. Outra avaliação foi realizada considerando o coeficiente de determinação, que evidenciou uma correlação satisfatória para todos os elementos estudados, uma vez que  $R^2$  apresentou valor maior que 0,999.

### 5.3.2 EXATIDÃO

A avaliação da exatidão do método proposto foi realizada a partir da decomposição do material de referência certificado NIST 1568b de farinha de arroz nas condições otimizadas. O objetivo de utilizar este material de referência deveu-se ao fato da origem vegetal e granulometria após moagem. Os resultados obtidos para Cu, Fe e Mn, após determinação por ICP OES são expressos com intervalo de confiança com nível de 95% de confiabilidade, estão apresentados na Tabela 10.

Ao comparar os dados obtidos com os valores certificados (após aplicação do método desenvolvido), verificou-se que não houve diferença significativa entre os resultados, o que pôde ser confirmado após comparação estatística usando o teste t pareado. Como o t calculado apresentou valor menor que o t tabelado, não há diferença significativa entre os valores obtidos para o método proposto e os valores certificados.

Tabela 10 - Concentrações obtidas a partir da análise do material de referência certificado de farinha de arroz (NIST 1568b) para Cu, Fe e Mn (média  $\pm$  intervalo de confiança, n=3)

Elemento	Concentração (mg kg <sup>-1</sup> )		Teste t pareado	
	Valor	Valor	t tabelado	t calculado
	Determinado	Certificado		
Cu	1,69 $\pm$ 0,50	2,35 $\pm$ 0,16		
Fe	7,78 $\pm$ 0,39	7,42 $\pm$ 0,44	2,77	1,00
Mn	18,4 $\pm$ 0,04	19,2 $\pm$ 1,80		

### 5.3.3 PRECISÃO

A avaliação da precisão, expressa com desvio padrão relativo do método, foi realizada para a amostra de castanha de caju contendo 10,7 mg kg<sup>-1</sup> de cobre, 44,3 mg kg<sup>-1</sup> de ferro e 11,0 mg kg<sup>-1</sup> de manganês. Foram obtidos valores de desvio iguais a 1,84%, 2,31% e 2,73% para Cu, Fe e Mn, respectivamente.

## 5.4 APLICAÇÃO NAS AMOSTRAS

O método proposto foi aplicado para a determinação de cobre, ferro e manganês em vinte e quatro amostras de castanhas de caju coletadas em feiras livres de quatro estados do Nordeste, que foram considerados previamente como participantes do grupo de maiores produtores. Sete amostras são da Bahia (identificadas como IOS, JQE, STAN, BUE, VITC, SSA, VAL), oito de Sergipe (SEG 1, SEG 2, SEG 3, SEG 4, SEG 5, SEG 6, SEG 7 e SEG 8), sete do Ceará (FOR 1, FOR 2, FOR 3, FOR 4, FOR 5, FOR 6, FOR 7) e duas de Alagoas (MAC 1 e MAC 2). Os resultados obtidos após digestão ácida das amostras em forno micro-ondas e análise por ICP OES são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 - Resultados de concentração de Cu, Fe e Mn ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) determinados por ICP OES em amostras de castanha de caju (média  $\pm$  intervalo de confiança,  $n=3$ )

Amostra	Cobre	Ferro	Manganês
IOS	13,3 $\pm$ 0,4	49,6 $\pm$ 1,7	15,2 $\pm$ 0,3
JQE	19,4 $\pm$ 1,6	58,9 $\pm$ 2,3	13,4 $\pm$ 0,6
STAN	14,0 $\pm$ 1,2	53,3 $\pm$ 0,7	15,0 $\pm$ 0,9
BUE	14,2 $\pm$ 1,3	56,4 $\pm$ 0,6	16,2 $\pm$ 1,1
VITC	16,7 $\pm$ 1,8	60,9 $\pm$ 1,0	15,0 $\pm$ 1,4
SSA	16,7 $\pm$ 0,2	52,6 $\pm$ 1,0	12,0 $\pm$ 1,0
VAL	10,7 $\pm$ 1,9	44,3 $\pm$ 2,3	11,0 $\pm$ 1,0
MAC 1	12,3 $\pm$ 1,9	49,9 $\pm$ 0,6	15,1 $\pm$ 0,9
MAC 2	17,8 $\pm$ 2,4	65,4 $\pm$ 8,0	12,8 $\pm$ 1,3
FOR 1	12,9 $\pm$ 0,5	48,4 $\pm$ 1,4	18,0 $\pm$ 0,6
FOR 2	16,7 $\pm$ 0,3	59,3 $\pm$ 1,9	12,7 $\pm$ 0,4
FOR 3	16,9 $\pm$ 0,2	66,7 $\pm$ 1,1	13,9 $\pm$ 0,4
FOR 4	17,6 $\pm$ 1,7	57,5 $\pm$ 1,2	12,8 $\pm$ 0,6
FOR 5	14,2 $\pm$ 3,2	56,2 $\pm$ 9,2	18,6 $\pm$ 2,6
FOR 6	17,1 $\pm$ 0,1	67,2 $\pm$ 1,5	21,4 $\pm$ 0,3
FOR 7	13,8 $\pm$ 1,2	64,2 $\pm$ 3,9	17,4 $\pm$ 1,1
SEG 1	11,5 $\pm$ 1,8	54,4 $\pm$ 1,1	21,3 $\pm$ 0,2
SEG 2	19,2 $\pm$ 1,6	62,4 $\pm$ 1,1	18,5 $\pm$ 0,8
SEG 3	11,5 $\pm$ 0,5	51,5 $\pm$ 0,4	14,3 $\pm$ 0,1
SEG 4	13,1 $\pm$ 1,4	47,9 $\pm$ 2,7	12,4 $\pm$ 1,4
SEG 5	11,9 $\pm$ 0,1	53,5 $\pm$ 2,4	11,1 $\pm$ 0,01
SEG 6	11,7 $\pm$ 0,5	50,9 $\pm$ 2,2	14,4 $\pm$ 1,7
SEG 7	13,2 $\pm$ 0,2	47,5 $\pm$ 0,9	11,6 $\pm$ 0,7
SEG 8	12,3 $\pm$ 1,0	54,6 $\pm$ 1,5	14,5 $\pm$ 1,4

As concentrações obtidas variaram entre 10,7 a 19,4  $\text{mg kg}^{-1}$  para cobre, 44,3 a 67,2  $\text{mg kg}^{-1}$  para ferro e 11,0 a 21,4  $\text{mg kg}^{-1}$  para manganês. A concentração desses elementos publicados na Tabela Brasileira de Composição dos Alimentos (TACO) é igual a 19,2  $\text{mg kg}^{-1}$  para Cu, 52,0  $\text{mg kg}^{-1}$  para Fe e 15,9  $\text{mg kg}^{-1}$  para Mn [53]. A variação observada entre as concentrações dos analitos no conjunto de amostras e os dados apresentados na literatura pode ser associada ao conteúdo desses minerais nos solos de cada estado, uma vez que ocorre a absorção de parte desses nutrientes por meio das plantas.

Ao comparar as concentrações totais de Cu, Fe e Mn presentes nas amostras de castanha de caju com os valores de referência para ingestão de nutrientes, obtidos a partir da “Dietary Reference Intakes (DRI)” e adotados pelos Estados Unidos, estima-se que ao consumir cerca de 100 g de castanha haverá o fornecimento de 119% a 216% de Cu, 55% a 84% de Fe, 48% a 93% de Mn para homens e 61% a 119% de Mn para mulheres, para a manutenção diária das necessidades nutricionais humanas [54]. No entanto, a determinação do conteúdo total de um nutriente presente em um alimento não revela o seu valor nutricional, isso porque, durante o processo de digestão humana, apenas uma fração desse nutriente é liberada para absorção pelo organismo. Sendo assim, para se estimar a quantidade de um nutriente que será absorvido pelo organismo é necessário que se empreguem ensaios *in vitro* ou *in vivo* para avaliar a biodisponibilidade destes analitos [52]. Os dados de concentração total obtidos neste trabalho já servem como ponto de partida para estudos mais elaborados do ponto de vista nutricional.

## 5.5 ANÁLISE EXPLORATÓRIA NÃO-SUPERVISIONADA

### 5.5.1 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS E ANÁLISE DE AGRUPAMENTO HIERÁRQUICO

Análise de componentes principais (PCA) foi aplicada nos valores de concentração total de Cu, Fe e Mn obtidos a partir da aplicação do método desenvolvido no presente trabalho nas amostras de castanha de caju provenientes dos maiores estados produtores do Nordeste. Na Tabela 12, são apresentados os resultados dos autovalores, assim como a porcentagem de variância explicada por cada componente e a variância acumulada pelas mesmas.

Na PCA realizada, foram considerados três fatores devido às três variáveis estudadas. Entretanto, devem ser incluídas na análise apenas as componentes que conseguem sintetizar uma variância acumulada em torno de 70% [39]. A primeira componente representa 61,03% da variação total dos dados, a segunda 31,83% e a

terceira 7,14%. Como pode ser observado, as duas primeiras componentes são responsáveis por mais de 92% das variações de todos os dados fornecidos.

Tabela 12 - Autovalores e percentual da variância explicada para cada componente

Número de componentes	Autovalores – Extração dos componentes principais			
	Autovalores	% da variância explicada	Autovalores acumulados	% da variância acumulada
1	1,831	61,03	1,831	61,03
2	0,9549	31,83	2,786	92,87
3	0,2140	7,14	3,000	100,0

De acordo com a literatura, a seleção das componentes para análise também pode ser feita a partir dos autovalores. Nesse caso, apenas as componentes que apresentassem autovalores superiores a um seriam incluídas na análise [39]. Essa informação corrobora o que já foi discutido acima, deixando claro que no experimento realizado as duas primeiras componentes conseguem resumir a maioria das informações contidas no conjunto de dados.

Na Tabela 13 está apresentada a matriz dos pesos, na qual é possível verificar as variáveis que melhor se correlacionam com cada componente. De acordo com a literatura, um valor é considerado como significativo quando maior que 0,70 [39].

Tabela 13 - Valores dos pesos nas componentes principais (PC)

Variável	PC1	PC2	PC3
Cu	<b>0,85</b>	-0,43	0,30
Fe	<b>0,94</b>	-0,043	-0,33
Mn	0,46	<b>0,88</b>	0,13

Por explicarem a maior variância obtida no estudo, apenas as duas primeiras componentes foram utilizadas. A componente 1 explica 61% dos dados, sendo Cu e Fe as variáveis que mais contribuem para este fator. Já a componente 2 explica 31%

dos dados, sendo Mn a variável que mais contribui. A Figura 6 apresenta o gráfico no qual é possível examinar a localização das variáveis e amostras no sistema de coordenadas criado pelas componentes.

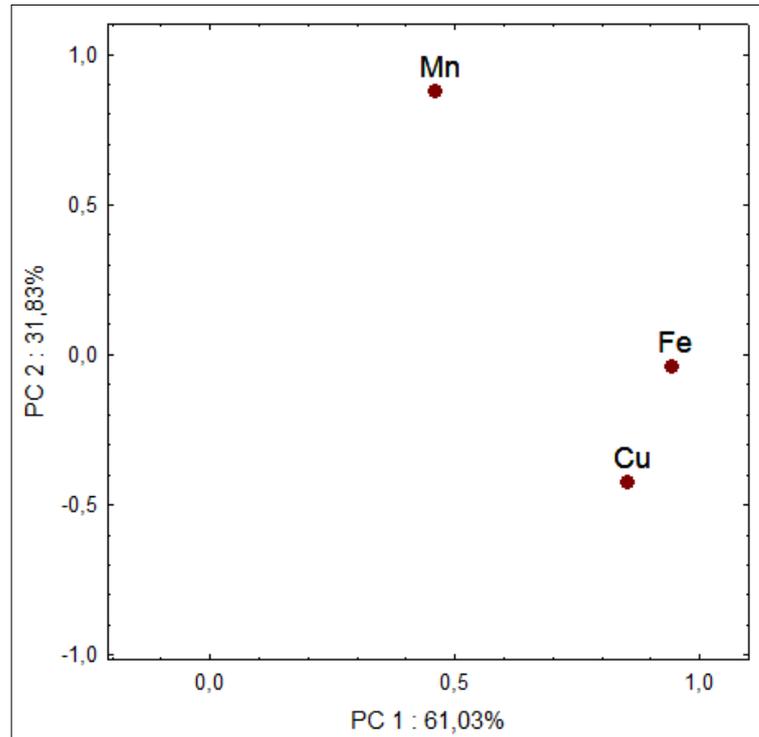


Figura 6 - Gráfico que representa a relação entre os dois fatores (PC1 e PC2) e as variáveis estudadas

A Figura 6 representa o gráfico de pesos, mostrando que em PC1 foi possível separar todas as variáveis (Cu, Fe e Mn) com pesos positivos, enquanto que em PC2 foi possível separar Cu e Fe com pesos negativos e Mn com peso positivo.

A Figura 7 apresenta o gráfico onde é possível examinar a localização das amostras no sistema de coordenadas criado pelas componentes.

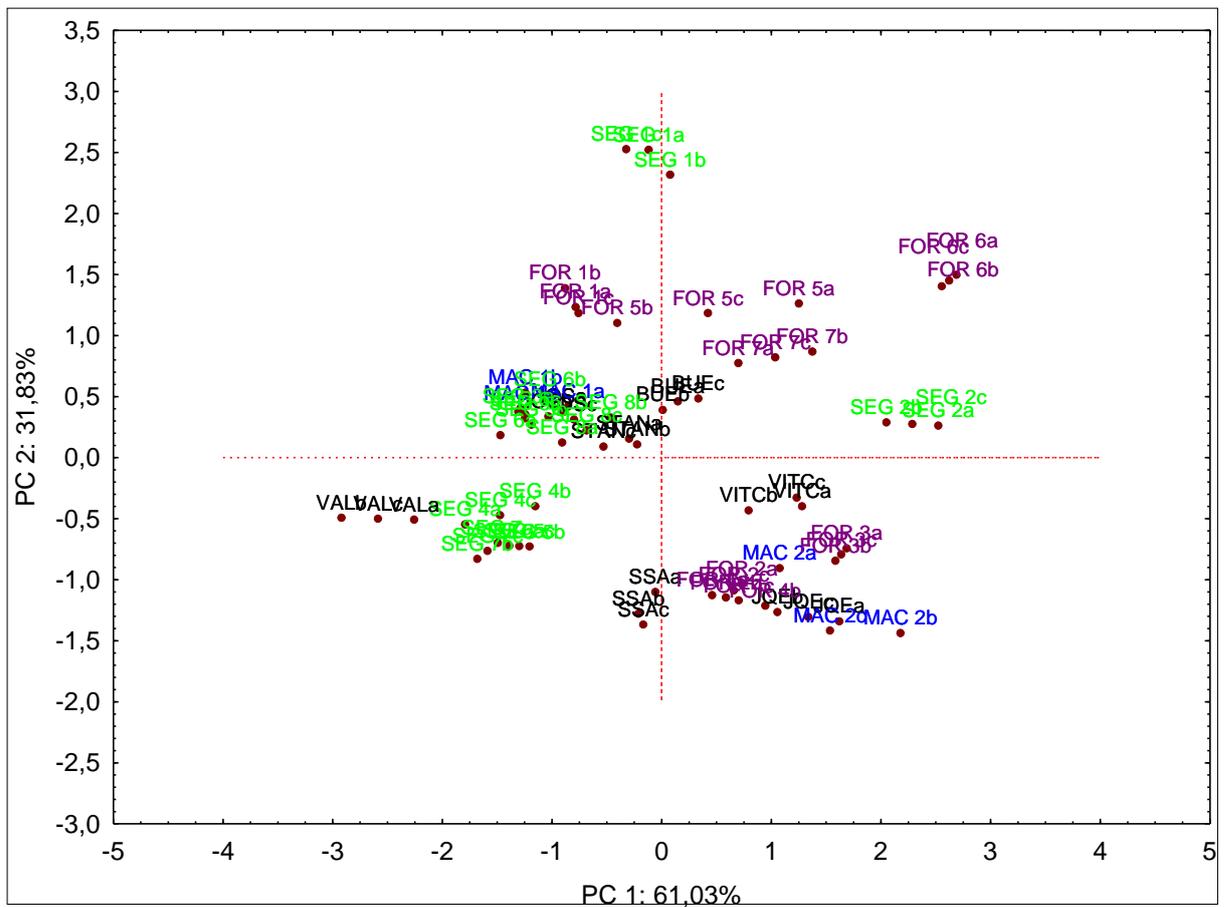


Figura 7 - Gráfico de escores considerando as duas componentes (PC1 x PC2) obtidas para as amostras de castanha de caju com as variáveis estudadas

A análise do gráfico de escores permite inferir que não houve uma tendência na formação de grupos a partir do conjunto de amostras.

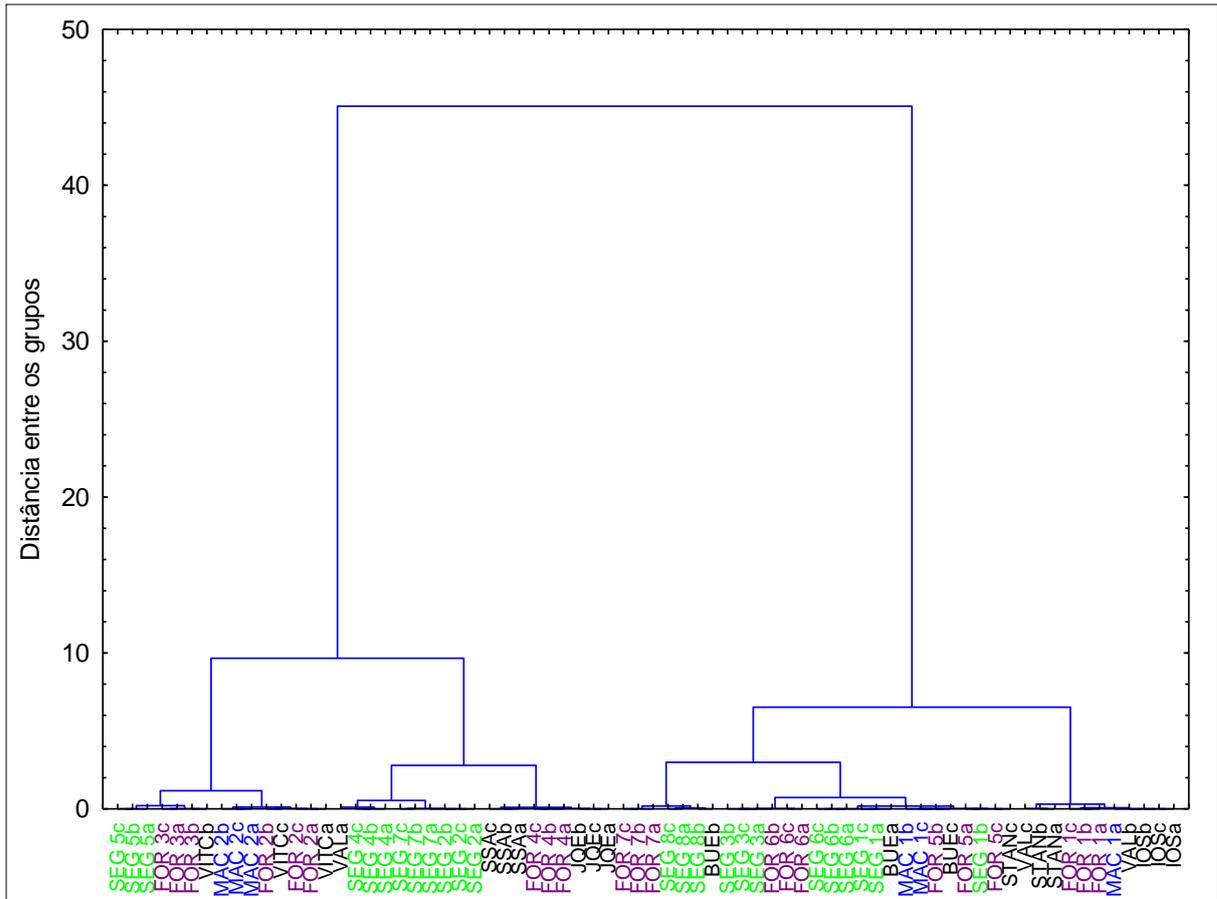


Figura 8 - Dendrograma da matriz de distâncias obtido pelo método de agrupamento por ligação simples

A Figura 8 apresenta o dendrograma obtido com os dados experimentais. Esse dendrograma leva em consideração os pares de objetos mais similares, ou seja, com a menor distância entre eles para que depois esses objetos se reúnam em razão de similaridade decrescente [39].

Para a construção do dendrograma, foi utilizado como medida de distância a 1-Pearson  $r$  e agrupamento por método de Ward. Traçando-se uma linha fenon a uma distância de metade da distância total, é possível observar a formação de dois grupos.

### 5.5.2 REDES NEURAI ARTIFICIAIS

Redes neurais artificiais também foram empregadas no conjunto de dados do presente trabalho. Isso porque, a geração de mapas topológicos da rede Kohonen pode traduzir informações menos visíveis a outras ferramentas, como PCA e HCA.

Após a otimização dos parâmetros da rede no qual foram feitos inúmeros treinamentos com diferentes dimensões de matrizes e outros parâmetros, a fim de reduzir o índice de DB e maximizar o valor médio das silhuetas, obteve-se índices de 0,6060 e 0,7290, respectivamente. A Tabela 14 apresenta a melhor configuração obtida para a rede Kohonen.

Tabela 14 - Parâmetros de treinamento da rede Kohonen

Parâmetros de Treinamento	
Matrix topológica	4x8
Formato da matrix	hexagonal
Função que limita a vizinhança	gaussiana
Raio de treinamento 1 inicial	4
Raio de treinamento 1 final	2
Amostras treinamento1	10
Raio de treinamento 2 inicial	1
Raio de treinamento 2 final	1
Amostras treinamento 2	15

A rede de Kohonen implementada possui duas fases de treinamento, a primeira serve para fazer auto-organização, ordenando os grupos. Já a segunda é a fase de convergência, na qual ocorre o refinamento do mapa, levando a uma representação mais acurada entre o espaço de entrada e a rede neural.

Juntamente com o algoritmo de Kohonen foi implementado um programa de partição k-means, com o intuito de averiguar a clusterização do mapa U-matrix

tornando possível estimar a quantidade de cluster e obter uma melhor percepção de onde os grupos estão presentes. A Figura 9 apresenta o gráfico U-matrix e o gráfico obtido após a aplicação do algoritmo K-Means.

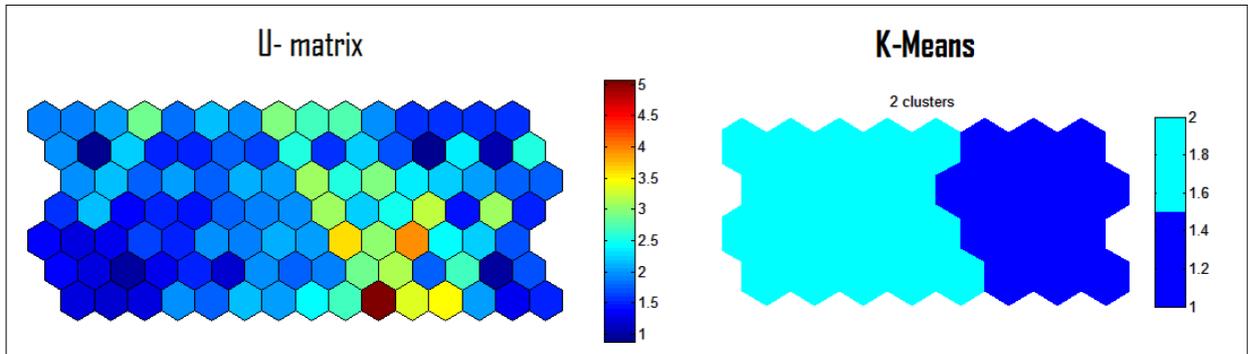
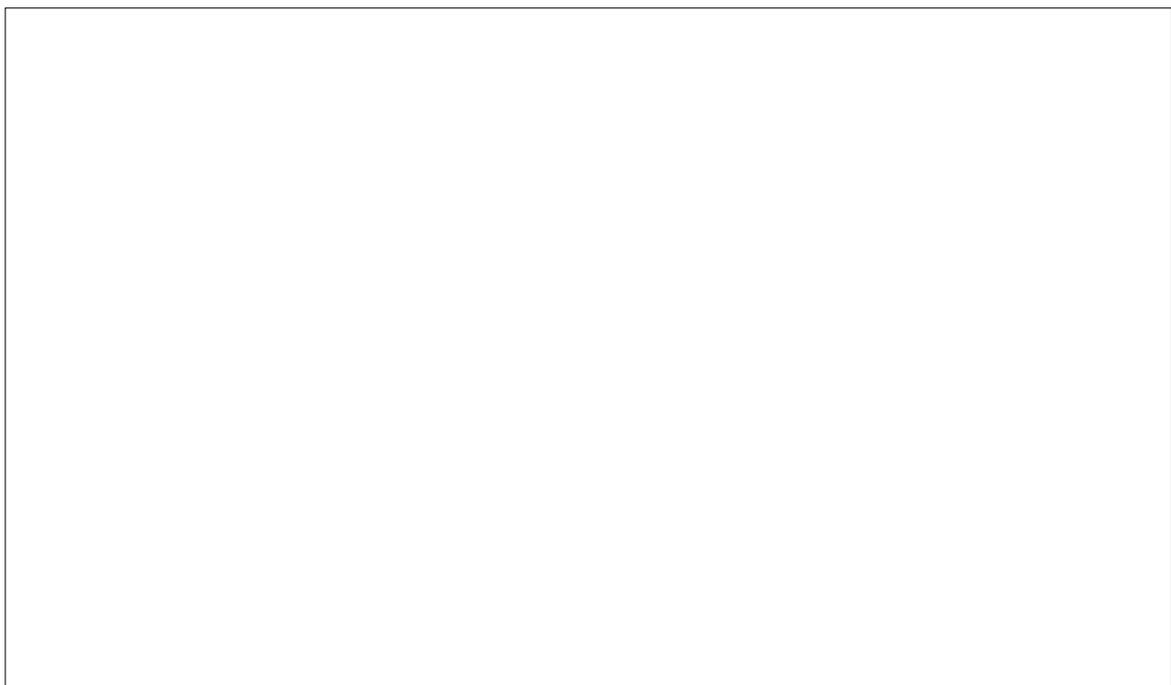


Figura 9 - A esquerda temos o Gráfico U-matrix e a direita o Gráfico obtido depois da partição K-means

Como pode se notar, houve a partição em dois grupos distintos corroborando com os resultados obtidos na PCA e HCA. Na sequência, foram plotados os planos de componente das variáveis analisadas (Figura 10).



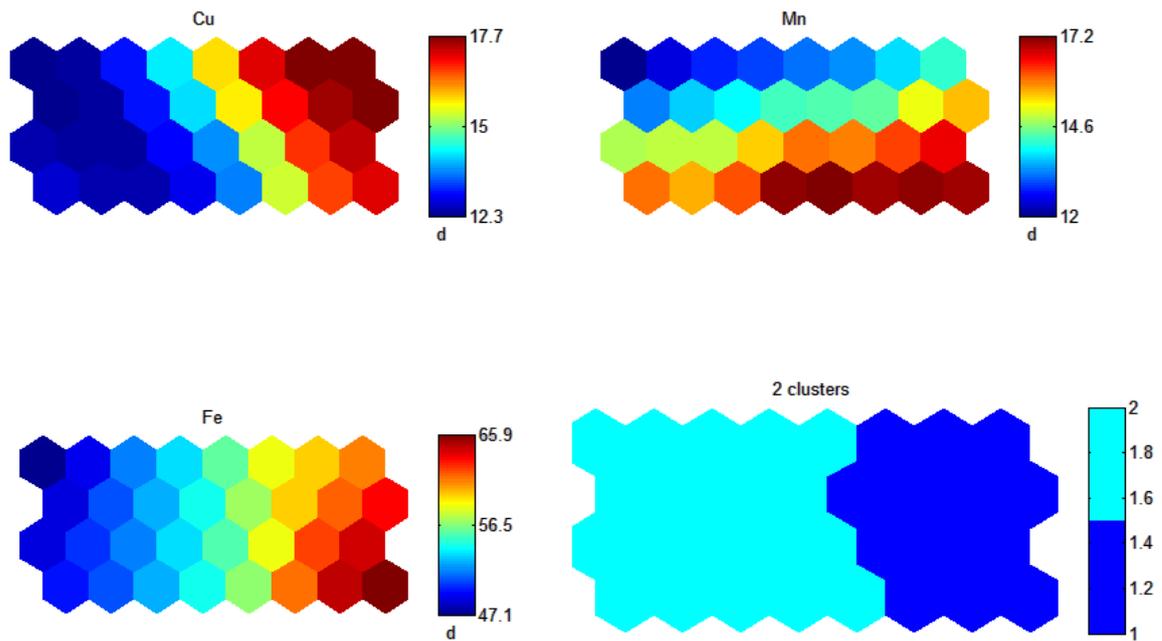


Figura 10 - Planos de componentes dos dados analisados, juntamente com o gráfico de separação de clusteres as amostras no mapa topológico, junto com os planos de componente, de cada variável.

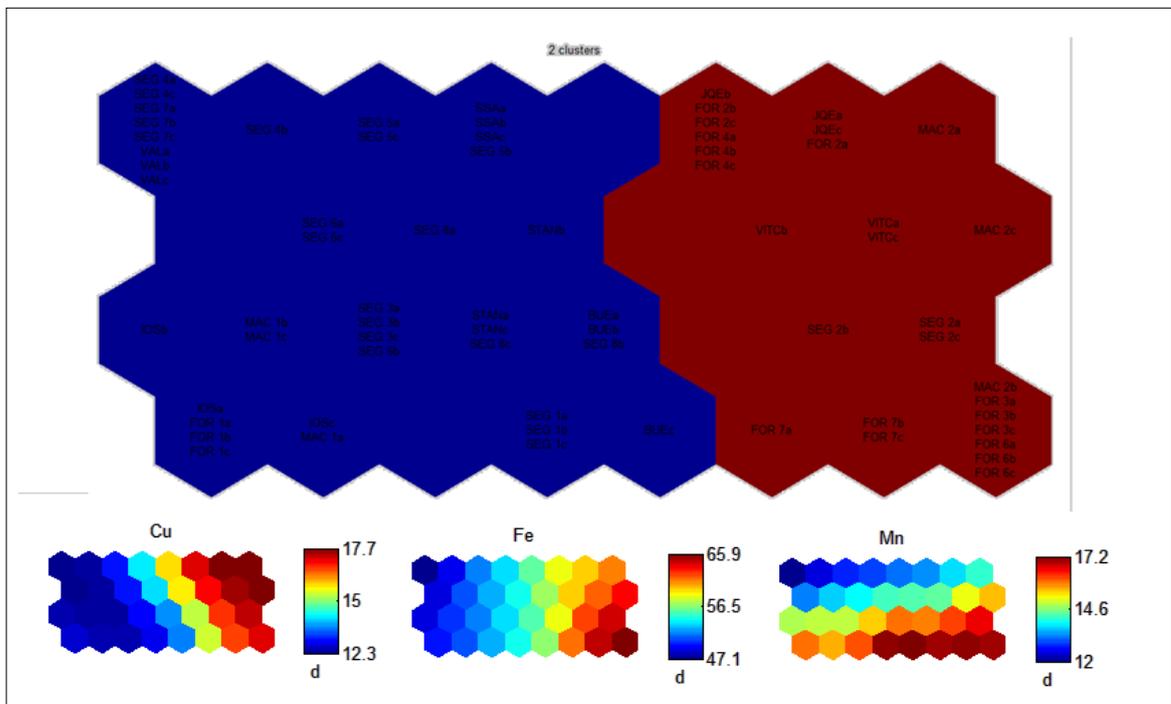


Figura 11 - Disposição das amostras no mapa da rede e planos de componentes dos elementos estudados

Pode-se constatar que nos gráficos de cobre e ferro, na divisa entre os agrupamentos, as amostras apresentam concentração próxima a média e ao passo que se avança para as extremidades nota-se uma mudança gradual de cores se intensificando.

Em direção ao lado esquerdo as concentrações vão diminuindo, enquanto que para o lado direito as concentrações vão aumentando. Deduzimos então que o grupo em azul, do gráfico maior, corresponde as amostras com as menores concentrações de cobre e ferro. Em destaque as amostras de VAL e as amostras 4 e 7 de SEG, que estão relacionadas com o neurônio do canto superior esquerdo, o qual observa-se (no gráfico de componentes) a cor azul mais intensa, cuja concentração de Cu foi de aproximadamente  $11 \text{ mg kg}^{-1}$  e de Fe próximo a  $45 \text{ mg kg}^{-1}$ .

Já o grupo em vermelho, selecionou as amostras com as maiores concentrações de Cu e Fe, sendo que no canto superior direito, as amostras de MAC e JQE representam as de maior concentração de Cu, em torno de  $19 \text{ mg kg}^{-1}$ . E as do canto inferior direito, as maiores concentrações de Fe, representadas por 3 exemplares de Fortaleza, com cerca de  $67 \text{ mg kg}^{-1}$ .

No plano de componentes do manganês, as maiores concentrações situam-se nas zonas inferiores da figura, principalmente do lado direito. Amostras tanto do grupo em azul, quanto do vermelho possuem valores de concentração mais altos, não obtendo um padrão tão nítido como nas componentes anteriores.

Como visto na PCA, a variável manganês não exerce tanta influência na separação em grupos como cobre e ferro. Sendo assim, a divisão dos grupos não acompanhou de maneira muito significativa a variação desse elemento. Para ele, as maiores concentrações foram obtidas em exemplares de amostras em FOR e SEG com valores de concentração em torno de  $21 \text{ mg kg}^{-1}$ . Enquanto que as menores, mais uma vez, estão relacionadas ao neurônio do canto superior esquerdo, onde amostras de VAL e dois exemplares de SEG aparecem com concentração em torno de  $11 \text{ mg kg}^{-1}$ .

Analisando em termos de divisão geográfica, não foi possível determinar um padrão, pois tanto no grupo azul quanto no vermelho possuem amostras dos 4 estados analisados.

Os estados do Ceará e Sergipe por exemplo, apresentam amostras espalhadas pelo mapa, principalmente nas extremidades opostas. Isso indica que, ao mesmo tempo, têm-se exemplares com maiores e menores concentrações do mesmo estado. O que pode ser observado nas amostras: SEG 2 (a; b; c) em relação as demais. E as amostras de FOR 3 (a;b;c) e FOR 6 (a;b;c) em relação as amostras FOR 1 (a;b;c), o que nos leva a considerar outros fatores, além do solo, para explicar essa diversidade na composição mineral.

Quanto a qualidade da separação, utilizou-se o índice de Silhueta para avaliar a pertinência da amostra classificada em seu respectivo grupo. Um gráfico com os índices de cada amostra foi plotado, obtendo-se a resposta apresentada na Figura 12.

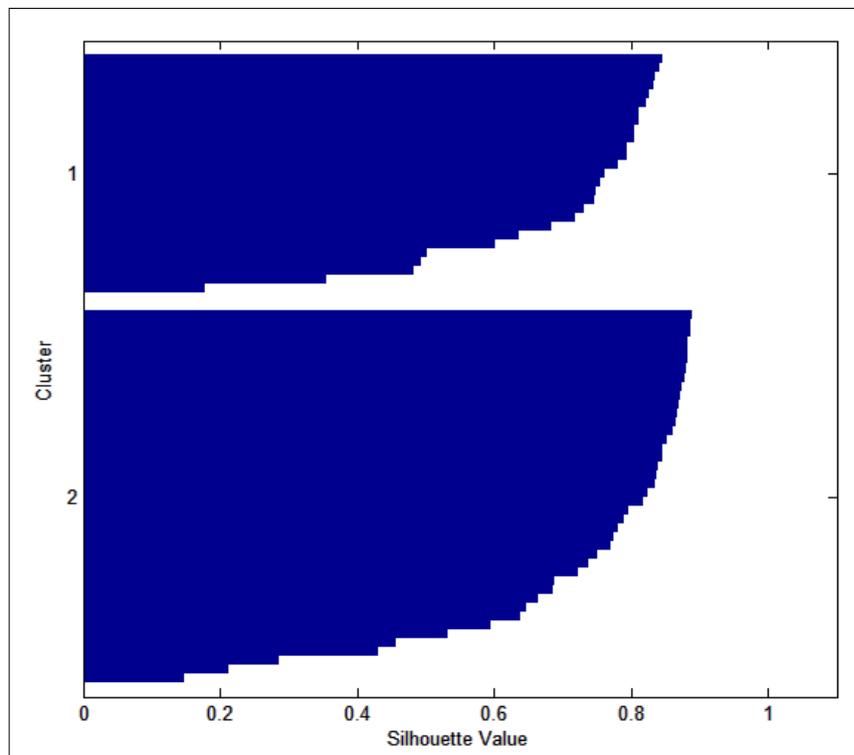


Figura 12 - Gráfico com os valores dos índices de silhueta

A média dos índices ficou em torno de 0,7290, indicando uma separação satisfatória dos grupos. Ainda se pode observar que algumas amostras apresentaram valores menores que 0,5. Estas amostras estão situadas na divisa dos grupos no mapa SOM, próximo da linha vertical na PCA e possuem concentrações medianas dos elementos estudados. Logo, possuem características bem

diferenciadas da maioria das amostras do seu respectivo grupo, porém não o suficiente para criação de um novo agrupamento.

As ferramentas quimiométricas utilizadas foram eficazes para o estabelecimento de uma mistura satisfatória entre os reagentes  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$  para a determinação de elementos essenciais em castanhas de caju.

O método de decomposição ácida assistida por radiação micro-ondas com ácido nítrico diluído foi considerado adequado para a decomposição das amostras de castanha. A decomposição dessas amostras resultou em digeridos finais sem partículas dispersas, límpidos e com baixa acidez residual.

A avaliação do teor de nutrientes forneceu informações acerca da composição elementar da amostra, porém, o valor nutricional deste alimento só pode ser verificado quando se realizam ensaios *in vitro* e/ou *in vivo*.

A redes neurais são importantes ferramentas para o auxílio no tratamento de dados, principalmente por trazer alternativas de respostas não tão convencionais (como PCA e HCA). Particularmente, a rede de Kohonen é uma das que oferecem o melhor recurso, onde os mapas topológicos podem traduzir informações menos visíveis do que os apresentados por métodos estatísticos. Para qualificar a separação, utilizou-se os índices DB e SIL. O menor valor de DB encontrado foi 0,6060, juntamente com o maior DB 0,7290. Indicando assim uma separação satisfatória, visto que, o valor máximo para o índice DB é 1.

Nos resultados obtidos, houve a separação em dois grupos, como era esperado. A distribuição das amostras no mapa facilitou a visualização das amostras com maiores e menores concentrações de Cu, Fe e Mn, além de mostrar a tendência de aproximação de dados semelhantes, bem como indicar a influência das variáveis Cobre e Ferro na formação dos grupos. Não foi possível averiguar um padrão de concentração de acordo com a distribuição geográfica, pois amostras como as de FOR e SEG apresentaram concentrações tanto mínimas quanto máximas para os elementos estudados, podendo ser oriundas de cidades do interior daqueles estados.

Por fim, o método proposto neste trabalho para a determinação de Cu, Fe e Mn em castanhas de caju por ICP OES foi considerado adequado, empregando a decomposição ácida assistida por micro-ondas com ácido nítrico diluído.

## 7 SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

---

Como sugestões de trabalhos futuros, tem-se:

Avaliação da biodisponibilidade nas amostras de castanha de caju para os elementos estudados, a partir da simulação gastrointestinal *in vitro*, com a finalidade de estabelecer as recomendações de ingestão alimentar e necessidades do organismo, além da avaliação do risco químico para os seres humanos.

Comparação do método desenvolvido com os diferentes métodos de preparo de amostra, como extração empregando banho ultrassônico e digestão em bloco digestor com dedo frio, para verificar a eficiência do método proposto.

Aplicação do método desenvolvido no presente trabalho na avaliação da composição mineral da castanha de caju ao longo da sua cadeia de produção, com o intuito de verificar o quão o processo de beneficiamento influencia na biodisponibilidade desses elementos essenciais.

[1] Alimentação saudável e sustentável. Brasília: **MEC: Ministério da Educação – Secretaria de educação Básica** / Governo Federal, p. 92, 2007.

[2] Banco de alimentos e colheita urbana: Noções básicas sobre alimentação e nutrição. Rio de Janeiro: **SESC – Serviço Social do Comércio** / Departamento Nacional, p. 20, 2003.

[3] HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; de FÁTIMA, A. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, p. 1170-1179, 2008.

[4] NASCIMENTO, A. N.; NAOZUKA, J.; OLIVEIRA, P. V. *In vitro* evaluation of Cu and Fe bioavailability in cashew nuts by *off-line* coupled SEC-UV and SIMAAS. **Microchemical Journal**, v. 96, p. 58-63, 2010.

[5] KRUG, F. J. **Métodos de Preparo de Amostras – Fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar**. In: VI Workshop sobre Preparo de Amostras, Santa Maria, 6ª edição, 2006.

[6] SANZ-MENDEL, A. Toxic trace metal speciation: importance and tools for environmental and biological analysis. **Pure & Applied Chemistry**, v. 70, p. 2281-2285, 1998.

[7] de OLIVEIRA, V. H. Cajucultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, p.001-284, 2008.

[8] CORREIA, S. J.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Metabólitos secundários de espécies de Anacardiaceae. **Química Nova**, v. 29, p. 1287-1300, 2006.

[9] MAZZETTO, S. E.; LOMONACO, D.; MELE, G. Óleo da castanha de caju: oportunidades e desafios no contexto do desenvolvimento e sustentabilidade industrial. **Química Nova**, v. 32, p. 732-741, 2009.

[10] NAIR, K. P. P. **The Agronomy and Economy of Important Tree Crops of the Developing World**. 1ª Edição, p. 21-66, 2010.

---

[11] Alimentos regionais brasileiros. Brasília: **Ministério da Saúde – Secretaria de Políticas da Saúde – Coordenação Geral da Política de Alimentação e Nutrição** / Governo Federal, p.53, 2002.

[12] Disponível em: <http://sindicaju.org.br/perfil-do-setor/perfil-do-setor/>. Acesso em 07/07/2016.

[13] Disponível em:  
<<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/caju/arvore/CONT000g09uej7x02wx5ok026zxpqtyp1u6g.html>>. Acesso em 23/09/2015.

[14] Disponível em:  
<<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/caju/arvore/CONT000fyr9ldm402wx5ok0pvo4k3azmedk1.html>>. Acesso em 23/09/2015.

[15] Disponível em:  
<<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/prevsaf/default.asp?t=4&z=t&o=26&u1=3&u2=1&u3=1&u4=1>>. Acesso em 24/09/2015.

[16] FREITAS, J. B.; NAVES, M. M. V. Composição química de nozes e sementes comestíveis e sua relação com a nutrição e saúde. **Revista de Nutrição**, v. 23, p. 269-279, 2010.

[17] NAOZUKA, J. **Especiação química elementar em castanha-do-pará, coco e cupuaçu**. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, 2008.

[18] **Dietary Reference Intakes (DRIs): Recommended Dietary Allowances and Adequate Intakes**. United States: United States Department of Agriculture (USDA), 2001.

[19] CILLA, A.; ZANIRATO, V.; RODRIGUEZ-ESTRADA, M. T.; GARCIA-LLATAS, G. Nutritional Hazards: Micronutrients: vitamins and minerals. **Encyclopedia of Food Safety**, v. 3, p. 86-94, 2014.

[20] GUPTA, U. C.; GUPTA, S. C. Sources and deficiency diseases of mineral nutrients in human health and nutrition: a review. **Pedosphere**, v. 24, p. 13-38, 2014.

---

[21 ] FERREIRA, S. L. C.; MIRÓ, M.; da SILVA, E. G. P.; MATOS, G. D.; dos REIS, P. S.; BRANDÃO, G. C.; dos SANTOS, W. N.L.; DUARTE, A. T.; VALE, M. G. R.; ARAÚJO, R. G. O. Slurry Sampling – An Analytical Strategy for the Determination of Metals and Metalloids by Spectroanalytical Techniques. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 45, p. 44-62, 2010.

[22] CARVALHO MAGALHÃES, C. E. de; ARRUDA, M. A. Z. Amostragem de suspensões: emprego da técnica na análise direta de amostras. **Química Nova**, v. 21, p. 459-466, 1998.

[23] ARRUDA, M. A. Z.; SANTELLI, R. E. Mecanização no preparo de amostras por micro-ondas: o estado da arte. **Química Nova**, v. 20, p. 638-643, 1997.

[24] BIZZI, C. A.; NÓBREGA, J. A.; BARIN, J. S. Chapter 6 – Diluted Acids in Microwave-Assisted Wet Digestion. **Microwave-Assisted Sample Preparation for Trace Element Determination**, p. 179-204, 2014.

[25] DUGO, G.; Di BELLA, G.; RANDO, R.; SAITTA, M. 4.22 – Sample Preparation for the Determination of Metals in Food Samples. **Comprehensive Sampling and Sample Preparation**, v. 4, p. 495-519, 2012.

[26] GONZALEZ, M. H.; SOUZA, G. B.; OLIVEIRA, R. V.; FORATO, L. A.; NÓBREGA, J. A.; NOGUEIRA, A. R. A. Microwave-assisted digestion procedures for biological samples with diluted nitric acid: identification of reaction products. **Talanta**, v. 79, p. 396-401, 2009.

[27] 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 elements analysis of edible soybean products. **Food Chemistry**, v. 175, p. 212-217, 2015.

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

[29] BIZZI, C. A.; NÓBREGA, J. A.; BARIN, J. S.; OLIVEIRA, J. S. S.; SCHMIDT, L.; MELLO, P. A.; FLORES, E. M. M. Effect of simultaneous cooling on microwave-assisted wet digestion of biological samples with diluted nitric acid and O<sub>2</sub> pressure. **Analytica Chimica Acta**, v. 837, p. 16-22, 2014.

---

[30] FERREIRA, S. L. C. **Introdução às Técnicas de Planejamento de Experimentos**. Salvador: Vento Leste, 2015.

[31] CALADO, V.; MONTGOMERY, D. C. **Planejamento de Experimentos usando *Statística***. Rio de Janeiro: E-Papers Serviços Editoriais, 2003.

[32] NOVAES, C. G. **Aplicação de técnicas quimiométricas na otimização de métodos usando a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado e espectrometria de absorção atômica com chama visando a análise de amostras ambientais**. Tese de Doutorado, Universidade Federal da Bahia, 2011.

[33] FERREIRA, S. L. C.; BRUNS, R. E.; da SILVA, E. G. P.; dos SANTOS, W. N. L.; QUINTELLA, C. M.; DAVID, J. M.; de ANDRADE, J. B.; BREITKREITZ, M. C.; JARDIM, I. C. S. F.; NETO, B. B. Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, p. 2-14, 2007.

[34] FERREIRA, S. L. C.; KORN, M. D. G. A.; FERREIRA, H. S.; da SILVA, E. G. P.; ARAUJO, R. G. O.; SOUZA, A. S.; MACEDO, S. M.; LIMA, D. D. C.; de JESUS, R. M.; AMORIM, F. A. C.; BOSQUE-SENDRA, J. M. Application of multivariate techniques in optimization of spectroanalytical methods. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 42, p. 475-491, 2007.

[35] TARLEY, C. R. T.; SILVEIRA, G.; dos SANTOS, W. N. L.; MATOS, G. D.; da SILVA, E. G. P.; BEZERRA, M. A.; MIRO, M.; FERREIRA, S. L. C. Chemometric tools in electroanalytical chemistry: Methods for optimization based on factorial design and response surface methodology. **Microchemical Journal**, v. 92, p. 58-67, 2009.

[36] PEREIRA FILHO, E. R. **Planejamento fatorial em química: maximizando a obtenção de resultados**. São Carlos, São Paulo: EdUFSCar, 2015.

[37] NETO, J. M. M.; MOITA, G. C. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. **Química nova**, v. 21, n. 4, p. 467-469, 1997.

[38] PIMENTEL, M. F.; BARROS NETO, B. de. Calibração: uma revisão para químicos analíticos. **Química Nova**, n. 19. v. 3, p. 268-277, 1995.

---

[39] VICINI, L.; SOUZA, A. M. **Análise Multivariada da Teoria à Prática**. Santa Maria, 2005.

[40] FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; VOLPE, P. L. O. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, v. 22, p. 724-731, 1999.

[41] de SENA, M. M.; POPPI, R. J. Avaliação do uso de métodos quimiométricos em análise de solos. **Química Nova**, v. 23, p. 547-556, 2000.

[42] HAYKIN, S. **Redes Neurais - Princípios e Aplicações**. 2ª Ed. Bookman, Porto Alegre, 2001.

[43] SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análisis Instrumental**. 5ª ed. Madrid – España, 2001.

[44] GINÉ-ROSIAS, M. F. **Espectrometria de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente (ICP-AES)**. Piracicaba, São Paulo, 1998.

[45] EVANS, E. H.; PISONERO, J.; SMITH, C. M. M.; TAYLOR, R. N. Atomic spectrometry update: review of advances in atomic spectrometry and related techniques. **J. Anal. At. Spectrom**, v. 31, p. 1057-1077, 2016.

[46] BARIN, J. S.; PEREIRA, J. S. F.; MELLO, P. A.; KNORR, C. L.; MORAES, D. P.; MESKO, M. F.; NÓBREGA, J. A. KORN, M. G. A.; FLORES, E. M. M. Focused microwave-induced combustion for digestion of botanical samples and metals determination by ICP OES and ICP-MS. **Talanta**, v. 94, p. 308-314, 2012.

[47] PEREIRA, J. S. F.; PEREIRA, L. S. F.; SCHMIDT, L.; MOREIRA, C. M.; BARIN, J. S.; FLORES, E. M. M. Metals determination in milk powder samples for adult and infant nutrition after focused-microwave induced combustion. **Microchemical Journal**, v. 109, p. 29-35, 2013.

[48] WELNA, M.; KLIMPEL, M.; ZYRNICKI, W. Investigation of major and trace elements and their distributions between lipid and non-lipid fractions in Brazil nuts by inductively coupled plasma atomic optical spectrometry. **Food Chemistry**, v. 111, p. 1012-1015, 2008.

---

[49] MELLO, P. A.; PEREIRA, J. S. F.; MESKO, M. F.; BARIN, J. S.; FLORES, E. M. M. Sample preparation methods for subsequent determination of metals and non-metals in crude oil – A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 746, p. 15-36, 2012.

[50] LEPRI, F. G.; CHAVES, E. S.; VIEIRA, M. A.; RIBEIRO, A. S.; CURTIUS, A. J.; de OLIVEIRA, L. C. C.; de CAMPOS, R. C. Determination of trace elements in vegetable oils and biodiesel by atomic spectrometric techniques - A review. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 46, p. 175-206, 2011.

[51] MOREDA-PIÑEIRO, J.; HERBELLO-HERMELO, P.; DOMÍNGUEZ-GONZÁLEZ, R.; BERMEJO-BARRERA, P.; MOREDA-PIÑEIRO, A. Bioavailability assessment of essential and toxic metals in edible nuts and seeds. **Food Chemistry**, v. 205, p. 146-154, 2016.

[52] NASCIMENTO, A. N.; NAOZUKA, J.; OLIVEIRA, P. V. *In vitro* evaluation of Cu and Fe bioavailability in cashew nuts by *off-line* coupled SEC-UV and SIMAAS. **Microchemical Journal**, v. 96, p. 58-63, 2010.

[53] **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos** – 4<sup>a</sup> ed. rev. e ampl. São Paulo, Campinas: NEPA – UNICAMP, 2011.

[54] **Dietary Reference Intakes (DRIs): Recommended Dietary Allowances and Adequate Intakes**. United States: United States Department of Agriculture (USDA), 2001.