



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

VINÍCIUS CÂMARA COSTA

**Estratégias de preparo de amostras de produtos da mandioca (*Manihot esculenta*
Crantz) usando ácidos diluídos para determinação de elementos nutrientes por
espectrometria atômica**

ILHÉUS - BAHIA

2015

VINÍCIUS CÂMARA COSTA

Estratégias de preparo de amostras de produtos da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) usando ácidos diluídos para determinação de elementos nutrientes por espectrometria atômica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Estadual de Santa Cruz, como requisito para obtenção do grau de mestre em Química, área de concentração Química Analítica Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Alan Carqueja Amorim

ILHÉUS - BAHIA

2015

C837 Costa, Vinícius Câmara.
Estratégias de preparo de amostras de produtos da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) usando ácidos diluídos para determinação de elementos nutrientes por espectrometria atômica / Vinícius

Câmara Costa. – Ilhéus, BA: UESC, 2015.
110 f. : il.

Orientador: Fábio Alan Carqueja Amorim.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui referências.

1. Química analítica. 2. Ácidos – Análise. 3. Amido de mandioca. 4. Cascas de mandioca como ração. 4. Amostragem. I. Título.

CDD 543

VINICIUS CÂMARA COSTA

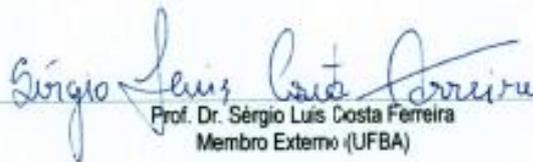
**ESTRATÉGIAS DE PREPARO DE AMOSTRAS DE PRODUTOS
DA MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz) USANDO ÁCIDOS
DILUÍDOS PARA DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS
NUTRIENTES POR ESPECTROMETRIA ATÔMICA**

Ilhéus-BA, 13 de julho de 2015

COMISSÃO EXAMINADORA:



Prof. Dr. Fábio Alan Carqueija Amorim
ORIENTADOR (UESC)



Prof. Dr. Sérgio Luis Costa Ferreira
Membro Externo (UFBA)



Prof. Dr. Ivon Pinheiro Lôbo
Membro Interno (UESC)

DEDICATÓRIA

A minha mãe Edilma e ao meu pai Valdinei por todo o amor e dedicação.

A toda minha família pelo incentivo.

A minha noiva Emanuelle pelo carinho e compreensão.

AGRADECIMENTOS

A **Deus** pelo amor incondicional, pela força, sustento e por estar presente constantemente em todos os momentos. O **Senhor** é imprescindível na minha vida.

Aos meus pais **Valdinei** e **Edilma**, pelo amor e dedicação. Vocês são a minha inspiração e a minha vida.

A minha noiva e amor da minha vida **Emanuelle**. Pela amizade, cumplicidade fidedigna e compreensão.

A todos os meus queridos familiares, **Valdinei, Marina, Vitor, Sonia, Celio, Laura, Felipe, Sueli, Samuel, Sandro, Gustavo**, e a todos os outros que não foram citados, pelo apoio e incentivo.

Ao **Prof. Dr. Fábio Alan Carqueija Amorim** por ter confiado na minha capacidade de realizar este trabalho, pela amizade, paciência, disponibilidade e brilhante orientação.

Aos **Professores. Dr. Antônio de Santana Santos, Dr. Erik Galvão Paranhos da Silva, Dr. Daniel de Castro Lima e Dr. Raildo Mota de Jesus**, pelos ensinamentos e valiosas conversas.

Aos companheiros do Laboratório de Água: **Wesley Guedes, Ivero Pita, Mayara Costa, Cayne Guimaraes, Marina de Jesus e Luciano Nascimento** pela imprescindível ajuda e socorro nos momentos difíceis.

Aos meus queridos amigos, **Luan, Pablo, Tiago Farias, Cayo, Tiago Damasceno, Wesley Guedes, Melise, Saulo, Thaise, Amélia e Madson**, e a todos os outros que não foram citados, pelo apoio e incentivo.

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

Ao Programa de Pós-graduação em Química (**PPGQUIM**) da UESC, pela oportunidade de aperfeiçoamento.

A **todos** que direta e indiretamente contribuíram para a concretização desse trabalho.

RESUMO

Neste trabalho, foram desenvolvidos dois procedimentos analíticos baseados em estratégias alternativas de preparo de amostras utilizando ácidos diluídos para determinação de elementos nutrientes em casca e goma de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) por espectrometria de absorção atômica com chamas (FAAS). O primeiro consiste no preparo de amostras de casca de mandioca usando ácidos diluídos para extração de metais assistida por ultrassom e radiação micro-ondas. As variáveis experimentais foram otimizadas utilizando metodologias univariada e multivariada (planejamento de mistura). As condições estabelecidas para o procedimento foram: concentração final da solução extratora de 2,5 mol L⁻¹; tempo de sonicação de 30 minutos; tempo de radiação em micro-ondas de 6 segundos, tempo de centrifugação de 5 minutos, e solução extratora composta pela mistura de 6,2 mL de HNO₃, 2,1 mL de HCl e 1,7 mL CH₃COOH para 200 mg de amostra. Nestas condições, foi possível determinar Ca, Mg, Cu, Mn, Fe e Zn com limites de quantificação, em mg kg⁻¹, de 34,7; 9,2; 1,7; 1,3; 5,3 e 5,6, respectivamente. A precisão, avaliada pelo desvio padrão relativo (RSD%) apresentou valores inferiores a 5,4 %. A exatidão foi confirmada pela análise do material de referência certificado (CRM) de folha de maçã (NIST 1515) e também por comparação com o procedimento de digestão total em forno micro-ondas com cavidade. O procedimento foi aplicado em amostras de casca de mandioca usadas na alimentação animal. No segundo procedimento, a amostragem de suspensão foi utilizada para determinação de Fe e Mg em amostras de goma de mandioca. As variáveis experimentais foram otimizadas utilizando metodologias univariada e multivariada (planejamento Box-Behnken), sendo as condições estabelecidas em: 200 mg de massa de amostra; solução dispersora composta por HNO₃:HCl (1:1) a uma concentração de 1,7 mol L⁻¹ em um tempo de 26 minutos de sonicação. O procedimento permitiu a determinação de Fe e Mg com limites de quantificação, em mg kg⁻¹, 2,36 e 7,85, precisão com valores inferiores a 5,8 %. A exatidão foi confirmada através da análise do CRM de farinha de trigo (NIST 1567a) e também por comparação com o procedimento de digestão total, e o procedimento foi aplicado em amostras de goma produzidas no Sul do Estado da Bahia, Brasil.

Palavras-chaves: Ácidos diluídos, casca de mandioca, amostragem de suspensão, goma de mandioca, elementos nutrientes.

ABSTRACT

In this work were developed analytical procedures based on alternative strategies for sample preparation for determination of nutrient elements in peel and gum of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) by flame atomic absorption spectroscopy (FAAS). The first was based in the preparation of cassava peel samples using diluted acids for metals extraction assisted by ultrasound and microwave. The experimental variables were optimized using univariate and multivariate methods (mixture of design). The conditions set for the procedure included: extractor concentration of 2.5 mol L⁻¹; sonication time of 30 minutes; microwave radiation time of 6 seconds; 5 minutes of centrifugation; extraction solution composed by mixture of HNO₃, HCl and CH₃COOH in the following proportions: 6.2; 2.3 and 1.7 mL, for 200 mg of sample. In these conditions, was allowed the determination of Ca, Mg, Cu, Mn, Fe and Zn with quantification limits in, mg kg⁻¹, of 34.7; 9.2; 1.7; 1.3; 5.3 and 5.6, for each element, respectively. The precision, availed by relative standard deviation (RSD%), was always below 5.4%. The accuracy was confirmed by analyzing the certified reference material (CRM) NIST 1515 apple leaves, and also relative to the total digestion procedure microwave oven cavity. The procedure was applied in cassava peel samples used in animal feed. In the second procedure, slurry sampling was used for determination of Fe and Mg in cassava starch samples. The experimental variables were optimized using univariate and multivariate methods (Box-Behnken design), it is established in: 200 mg sample mass; dispersive solution consisting of the mixture of HNO₃:HCl (1:1), dispersive solution concentration of 1.7 mol L⁻¹ and time 26 minutes sonication. The proposed procedure allowed the determination of Fe and Mg with quantification limits in, mg kg⁻¹, 2.36 and 7.85. The precision, expressed as RSD (%), was less than 5.8%. The accuracy of the procedure was confirmed by analyzing the CRM (NIST 1567a) wheat flour and also relative to the total digestion procedure microwave oven cavity, and the procedure was applied in gum samples produced in the southern of the Bahia state, Brazil.

Keywords: Diluted acids, cassava hull, slurry sampling, cassava starch, nutrient elements.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência nacional de vigilância sanitária
CE	Concentração da solução extratora
CRM	Material de referência certificado. Do inglês: <i>certified reference material</i>
CV AAS	Espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio. Do inglês: <i>vapor generation atomic absorption spectrometry</i>
Df	Grau de liberdade. Do inglês: <i>degree of freedom</i>
DG	Desejabilidade global
FAAS	Espectrometria de absorção atômica com chama. Do inglês: <i>flame atomic absorption spectrometry</i>
ET AAS	Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica. Do inglês: <i>electrothermal atomic absorption spectrometry</i>
GF AAS	Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite. Do inglês: <i>graphite furnace atomic absorption spectrometry</i>
HG AFS	Espectrometria de fluorescência atômica com geração de hidreto. Do inglês: <i>hydride generation atomic fluorescence spectrometry</i>
HG AAS	Espectrometria de absorção atômica com geração de hidreto. Do inglês: <i>hydride generation atomic absorption spectrometry</i>
HR-CS ET AAS	Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica de fonte contínua e alta resolução. Do inglês: <i>high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry</i>
HR-CS FAAS	Espectrometria de absorção atômica com chama de fonte contínua e alta resolução. Do inglês: <i>high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry</i>
ICP-MS	Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado. Do inglês: <i>inductively coupled plasma mass spectroscopy</i>
ICP OES	Espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado. Do inglês: <i>inductively coupled plasma optical emission spectrometry</i>
IDR	Índice diário recomendado

IUPAC	União internacional de química pura e aplicada. Do inglês: <i>international union of pure and applied chemistry</i>
LOD	Limite de detecção. Do inglês: <i>limit of detection</i>
LOQ	Limite de quantificação. Do inglês: <i>limit of quantitation</i>
MEV	Microscópio eletrônico de varredura
MQ _{ep}	Média quadrática do erro puro
MQ _{faj}	Média quadrática da falta de ajuste
MIP OES	Espectrômetro de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas. Do inglês: <i>microwave induced plasma with optical emission spectrometry</i>
MS	Média quadrática. Do inglês: <i>media of square.</i>
RCC	Teor de carbono residual. Do inglês: <i>residual carbon contente</i>
RSD	Desvio padrão relativo. Do inglês: <i>standard deviation relative</i>
SS	Soma quadrática. Do inglês: <i>sum of square</i>
TACO	Tabela de composição de alimentos
TE	Tipo de extrator
TS	Tempo de sonicação
VG-ICP-MS	Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado e com geração de vapor. Do inglês: <i>vapour generation inductive coupled plasma mass spectrometer.</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Efeito da cavitação acústica sobre o colapso das bolhas	37
Figura 2.	Região experimental do planejamento de misturas com restrições mínimas para cada componente.....	59
Figura 3.	Influência do tempo de sonicação sobre o sinal analítico.....	61
Figura 4.	Influência do tempo de radiação micro-ondas sobre o sinal analítico.....	62
Figura 5.	Resposta experimental em função da resposta prevista usando a DG para o modelo proposto.....	66
Figura 6.	Resposta prevista em função do resíduo usando a DG para o modelo proposto.....	67
Figura 7.	Gráfico de pareto para o planejamento de mistura usando o modelo proposto.	67
Figura 8.	Superfície de resposta (a) e gráfico de contorno (b), para o planejamento de mistura usando a DG para o modelo proposto.	68
Figura 9.	Perfis para valores preditos e desejabilidade individual e global na otimização das proporções de cada componente na mistura.	69
Figura 10.	Micrografias de uma amostra de goma de mandioca: (a) visão geral das partículas e dos aglomerados; (b) dimensão e formato das partículas.	80
Figura 11.	Influência da quantidade de massa no sinal analítico para o Fe e Mg.....	82
Figura 12.	Resposta experimental em função da resposta prevista usando a DG para o modelo proposto.....	85
Figura 13.	Resposta prevista em função do resíduo usando a DG para o modelo proposto.....	85
Figura 14.	Superfície de resposta (a) e gráfico de contorno (b), para tipo de extrator e concentração do extrator usando a DG para o modelo proposto.....	86
Figura 15.	Superfície de resposta (a) e gráfico de contorno (b), para tipo de extrator e tempo de sonicação usando a DG para o modelo proposto.	87
Figura 16.	Superfície de resposta (a) e gráfico de contorno (b), para concentração do extrator e tempo de sonicação usando a DG para o modelo proposto.	87
Figura 17.	Perfis para valores preditos e desejabilidade individual e global na otimização das variáveis estudadas.	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Composição centesimal de mandioca e seus produtos por 100 g de parte comestível de acordo os valores da TACO	20
Tabela 2.	Composição centesimal da casca e polpa da mandioca	21
Tabela 3.	Aplicação da decomposição assistida por radiação micro-ondas usando HNO ₃ diluído.	33
Tabela 4.	Aplicação do procedimento de extração assistida por ultrassom com ácidos diluídos.....	42
Tabela 5.	Aplicação do procedimento de amostragem de suspensão usando ácidos diluídos.....	52
Tabela 6.	Variáveis e níveis estudados no planejamento univariado.....	58
Tabela 7.	Matriz do planejamento de misturas (% de recuperação dos elementos), para otimização dos volumes das soluções ácidas.	64
Tabela 8.	ANOVA usando a DG para os modelos linear e quadrático, com um nível de confiança de 95 %.	65
Tabela 9.	Curvas analíticas obtidas com diferentes métodos de calibração.....	71
Tabela 10.	LOD e LOQ para o procedimento proposto.	72
Tabela 11.	RSD (%) para o procedimento proposto.....	73
Tabela 12.	Concentrações encontradas no CRM de folha de maçã NIST 1515 pelo procedimento proposto (média ± desvio padrão; n=3).....	74
Tabela 13.	Concentrações em uma amostra real determinada pelo procedimento proposto e pela decomposição total assistida por radiação micro-ondas (média ± desvio padrão; n=3).....	74
Tabela 14.	Concentrações encontradas em amostras reais utilizando o procedimento proposto (média ± desvio padrão; n=3).	75
Tabela 15.	Variáveis e níveis estudados no planejamento Box-Behnken.....	79
Tabela 16.	Matriz do planejamento Box-Behnken para otimização das variáveis envolvidas no procedimento de amostragem de suspensão e as respostas obtidas.	83
Tabela 17.	ANOVA usando a DG para o modelo quadrático, com um nível de confiança de 95 %.	84
Tabela 18.	Curvas analíticas obtidas com diferentes métodos de calibração.....	89
Tabela 19.	Concentrações em amostras reais determinadas pelo procedimento proposto e pela decomposição total em forno micro-ondas (média ± intervalo de confiança; n=3).....	91

Tabela 20. Concentrações nas amostras reais determinadas pelo procedimento proposto (média ± desvio padrão n=3).....	92
Tabela 21. Comparação das concentrações de Fe e Mg (expressos em mg/100g) nas amostras reais e com os valores da TACO.	93
Tabela 22. Contribuição das amostras de goma com o IDR estabelecido pela ANVISA para crianças e pessoas adultas.	93

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	9
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	12
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO E FUNDAMENTOS	17
1.1 Mandioca (<i>Manihot esculenta</i> Crantz)	17
1.1.1 Características nutricionais da mandioca e seus produtos	19
1.2 Preparo de amostras para determinação de metais por técnicas de espectrometria atômica	22
1.3 Preparo de amostras assistida por radiação micro-ondas	26
1.3.1 Aplicação do procedimento de decomposição assistida por radiação micro-ondas usando HNO ₃ diluído.....	29
1.4 Preparo de amostra usando extração assistida por ultrassom	34
1.4.1 Aplicações do procedimento de extração assistida por ultrassom usando ácidos diluídos.....	38
1.5 Preparo de amostras usando amostragem de suspensão	43
1.5.1 Principais fatores no preparo das suspensões	44
1.5.1.1 Tamanho da partícula	44
1.5.1.2 Meio líquido/diluyente	44
1.5.1.3 Concentração da suspensão.....	45
1.5.1.4 Partição do analito	45
1.5.1.5 Homogeneização da suspensão	46
1.5.1.6 Agentes estabilizantes	46
1.5.2 Método de calibração	47
1.5.3 Aplicação da amostragem de suspensão usando ácidos diluídos no preparo de amostras.....	48
CAPÍTULO 2 - PROPOSTA DE TRABALHO	53
2.1 Justificativa	53
2.2 Objetivo geral	53
2.2.1 Objetivos específicos	54
2.3 Instrumentação e acessórios	54
2.4 Reagentes e soluções	55
2.5 Resíduos gerados	56

	CAPÍTULO 3 - PROCEDIMENTO DE PREPARO DE AMOSTRAS DE CASCA DE MANDIOCA USANDO EXTRAÇÃO COM ÁCIDOS DILUÍDOS PARA A DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS NUTRIENTES POR FAAS	57
3.1	Amostragem e tratamento preliminar das amostras	57
3.2	Preparo das amostras	57
3.2.1	Procedimento de extração.....	57
3.2.2	Decomposição das amostras em forno micro-ondas	58
3.3	Estratégias de otimização do procedimento	58
3.4	Resultados e discussão	59
3.4.1	Otimização do tipo e concentração do extrator.....	59
3.4.2	Otimização do tempo de sonicação.....	60
3.4.3	Otimização do tempo de radiação micro-ondas.....	61
3.4.4	Otimização do tempo de centrifugação	62
3.4.5	Planejamento de mistura com restrições mínimas.....	62
3.4.6	Validação do modelo estatístico e experimental.....	64
3.4.7	Avaliação das condições experimentais no planejamento de misturas após a validação do modelo estatístico e experimental	67
3.5	Validação do procedimento	70
3.5.1	Avaliação do efeito da matriz e método de calibração.....	70
3.5.2	Limite de detecção e quantificação	71
3.5.3	Precisão	72
3.5.4	Exatidão	73
3.6	Aplicação do procedimento proposto	75
3.7	Conclusões	76
	CAPÍTULO 4 - DESENVOLVIMENTO DE PROCEDIMENTO DE AMOSTRAGEM DE SUSPENSÃO PARA DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS NUTRIENTES EM GOMA DE MANDIOCA POR FAAS	78
4.1	Amostragem	78
4.2	Determinação do diâmetro das partículas nas amostras de goma de mandioca por MEV	78
4.3	Preparo das amostras	78
4.3.1	Preparo das suspensões.....	78
4.3.2	Decomposição total em forno de micro-ondas.....	79
4.4	Otimização do procedimento	79
4.5	Resultados e discussão	80
4.5.1	Determinação do diâmetro das partículas por MEV.....	80
4.5.2	Otimização do procedimento.....	81

4.5.2.1	Estudo da massa da amostra.....	81
4.5.2.2	Estudo do tipo de extrator, concentração do extrator e tempo de sonicação usando planejamento Box-Behnken.	82
4.5.2.3	Validação do modelo estatístico e experimental.....	83
4.5.2.4	Avaliação das condições experimentais após a validação do modelo estatístico e experimental.....	86
4.6	Validação do procedimento.....	89
4.6.1	Avaliação do efeito da matriz e escolha do método de calibração.....	89
4.6.2	Eficiência de extração	90
4.6.3	Limite de detecção e quantificação	90
4.6.4	Precisão.....	91
4.6.5	Exatidão.....	91
4.7	Aplicação do procedimento proposto	92
4.8	Conclusões.....	93
	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	95
	REFERÊNCIAS	96

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO E FUNDAMENTOS

1.1 Mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)

A mandioca, nome de origem tupi (mani-óca, a casa de Mani), pertence à ordem Malpighiales, família Euphorbiaceae, gênero *Manihot* e espécie *Manihot esculenta* Crantz. É uma planta perene e heliófila, e pode atingir de dois a três metros de altura, crescendo principalmente por meio de suas raízes absorventes e tuberosas, além de ser muito versátil e de ampla utilização, tanto na alimentação humana quanto na alimentação animal. É a única, dentre as mais de 6000 espécies da família Euphorbiaceae, cultivada para fins de alimentação [1-2].

A origem exata da mandioca permanece incerta. Diversos autores sugerem que a espécie teria se originado no continente americano, mais precisamente no Brasil na região amazônica. O processo de domesticação da mandioca também é incerto, mas especula-se que tenha sido domesticada pela primeira vez numa única localidade e depois fora levada por povos indígenas para diferentes regiões, durante períodos de imigração. Isto pode ter levado à ocorrência de cruzamentos entre a espécie cultivada e as espécies silvestres locais, originando um grande número de variedades com diferentes características morfológicas, conferindo-lhe maior adaptação a variadas condições de clima e de solo, bem como resistência e tolerância a pragas e doenças. Hoje, é explorada em todo o território nacional, em todos os países sul e centro-americanos, nas Antilhas, e em outras regiões do mundo de clima tropical e subtropical [3-5].

As cultivares de mandioca são classificadas em “mandioca mansa” (doce) ou “mandioca brava” (amarga), dependendo da quantidade de HCN contido nas raízes. A mandioca mansa caracteriza-se por apresentar baixo teor de HCN, abaixo de 50 mg kg⁻¹ de polpa de raízes frescas. Níveis superiores a 100 mg kg⁻¹ são verificados em genótipos denominados “bravos”, existindo ainda um terceiro grupo, classificado como intermediário, em que os teores de HCN estão entre 50 e 100 mg kg⁻¹ [6-7].

No cenário mundial a mandioca adquiriu grande importância a partir da fome que devastou a África na década de 60 do século vinte. Isto despertou o presidente

dos EUA para formar uma equipe de especialistas, que procurou a melhor maneira para resolver o problema. Estes especialistas indicaram que a mandioca deveria ser a primeira cultura a ser plantada em áreas não aproveitadas, pobres e marginais devido às características de alta produtividade e resistência contra severas condições de solo e clima. A partir daquele momento, os EUA, Canadá e vários países europeus, através de suas agências de desenvolvimento internacional, adotaram planos para promover o cultivo e o desenvolvimento da mandioca [8].

A mandioca constitui um dos principais alimentos energéticos para cerca de 800 milhões de pessoas, sobretudo nos países em desenvolvimento, onde é cultivada em pequenas áreas com baixo nível tecnológico. O cenário mundial da produção de mandioca se apresenta com uma distribuição concentrada nos continentes asiático, africano e americano, em função da melhor adaptação da cultura na faixa tropical e subtropical que apresentam um clima mais favorável ao seu desenvolvimento [9].

Atualmente a Nigéria, Tailândia e o Brasil destacam-se como os maiores produtores de mandioca, sendo que o Brasil ocupa a terceira posição. Hoje, a área cultivada com a mandioca no mundo é de 19,6 milhões de hectares, com uma produção de 386.400 milhões de toneladas de raízes tuberosas. A mandioca é cultivada em todos os estados brasileiros, situando-se entre os nove primeiros produtos agrícolas do país, em termos de área cultivada, e o sexto em valor de produção. Em 2013, a cultura ocupou uma área de 1,6 milhões de hectares, atingindo uma produção de aproximadamente 23 milhões de toneladas de raízes tuberosas, tendo como destaque a região Nordeste que responde por 32% da produção nacional. Nessa região, a mandioca caracteriza-se como uma cultura de subsistência que absorve basicamente a mão de obra familiar e, portanto, constituem uma forma de manter o homem no campo pela oferta de emprego neste setor [10].

O Estado da Bahia destaca-se por ser o maior produtor de mandioca da região nordeste, e tem sido nos últimos anos o terceiro maior produtor nacional, com produção média de 3,2 milhões de toneladas. Na Bahia, a região Sul tem se destacado como grande produtora de mandioca, tendo como destaque os municípios de Alcobaça, Prado, Itamaraju, Eunápolis e Buerarema. O Estado da Bahia apresenta-se como um mercado promissor para o consumo da mandioca por

ser um grande polo turístico, onde na alta temporada de turismo a demanda aumenta em grandes proporções. Vários produtos de transformação da mandioca apresentam grande aceitação pelos consumidores, como: raízes frescas, beijús, farinha, goma e tapioca. Porém, a mandioca hoje na região é majoritariamente comercializada na forma de farinha que é seu produto de maior destaque [11].

Scan rate / (mV s⁻¹)

1.1.1 Características nutricionais da mandioca e seus produtos

A mandioca e seus produtos têm sido objeto de estudos principalmente pelo elevado teor de fibras e carboidratos, além de conter quantidades consideráveis de metais [12-18]. A composição química da mandioca é uma informação importante no que diz respeito ao controle de qualidade dos seus produtos, seja na forma *in natura* ou processados. Tal conhecimento é um elemento básico, na orientação de profissionais de saúde e, também, para esclarecimento do consumidor.

No Brasil, o projeto da Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO), desenvolvido no intuito de gerar dados sobre a composição dos principais alimentos consumidos no país, vem contribuindo significativamente para a construção desse banco de dados que, atualmente, contempla 597 alimentos, dentre os quais a mandioca e seus produtos estão incluídos, e estabelece valores de referência para uma série de nutrientes dos quais se destacam os macronutrientes P, Ca, Na, Mg, K e os micronutrientes Mn, Fe, Cu e Zn [18].

Na Tabela 1, encontra-se a composição centesimal de raízes de mandioca cruas, cozidas e fritas, da farinha de mandioca crua e torrada e também da goma de mandioca.

Tabela 1. Composição centesimal de mandioca e seus produtos por 100 g de parte comestível de acordo os valores da TACO [18].

Composição centesimal	Mandioca e seus produtos					
	Mandioca crua	Mandioca Frita	Mandioca Cozida	Farinha torrada	Farinha crua	Goma de mandioca
Umidade (%)	61,8	36,6	68,7	8,3	9,4	17,8
Proteína (g)	1,1	1,4	0,6	1,2	1,6	0,5
Cinzas (g)	0,6	0,6	0,4	1,0	0,9	0,3
Fibras (g)	1,9	1,9	1,6	6,5	6,4	0,6
Lipídeos (g)	0,3	11,2	0,3	0,3	0,3	0,3
Carboidratos (g)	36,3	50,3	30,1	89,2	87,9	81,1
Ca (mg)	15	23	19	76	65	12
Mg (mg)	44	95	27	40	37	3
K (mg)	208	176	100	328	340	48
P (mg)	29	57	22	39	42	60
Na (mg)	2	9	1	10	1	2
Cu (mg)	0,07	0,12	0,01	Tr	0,08	Tr
Mn (mg)	0,05	0,18	0,06	0,37	Tr	Tr
Fe (mg)	0,3	0,3	0,1	1,2	1,1	0,1
Zn (mg)	0,2	0,4	0,2	0,4	0,4	Tr

Tr - traço

A mandioca também exerce um importante papel na alimentação animal principalmente através de seus resíduos como a casca que é um alimento essencialmente energético devido aos altos conteúdos de amido e baixo nível de proteína. É importante salientar que a energia é o nutriente quantitativamente mais necessário nas dietas para as diferentes espécies animais. Normalmente as raízes de mandioca recém-colhidas apresentam elevado teor de umidade. Este nível é mais ou menos constante (entre 62% e 68% de água), dependendo principalmente da idade da planta no momento de colheita e das condições ambientais [Erro! Indicador não definido.].

A casca representa de 15 a 20% do peso total da raiz, em que a polpa, ou cilindro central, equivale a 85% deste peso. A maior parte da proteína, fibra e cinza

está localizada na casca, enquanto que os carboidratos se localizam principalmente na polpa, como é possível visualizar na Tabela 2.

Tabela 2. Composição centesimal da casca e polpa da mandioca [Erro! Indicador não definido.].

Composição centesimal (g)	Casca		Polpa da raiz	
	Base seca	Base úmida	Base seca	Base úmida
Carboidratos	77,5	21,7	91,0	37,5
Proteínas	5,4	1,5	2,4	1,0
Fibras	9,0	2,5	2,7	1,1
Cinzas	6,1	1,7	2,9	1,2

Mezette et al., [19] estudaram características agronômicas, tecnológicas e químicas de clones-elite de mandioca de mesa. Para isso, foram avaliados 12 clones do Programa de Melhoramento Genético da Mandioca de Mesa do IAC – Instituto Agrônomo de Campinas, em comparação à variedade-testemunha IAC 576-70, quanto aos teores de carotenoides totais, β -caroteno, vitamina A, componentes minerais, dentre outros. O clone 108/00 destacou-se por apresentar teores de carotenoides totais (1108,1 $\mu\text{g}/100\text{g}$), β -caroteno (940,1 $\mu\text{g}/100$) e vitamina A (523 UI/100g) superiores aos observados para a variedade-testemunha. Além disso, dois clones destacaram-se pelos teores de Zn, superiores em 44%, e os de Fe, superiores em 53%, quando comparados à variedade IAC 576-70 cujos teores de Fe foram 19,2 (mg kg^{-1}) e de Zn 18,2 (mg kg^{-1}).

Ceni et al., [20] investigaram a composição centesimal e teores de minerais de cinco cultivares de mandioca crua (BRS Rosada, Casca Roxa, BRS Dourada, BRS Gema de Ovo e Saracura) colhidas aos 8 meses após o plantio. As amostras analisadas apresentaram teores de Ca (36 - 56 $\text{mg}/100\text{g}$); Na (16 - 49 $\text{mg}/100\text{g}$); Mg (45 - 126 $\text{mg}/100\text{g}$); K (808 - 1318 $\text{mg}/100\text{g}$); Fe (2,2 - 5,0 $\text{mg}/100\text{g}$); Cu (0,40 - 0,55 $\text{mg}/100\text{g}$). Os pesquisadores obtiveram diferenças significativas entre as variedades quanto à composição centesimal e aos teores dos minerais avaliados, com exceção do Cu. Logo, os autores concluíram que a composição química da mandioca é

específica não somente para cada cultivar, como também depende, principalmente, de fatores genéticos associados.

Valduga et al., [21] avaliaram os componentes minerais de cinco cultivares de mandioca (BRS Rosada, Casca Roxa, BRS Dourada, BRS Gema de Ovo e Saracura), colhidas aos 8 meses após o plantio, sendo constatadas diferenças significativas para os teores de Na, Mg, K e Mn. Segundo os autores, a mandioca após cocção de 25 min apresentou níveis apreciáveis de K (471-704 mg/100g em base seca) e Ca (85-201 mg/100g em base seca). A cultivar BRS Rosada destacou-se por apresentar elevado teor de Mg (166 mg/100g em base seca) e Fe (13 mg/100g em base seca). Por outro lado, as cultivares Casca Roxa e BRS Dourada sobressaíram-se pelos teores, também em base seca, dos seguintes minerais: K (955 mg/100g para a Casca Roxa; 704 mg/100g para a BRS Dourada), Mn (10 mg/100g para a Casca Roxa; 6 mg/100g para a BRS Dourada), Ca (201 mg/100g para a Casca Roxa; 93 mg/100g para a BRS Dourada) e Na (117 mg/100g para a Casca Roxa; 76 mg/100g para a BRS Dourada).

Em trabalho realizado por Costa [22] foram avaliados a composição mineral de 24 amostras de farinha de mandioca produzidas na Bahia. Os elementos Ca, Fe, K, Mg, Na, P e Zn foram determinados. As amostras analisadas apresentaram teores de Ca (61,7 - 148,1 $\mu\text{g g}^{-1}$); Fe (6,9 - 27,1 $\mu\text{g g}^{-1}$); K (106,5 - 555,5 $\mu\text{g g}^{-1}$); Mg (79,4 - 15,3 $\mu\text{g g}^{-1}$); Na (37,7 - 2,5 $\mu\text{g g}^{-1}$); P (131,9 - 337,9 $\mu\text{g g}^{-1}$) e Zn (0,5 - 4,7 $\mu\text{g g}^{-1}$). Em outro trabalho sobre a composição mineral de farinha de mandioca, Correia [23] investigou o teor de Ca, K, Mg, Na, P, Cu, Mn, Mn e Zn nas amostras de farinhas comercializadas em Aracaju, Sergipe. As amostras analisadas apresentaram teores de Ca (176 - 418 $\mu\text{g g}^{-1}$); Fe (2,12 - 40,65 $\mu\text{g g}^{-1}$); K (1563 - 4263 $\mu\text{g g}^{-1}$); Mg (221 - 541 $\mu\text{g g}^{-1}$); Na (37,7 - 2,5 $\mu\text{g g}^{-1}$); P (183 - 561 $\mu\text{g g}^{-1}$); Cu (0,26 - 0,88 $\mu\text{g g}^{-1}$); Mn (0,40 - 6,97 $\mu\text{g g}^{-1}$) e Zn (1,90 - 5,43 $\mu\text{g g}^{-1}$).

1.2 Preparo de amostras para determinação de metais por técnicas de espectrometria atômica

Uma variedade de técnicas espectrométricas tem sido utilizadas para a determinação de metais em uma diversidade de amostras (biológicas, ambientais, alimentícias entre outras), a exemplo da espectrometria de absorção atômica com

chama (FAAS), espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (GF AAS), espectrometria de absorção atômica com geração de hidreto (HG AAS), espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio (CV AAS), espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) e a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) [24.-29].

Nos últimos anos, um avanço tecnológico pôde ser notado na concepção e construção de equipamentos para fins analíticos. Tais instrumentos atingiram um enorme grau de sofisticação e automação, permitindo, muitas vezes, que até o próprio analista se mantivesse a margem do processo de medição. Este fenômeno, proporcionou um grande incremento de produtividade nos laboratórios de análise química, além de permitir a obtenção rápida de grandes quantidades de dados com extrema precisão e exatidão. Entretanto, mesmo diante deste quadro, a etapa de pré-tratamento das amostras continua sendo a mais lenta e mais propensa a erros em procedimentos analíticos, o que pode levar a grandes desvios nos resultados finais, limitando a utilização de instrumentação altamente sofisticada e de alto custo. Contudo, este avanço tecnológico exigiu o aprimoramento dos procedimentos de preparação de amostras comumente utilizados [30].

A maioria das técnicas espectrométricas empregadas para determinação elementar utiliza uma solução da matriz, na qual o analito esteja numa forma disponível para a determinação. Assim, em geral, devem-se utilizar procedimentos de preparo de amostra que levem a total ou parcial destruição da matéria orgânica existente em grandes proporções em uma variedade de matrizes [31]. A decomposição pode ocorrer por via seca ou úmida, sendo a primeira também chamada de calcinação ou incineração e a segunda, comumente chamada de digestão.

A forma de tratamento pelo qual as amostras são decompostas recebe nomes distintos na literatura, tais como abertura, digestão, mineralização, pré-tratamento, solubilização e decomposição. Estes termos são empregados como sinônimos na literatura, uma vez que a amostra é decomposta como resultado de uma reação química. Porém, como forma de padronização, o termo decomposição será preferencialmente utilizado neste trabalho.

A decomposição por via seca corresponde à eliminação da matriz orgânica mediante oxidação da amostra em um forno mufla à temperatura controlada. As

temperaturas típicas de incineração são 450 a 550°C à pressão atmosférica, e as cinzas são dissolvidas em um ácido adequado. O grau de perda por volatilização é um fator limitante e depende: (i) da temperatura aplicada, (ii) a forma em que o analito está presente na amostra, e (iii) o ambiente químico na fase de incineração. Os tempos podem ser bastante longos, podendo levar de 2 a 3 dias a depender do procedimento [32-33].

A decomposição por via úmida pode ser feita através do fornecimento de energia (térmica, radiação ultravioleta, radiação micro-ondas, radiação infravermelho ou ultrassom) [34-37]. Comumente os procedimentos de decomposição por via úmida podem ser realizados em sistemas abertos e/ou em sistemas fechados [32].

Na decomposição por via úmida são empregados ácidos oxidantes (HNO_3 , H_2SO_4 e H_3PO_4) para solubilização das amostras, sendo as propriedades como força do ácido, ponto de ebulição, poder oxidante, poder complexante, solubilidade dos sais e segurança na manipulação consideradas durante o preparo da amostra. Em alguns casos deve-se fazer uso de oxidantes auxiliares como H_2O_2 ou O_2 para auxílio na solubilização das amostras. O uso de ácidos oxidantes, como HNO_3 e/ou H_2SO_4 é importante especialmente para decomposição das amostras com alto teor de carboidratos e/ou de gordura. Além disso, as misturas de ácidos $\text{HNO}_3/\text{HClO}_4$ ou HNO_3/HCl ou combinação de mais de dois ácidos são geralmente empregadas nos procedimentos de decomposição por via úmida [32].

Quando a decomposição por via úmida é realizada por meio do sistema aberto, o aquecimento ocorre por condução e a temperatura da decomposição está limitada à temperatura de ebulição dos agentes oxidantes utilizados. Esse procedimento possibilita a decomposição de elevadas massas de amostra (que podem ser de 10 g, aproximadamente), uma vez que o sistema opera à pressão atmosférica e não há riscos de explosão por aumento súbito de pressão, além disso, apresentam a vantagem da possibilidade de adição de outros reagentes durante a etapa de decomposição [38-39].

Em sistemas abertos alguns cuidados especiais devem ser observados, principalmente acerca do agente oxidante. Neste contexto, pode-se evidenciar que a eficiência oxidativa do HNO_3 é comprometida, uma vez que o azeótropo formado com a água (HNO_3 65%) entra em ebulição a 121°C. Neste caso, o HNO_3 dificilmente poderá ser utilizado sem a adição de outros reagentes, uma vez que

mesmo em decomposições feitas a 180 °C, a degradação da matéria orgânica não é completa. Por outro lado, o HClO₄ apresenta um elevado poder de oxidação, mas seu uso oferece risco de explosão pela formação de percloratos instáveis. A utilização do H₂SO₄, por sua vez, seria a mais recomendada pela elevada temperatura de ebulição de seu azeótropo com a água (339 °C, 98%) [39-40].

A decomposição por via úmida em sistema fechado comumente é realizada em sistemas de micro-ondas e apresenta vantagens em relação aos procedimentos em sistemas abertos, tais como a presença de uma atmosfera isolada e hermeticamente fechada, o que reduz a possibilidade de contaminações e a perda de espécies voláteis. O aumento da temperatura interna no frasco reacional causa uma elevação na pressão, resultando no aumento da temperatura de ebulição do reagente utilizado e do potencial de oxidação da matéria orgânica, o que resulta em uma maior eficiência de decomposição. Porém, a elevação na pressão em sistemas fechados aumenta o risco de explosões, exigindo condições apropriadas de trabalho [41-42]. A soma destes aspectos foi determinante para que o procedimento de decomposição assistida por radiação micro-ondas fosse considerado o estado da arte na área de preparo de amostras

Uma das grandes vantagens da utilização da radiação micro-ondas para os procedimentos de preparo de amostras é o rápido aquecimento. Esta forma de aquecimento, denominada aquecimento dielétrico, pode ser explicada como sendo resultado, principalmente, de dois mecanismos que ocorrem pela interação da onda eletromagnética com a matéria, tais como: (i) rotação dipolar, que é a orientação de dipolos elétricos do solvente pela onda eletromagnética; e (ii) condução iônica, que é a migração de íons dissolvidos em direção aos polos de carga oposta criada pela incidência da radiação. Além disso, a radiação micro-ondas apresenta interação somente com determinados tipos de materiais, denominados absorventes. Desta forma, é possível observar um aquecimento específico na solução que está sendo utilizada para o procedimento de decomposição da matéria orgânica, praticamente sem gradiente de temperatura na fase absorvente [41].

Os procedimentos clássicos de preparação de amostras por via seca ou via úmida podem apresentar uma série de inconvenientes, como: (i) perda de analitos por volatilização quando as mesmas são realizadas em altas temperaturas e em sistemas abertos; (ii) risco de contaminação; (iii) a necessidade de utilizar grandes

volumes de reagentes e (iv) maior tempo gasto no processo de preparo de amostra, sendo que esta etapa consome cerca de 60 % do tempo total para a análise [40].

Hoje em dia, a seleção de um procedimento para preparação da amostra envolve a tarefa de se obter os melhores resultados num menor período de tempo possível, com o mínimo de contaminação, usando pequenas quantidades de reagentes e amostras, e gerando pouca quantidade de resíduos, bem como manter a integridade da amostra e a rastreabilidade dos resultados, tendo qualidade e confiança nos resultados. Essa escolha envolve ainda outros parâmetros, tais como escolha da técnica analítica apropriada, número de amostras, precisão e exatidão desejada, disponibilidade do equipamento e fator de diluição ou sensibilidade [31,40].

Neste sentido, existe uma constante busca pelo desenvolvimento de novas metodologias de preparação de amostras que atenda aos requisitos supracitados. Nos itens a seguir será apresentada uma breve revisão com os fundamentos, vantagens e aplicações dos procedimentos de preparo de amostras tais como: decomposição assistida por radiação micro-ondas usando HNO_3 diluído, extração com ácidos diluídos assistidos por ultrassom e amostragem de suspensão usando ácidos diluídos.

1.3 Preparo de amostras assistida por radiação micro-ondas

As micro-ondas são radiações eletromagnéticas que possuem comprimento de onda entre 1 mm e 1 m e frequência que varia de 300 a 300000 Hz. Contudo, apenas as frequências 915, 2450, 5800 e 22125 são permitidas pela Comissão Federal de Comunicações e pelas Leis Internacionais de Rádio para uso industrial, científico e doméstico. É uma radiação não ionizante e, portanto, não possui energia necessária para quebrar as ligações químicas de moléculas. O emprego da radiação micro-ondas em decomposição de amostras baseia-se no aquecimento de materiais através da absorção direta dessa energia. Esses materiais aumentam de temperatura devido, principalmente, a interação entre a onda eletromagnética e os íons dissolvidos, que sofrem migração iônica, e o solvente presente, o qual sofre rotação de dipolos [43-45]

A migração iônica resume-se ao movimento eletroforético dos íons em solução. O campo elétrico oscilante produzido pelas micro-ondas promove o deslocamento dos íons dissolvidos em direção aos pólos com cargas opostas. Esse deslocamento produz um fluxo de corrente cujo movimento sofre resistência devido às outras espécies que estão no fluxo oposto. A resistência ao deslocamento produz calor devido à perda de energia, elevando a temperatura da solução [43-45].

O fenômeno da rotação de dipolos consiste no alinhamento das moléculas contidas na amostra que possuem momento dipolar induzido ou permanente com o campo eletromagnético. Como as ondas eletromagnéticas geram campos elétricos positivos e negativos alternados, isso causa desordem e agitação das moléculas dipolares. Dessa maneira, a energia absorvida para o realinhamento das moléculas é transformada em calor [43-45].

Dependendo do tipo de material irradiado, a radiação micro-ondas pode: ser refletida, ou seja, o material não interage com a onda eletromagnética; (i) atravessar o material sem causar nenhum efeito no mesmo (esse tipo de material é considerado transparente às micro-ondas); (ii) ou ser total ou parcialmente absorvida. Dos três tipos de interação citados, a absorção da radiação é o efeito explorado nas decomposições assistidas por radiação micro-ondas. Quando a energia é absorvida, transforma-se em energia térmica e a temperatura do meio reacional se eleva [43-45].

Nos sistemas de forno de micro-ondas as amostras são digeridas em frascos reacionais que são confeccionados a partir de materiais que apresentam elevada resistência química, mecânica e térmica que possibilitam o seu uso em ambientes expostos a elevadas temperaturas e altas pressões. A possibilidade de trabalhar com o emprego de elevadas temperaturas e elevadas pressões resultou em condições operacionais que possibilitaram a elevação do ponto de ebulição dos reagentes utilizados para decomposição da matéria orgânica [41, 46-47].

Um das possibilidades apresentadas pelo uso do forno de micro-ondas na decomposição de amostras é a redução do uso de ácidos concentrados, que na maioria das vezes pode representar riscos durante a etapa de manipulação e, além disso, normalmente requer uma etapa adicional de diluição dos digeridos finais antes da determinação, resultando na geração de grandes volumes de resíduo ácido como efluente [48]. Com o avanço das técnicas espectrométricas que apresentam baixa

tolerância à introdução de soluções com elevadas concentrações ácidas, novas alternativas têm sido apresentadas a fim de minimizar os danos causados aos equipamentos [49].

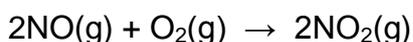
Nessa perspectiva o emprego dos ácidos diluídos nos procedimentos de decomposição de amostras apresentam diversas vantagens, entre elas: (i) redução no volume do ácido; (ii) minimização de resíduos gerados; (iii) redução de custos e; (iv) digeridos com acidez residual menor, mais apropriado para a análise espectrométrica, fatores que vão de encontro aos princípios da química verde [49-51]. Estudos recentes tem destacado a eficiência dos procedimentos de decomposição assistida por radiação micro-ondas usando ácidos diluídos, sendo que o ácido mais comumente utilizado é o HNO₃ [52].

A seguir, serão apresentados alguns fatores baseados nas reações de regeneração do HNO₃ diluído que potencializam os procedimentos de decomposição assistida por radiação micro-ondas para decomposição da matéria orgânica. Essa melhora se dá por dois fatores que estão relacionados ao emprego de soluções diluídas de HNO₃, sem que este implique em uma diminuição da eficiência de decomposição. Um destes fatores é dependente do gradiente de temperatura dentro do frasco reacional durante a etapa inicial de aquecimento dielétrico, devido a não absorção de radiação micro-ondas pela fase gasosa. Além disso, a utilização de soluções diluídas de HNO₃ é dependente da presença de oxigênio na atmosfera interna do frasco de reação, contribuindo para o processo de oxidação da matéria orgânica. Como resultado da combinação de ambos os aspectos, os produtos de reação podem ser oxidados na atmosfera superior do frasco reacional e, posteriormente, reabsorvidos na fase líquida [41,45].

Considerando estes fatores, percebe-se que a presença do gradiente de temperatura causa um aumento de pressão menos pronunciado durante a etapa inicial de decomposição. A presença de O₂ contribui para a oxidação dos produtos de decomposição da matéria orgânica que serão reabsorvidas pela fase líquida [45]. A soma destes dois fatores implica em um ciclo reacional que resulta na regeneração do HNO₃, como pode ser observado nas seguintes reações:



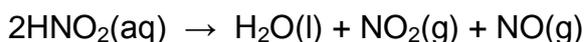
Equação 1



Equação 2



Equação 3



Equação 4

A ocorrência das reações descritas nas Equações 1 a 4 resulta na regeneração do HNO_3 , iniciando um ciclo reacional que permanece efetivo enquanto duas condições forem simultaneamente obedecidas: [53] (i) a existência de material orgânico da amostra que está sendo decomposta, resultando na geração de gás NO conforme a Equação 1; e, (ii) presença de oxigênio na fase gasosa do frasco reacional para aumentar a formação de NO_2 , conforme a Equação 2. Conseqüentemente, o NO_2 é regenerado, sendo reabsorvido na solução. Então, uma reação de desproporcionamento ocorre com a formação de NO_3^- e NO_2^- , representado pela Equação 3. A molécula de HNO_2 irá se decompor em NO_2 e NO, que seguirão a seqüência reacional descrita na Equação 2 (em fase gasosa), enquanto a molécula de HNO_3 reiniciará o ciclo de oxidação da matéria orgânica, conforme descrito na Equação 1.

1.3.1 Aplicação do procedimento de decomposição assistida por radiação micro-ondas usando HNO_3 diluído

Como já relatado anteriormente a busca por novos procedimentos que sejam rápidos, de fácil execução e que demandem menores quantidades de reagentes, tem sido um dos grandes propulsores da pesquisa na área de Química Analítica nos últimos anos. Dentro deste contexto, a popularização do uso da radiação micro-ondas, para fins de pré-tratamento de amostras usando HNO_3 diluído, pode ser tomado como o exemplo mais marcante deste fenômeno, com um número expressivo de trabalhos sendo publicados. A seguir, serão descritos com detalhes as mais relevantes contribuições na área de preparação de amostra usando HNO_3 diluído associado ao uso da radiação micro-ondas.

Araújo et al., [54] propuseram um estudo sobre o emprego do HNO_3 diluído na decomposição de amostras de citrus, folhas de manga e forrageiras para determinação de metais por ICP OES. Para o estudo de avaliação da eficiência de decomposição, soluções com concentrações de (14,0; 7,0; 5,0; 3,0 e 2,0 mol L⁻¹) de HNO_3 foram avaliadas. A eficiência de decomposição foi avaliada através do teor de

carbono residual (RCC). Os melhores valores de RCC foram encontrados quando o HNO_3 a $14,0 \text{ mol L}^{-1}$ foi utilizado. No entanto, a diferença para os valores de RCC foi considerada pouco representativa em relação às decomposições com soluções de ácido com a concentração variando de $7,0$ a $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ de HNO_3 , que apresentaram valores de RCC de $10,3$ a $11,3\%$, respectivamente. A eficiência de decomposição também foi avaliada através da acidez residual apresentada pelos digeridos finais quando o procedimento de decomposição foi feito com diferentes concentrações de HNO_3 . Quanto mais concentrada a solução utilizada, maior a acidez residual. A exatidão do procedimento foi avaliada através da análise dos CRMs de folha de espinafre (NIST 1570 A) e de farelo de milho (NIST 8433).

Castro et al., [55] avaliaram dois procedimentos de preparo de amostras de café em pó empregando HNO_3 diluído. Essa avaliação foi realizada por meio da comparação de dois procedimentos de decomposição: um baseado no aquecimento com radiação micro-ondas e outro no aquecimento convencional (condutivo). Para ambos os procedimentos soluções de HNO_3 em diferentes concentrações foram avaliadas ($1,0$; $1,7$; $3,5$; $7,0$; $10,5$ e $14,0 \text{ mol L}^{-1}$). Os resultados mostraram que não houve diferença significativa para ambos os procedimentos quando soluções de até $3,5 \text{ mol L}^{-1}$ de HNO_3 foram empregadas para decomposição e a eficiência de decomposição foi superior a $97,7\%$ para todas as condições avaliadas. A acidez residual apresentou valores entre $0,31$ e $4,66\%$ (consumo de HNO_3 de $63,6$ a $66,7\%$, respectivamente) para o procedimento feito com aquecimento micro-ondas e $0,16$ e $1,58\%$ (consumo de HNO_3 de $88,8$ a $91,2\%$) para o procedimento feito com aquecimento convencional.

Gonzales et al., [56] desenvolveram um procedimento de decomposição assistida por radiação micro-ondas para o preparo de amostras de grão de soja, vísceras, fígado e sangue bovino. Diferentes concentrações de HNO_3 ($2,0$; $7,0$ e $14,0 \text{ mol L}^{-1}$) foram avaliadas. A eficiência de decomposição foi avaliada por meio do RCC, e os autores observaram que a utilização de soluções de HNO_3 a $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ não foram eficientes para a decomposição de víscera bovina (RCC=90%). Resíduos sólidos e coloração amarelada foram observados nos digeridos finais. Resultados semelhantes foram observados para as amostras de grãos de soja, porém menos pronunciados do que para a amostra de víscera bovina. No entanto, a decomposição de fígado e sangue bovino mostrou-se eficiente, mesmo com soluções diluídas

(HNO_3 2,0 mol L⁻¹, RCC < 22 e 10%, respectivamente) e os valores de RCC foram relativamente inferiores aos observados quando solução de HNO_3 (14,0 mol L⁻¹) foi utilizada (RCC=23% e 15%, respectivamente). Esta diminuição nos valores do RCC foi explicada pelo fato de as soluções diluídas apresentarem temperaturas maiores (180 a 200 °C para solução de HNO_3 2,0 mol L⁻¹) durante a etapa de decomposição, do que as temperaturas obtidas com a utilização de soluções mais concentradas (160 a 170 °C para solução de HNO_3 14,0 mol L⁻¹). Ao final do trabalho, os autores observaram que a utilização de soluções ácidas diluídas pode ser considerada uma alternativa viável para a decomposição de amostras, resultando na redução da quantidade dos reagentes utilizados e na menor geração de resíduos.

Eça et al., [57] avaliaram um procedimento de decomposição assistida por radiação micro-ondas usando ácido diluído para determinação de elementos-traço (As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mn, Ni e Sb) em amostras de poliquetas (*Chaetopterus variopedatus*) por ICP OES e ICP-MS. Diferentes concentrações de HNO_3 diluído foram avaliadas nos seguintes níveis: (14,1; 12,1; 10,1; 8,1; 6,1 e 4,1 mol L⁻¹). A eficiência de decomposição foi avaliada através do RCC e da acidez residual. Os valores de RCC variaram de (4,0 a 14,9 %) e acidez residual de (1,3 a 3,9 mol L⁻¹). A solução de HNO_3 a 8,1 mol L⁻¹ foi a que apresentou os menores valores de RCC e acidez residual. Após a otimização das melhores condições o procedimento foi aplicado em amostras de poliquetas coletados na Baía de Todos os Santos, Bahia, Brasil. A exatidão do procedimento foi avaliada através da análise do CRM de tecido de ostra, e a uma avaliação estatística aplicando o teste-t não apresentou diferença significativa entre os valores certificados e os valores encontrados pelo procedimento proposto.

Em trabalho desenvolvido por Mesko et al., [58] desenvolveram um procedimento de decomposição assistida por radiação micro-ondas combinado com radiação ultravioleta para o preparo de amostras de algas para determinação de As, Cd e Pb por ICP-MS. Para o emprego de radiação ultravioleta, uma lâmpada emissora foi introduzida no frasco reacional e essa abordagem aumentou a eficiência da decomposição permitindo menor consumo de ácidos. O HNO_3 foi utilizado como agente oxidante e sua concentração foi avaliada em diferentes níveis (0,5 a 7,0 mol L⁻¹). A eficiência da decomposição foi avaliada através do RCC e através da acidez residual. As condições estabelecidas para o procedimento

proposto foram: massa da amostra de 700 mg e solução de HNO_3 a $2,0 \text{ mol L}^{-1}$, permitindo uma eficiência de decomposição superior a 77% (considerando-se o RCC) e acidez residual de $0,19 \text{ mol L}^{-1}$. A exatidão do procedimento foi avaliada pela análise de dois CRMs de plantas aquáticas (BCR 060 e 670 BCR). O procedimento de decomposição assistida por radiação micro-ondas combinado com radiação ultravioleta mostrou-se uma alternativa viável em substituição aos procedimentos clássicos, uma vez que se utilizam soluções de ácidos diluídos minimizando a geração de resíduos e melhorando os limites de detecção.

Outros trabalhos utilizando o HNO_3 diluído na decomposição de amostras assistida por radiação micro-ondas podem ser observados na Tabela 3.

Tabela 3. Aplicação da decomposição assistida por radiação micro-ondas usando HNO₃ diluído.

Amostra	Analito	Técnica	Concentração do		
			HNO ₃ (mol L ⁻¹)	% RCC	Ref.
Células cancerígenas	Al, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Pb, e Zn	ICP OES	3,0	-----	[59]
Material têxtil	Al, Ba, Ca, Cr, Cu, Fe, Ni, P, Zn, Ca e Pb	ICP OES	7,0	-----	[60]
Fígado bovino	Ca, Cu, Fe, Mg e Zn	ICP OES	2,0	15	[61]
Botânica	Al, Ca, K, Fe, Mg e Na	ICP OES	3,0	5	[62]
Leite em pó	Ca, Cd, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, Pb e Zn	ICP OES e ICP-MS	2,0	-----	[63]
Orgânicas	Al, Cu, Fe, Mn, Mo, Rb, Se, Sr, e Zn	ICP OES e ICP-MS	3,5	-----	[64]
Ração	Al, Ca, Cd, Cr, Cu, Ba, Fe, K, Mg, Mn, P, S, Sr e Zn	ICP OES	2,0	-----	[65]
Feijão	Ca, Co, Cr, Cu, K, Mg, Mn, Mo, Ni, P, Se, Zn, Al, As, Ba, Pb e Sr	ICP OES	4,0	5	[66]
Tomate	Al, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Se, Sn, Sr, V e Zn	ICP OES e ICP-MS	7,0	0,8	[67]
Biológicas	Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na e Zn	ICP OES	2,0	9,3	[68]
Leite em pó e fígado bovino	Cu, Fe, K, Mg, Mo, Na, Zn, Cd, Co e Pb	ICP OES e ICP-MS	2,0	7,0	[69]
Cosméticos	Pb, Cd, Co, Cr, Cu e Ni	ICP OES e GF AAS	2,0	-----	[70]
Mel	Se, Mg, Ca, Al, P, Mn, Fe, Cu, Zn, Ba, e Pb	ICP-MS	2,0	4	[71]
Algas marinhas	As, Cd e Pb	ICP-MS	2,0	3	[72]
Produtos da soja	Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Se, V, Zn, As, Ba, Cd, Pb e Sr	ICP OES e ICP-MS	2,1	10	[73]

1.4 Preparo de amostra usando extração assistida por ultrassom

As ondas ultrassônicas são ondas mecânicas com frequências maiores que as audíveis para o ser humano, ou seja, acima de 16 KHz. As ondas ultrassônicas se propagam através da matéria, com uma velocidade que pode variar desde centenas de metros por segundo no ar, até milhares de metros por segundo em sólidos. Na água e em soluções aquosas diluídas, sua velocidade é da ordem de 1500 m/s. As ondas ultrassônicas foram assim denominadas por analogia à radiação ultravioleta já que também não produzem sensação física perceptível aos seres humanos [74].

A descoberta do ultrassom ocorreu em 1880, por Pierre e Jacques Curie, quando estudavam o efeito piezoelétrico, que consiste na variação das dimensões físicas de certos cristais e cerâmicas quando são submetidos a campos elétricos. É conhecido que certos materiais, ao receberem uma tensão alternada em suas faces opostas, produzem expansões e contrações alternadas, na frequência imposta. Caso a frequência de compressão e expansão da superfície do cristal seja maior que 20 Hz, há produção de som. Por sua vez, cristais desta mesma classe, quando submetidos à compressão, produzem uma diferença de potencial entre as faces perpendiculares. Este é, inclusive, um dos princípios empregados para a construção de balanças de alta sensibilidade. São exemplos destes materiais, cristais de quartzo e cerâmicas como titanato de bário e zirconato de chumbo [74].

Para o tratamento de amostras, a faixa de frequência das ondas ultrassônicas está entre 20 kHz e 100 kHz. Esta região, denominada de faixa de baixa frequência e alta potência proporciona a formação de pequenas bolhas de cavitação quando a onda atravessa um meio líquido. As bolhas de cavitação se desenvolvem durante as fases de compressão e rarefação da onda ultrassônica. Durante a fase de rarefação uma fração dos gases presentes no líquido é absorvida pela bolha de cavitação e, nos ciclos consecutivos de compressão e rarefação, a bolha tem seu diâmetro modificado até atingir um diâmetro crítico, acima do qual ocorre sua implosão. Este tamanho crítico é determinado pela frequência do ultrassom (e.g $\approx 170\mu\text{m}$ a 20 kHz) [36, 74-75].

Quando líquidos são submetidos às ondas ultrassônicas, estas produzem intensas e sucessivas ondas de compressão e rarefação no meio, no qual, a

depende da viscosidade, pode ocorrer o surgimento de cavidades de dimensões microscópicas durante uma fase de rarefação. A ocorrência de gases e vapores no meio irradiado faz com que moléculas dos gases e vapores migrem para o interior das cavidades. Nos sucessivos ciclos de compressão e rarefação as dimensões da cavidade vão aumentando, até que seja atingido um diâmetro crítico, quando está finalmente sofre colapso [36, 74-76].

Estas ondas mecânicas criam uma única vibração que causa uma variação na pressão do líquido. O estudo de ultrassom pode ser dividido em duas principais áreas: alta potência e baixa potência. As ondas ultrassônicas de alta potência (menores que 1 W.cm^{-2} a milhares de W.cm^{-2}) causam mudança física e química permanentemente, porque produzem cavitação e micro fluxos nos líquidos, aquecimento e ruptura nos sólidos e instabilidade na superfície da interface de sistemas líquido – líquido e líquido gás. São caracterizadas pelas altas frequências, deslocamento pequeno, velocidade moderada e alta aceleração e propagação em um líquido [74-77].

Nas ondas ultrassônicas de baixa potência, com frequência maior que 20 kHz e baixa amplitude de propagação, são estudados o efeito do meio sobre a onda. Amplamente utilizado na engenharia e medicina em diagnósticos e nos laboratórios de química e biologia, são comumente empregados para a limpeza de materiais, especialmente vidrarias e vasilhames de amostragem, além de serem aplicados no preparo de amostras ou para rompimento de paredes celulares. Para esses fins, normalmente são empregados banhos de ultrassom, que podem ser caracterizados como vasos metálicos, no fundo dos quais são acoplados transdutores piezelétricos (normalmente cerâmicas) que oscilam em determinada frequência [74-77].

A inserção dos ultrassons na lista de fatores que aumentam a reatividade é devido às evidências acumuladas sobre os efeitos provocados por estas sondas em sistemas químicos. A principal causa desses efeitos é a cavitação que pode ser considerada como o ciclo de formação, crescimento e colapso de bolhas micrométricas durante a sonicação. O crescimento das bolhas e o colapso são dependentes do meio. Com os colapsos das bolhas de cavitação ocorre a liberação de grande quantidade de energia para o meio, proporcionando na microrregião onde ocorreu colapso, um aumento da temperatura da ordem de alguns milhares de graus centígrados e da pressão para centenas de atmosferas (Figura 1). As diferenças nas

condições de radiação tais como frequência, solventes, pressão de vapor do sistema, intensidade e pressão hidrostática, são parâmetros que afetam os diferentes estágios da cavitação acústica. À medida que aumenta a frequência diminui a cavitação. A explicação se deve a diminuição do ciclo de compressão e de rarefação, dificultando o crescimento da bolha. Um aumento na intensidade da onda produz um aumento nos efeitos sonoquímicos. Para solventes com alta pressão de vapor a cavitação diminui. Solventes de grande volatilidade apresentam uma grande quantidade de vapor no interior da bolha durante o período de expansão, ocasionando um amortecimento por ocasião do colapso da bolha e diminui a intensidade das ondas de choque [74-77].

Outro fator que pode influenciar na cavitação é a temperatura. O aumento da temperatura do meio provoca um aumento da cavitação, porém esse aumento passa por um máximo e começa a decrescer devido ao aumento do número de núcleos de cavitação. Entretanto, com o aumento contínuo da temperatura a tensão superficial diminui, resultando em um aumento na pressão de vapor no interior das cavidades e amortecimento da onda de choque e a cavidade implode [74-77].

Segundo Korn et al., [78] as moléculas de um líquido são mantidas juntas por força de interações intermoleculares, que acabam por determinar a tensão superficial do líquido. Para formar uma cavidade é preciso gerar, durante o ciclo de expansão das ondas sonora, uma grande pressão negativa, capaz de superar a tensão superficial do líquido. A magnitude da pressão negativa necessária depende do tipo e da pureza do líquido, explicação mais comumente usada está baseada na existência de partículas invisíveis ou bolhas de gás, que enfraquecem as forças intermoleculares, possibilitando a criação da bolha. Em certos casos, as ondas ultrassônicas sustentam uma bolha, que simplesmente oscilará em tamanho. Em outros casos, o tamanho médio da bolha crescerá. O crescimento da cavidade depende da intensidade das ondas ultrassônicas.

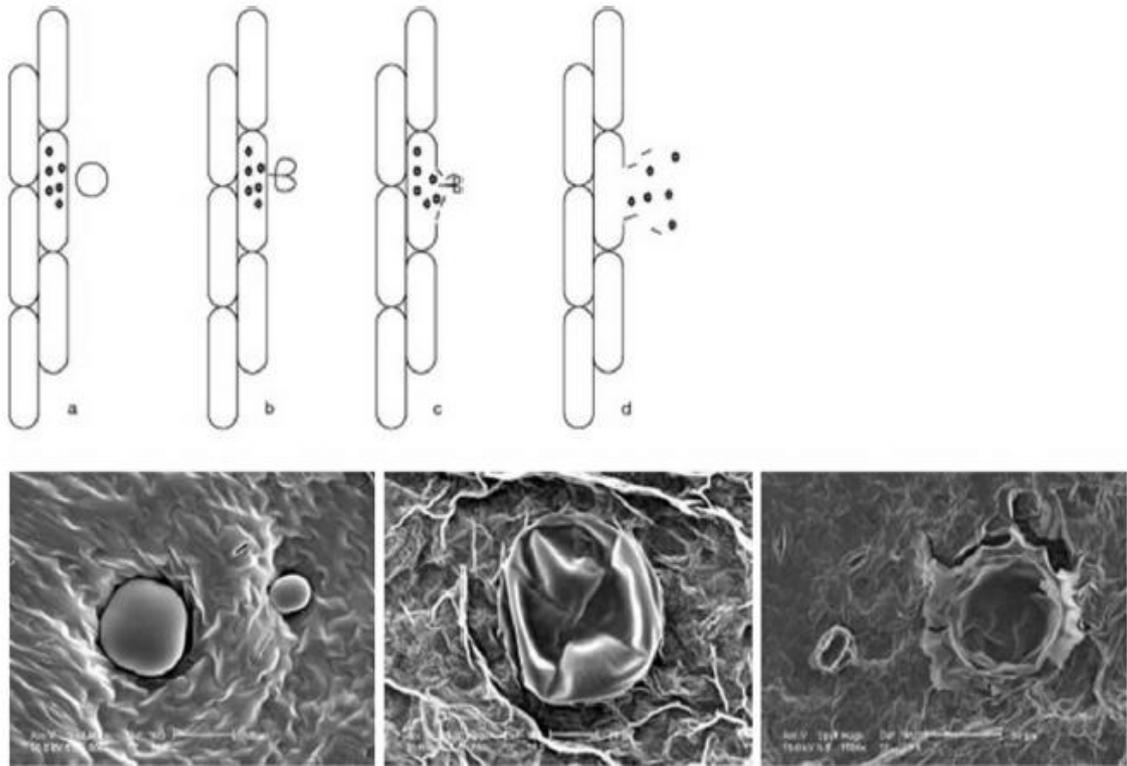


Figura 1. Efeito da cavitação acústica sobre o colapso das bolhas [79].

Uma das mais relevantes contribuições da energia ultrassônica no preparo de amostras está relacionada aos procedimentos de extração. Os procedimentos de preparo de amostras que visam à disponibilização do analito de interesse por meio de reagentes diluídos sem a completa destruição da matriz são chamados de extração ou lixiviação. Estes procedimentos permitem a quantificação dos analitos em diversas matrizes, sendo que as mesmas estão diretamente relacionadas com o tipo de extrator [32].

A extração de um analito é afetada pela sua interação com a matriz da amostra e sua recuperação ocorrerá em função de diversos fatores tais como a composição da amostra estudada, o solvente escolhido e sua concentração, o tempo de extração, a temperatura, dentre outros. É possível, em alguns casos, a recuperação quantitativa de determinados elementos por meio de procedimentos de extração, desde que estes estejam fracamente ligados à matriz [32].

A extração com ácidos diluídos é um procedimento simples, rápido, seguro e de baixo custo, capaz de promover a dissolução quantitativa dos elementos de interesse, e que, dependendo da matriz, possibilita recuperações que podem ser maiores do que quando se usam ácidos concentrados. Os procedimentos de

extração, quando comparados aos procedimentos de decomposição por via úmida e via seca, além de estarem menos sujeitos a problemas com brancos analíticos, apresentam menores perdas de voláteis e menores riscos de manuseio, minimizam fatores de diluição, reduzem custos devido aos baixos volumes de reagentes e minimizam o tempo de preparo.

1.4.1 Aplicações do procedimento de extração assistida por ultrassom usando ácidos diluídos

O uso dos ácidos diluídos em procedimentos de extração assistida por ultrassom tem sido reportado na literatura e, a seguir, será apresentada uma breve revisão com os mais relevantes trabalhos que utilizaram esse procedimento no preparo de amostras para a determinação de metais.

Nascentes et al., [80] propuseram um procedimento de extração para Ca, Mg, Mn e Zn em amostras vegetais (folhas de alface e couve) usando extração assistida por ultrassom para posterior determinação por FAAS. Os autores otimizaram o procedimento estudando as seguintes variáveis: concentração de HNO_3 (0 - 14,0 mol L^{-1}), tempo de sonicação (0 - 30 min) e tamanho das partículas (150 - 63 μm). Nesse trabalho as melhores condições de extração foram obtidas com 0,14 mol L^{-1} de HNO_3 , 10 min de sonicação e tamanho da partícula de 75 μm . Os percentuais de recuperação foram obtidos comparando os valores encontrados no procedimento proposto com os valores encontrados através do procedimento de decomposição total em forno micro-ondas com cavidade, alcançando recuperações em torno de 96 a 102%. A exatidão do procedimento foi avaliada mediante análise do CRM de folha de maçã (NIST 1515) e folha de espinafre (NIST 1570a) e uma avaliação estatística mostrou não haver diferença significativa entre os valores encontrados e os certificados.

Um procedimento de extração assistida por ultrassom usando mistura de ácidos diluídos foi desenvolvido por Manutsewee et al., [81] a fim de avaliar o teor de Cd, Cu e Zn em amostras de peixe e mexilhão. Os elementos Cd e Cu foram determinados por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ET AAS) e o Zn por FAAS. Os parâmetros químicos e instrumentais

foram estudados utilizando metodologia univariada. A mistura ácida foi composta pela mistura de HNO_3 ($4,0 \text{ mol L}^{-1}$) HCl ($4,0 \text{ mol L}^{-1}$) e H_2O_2 ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) numa proporção de 1:1:1 e com um volume final de 6,0 mL. Uma massa de 500 mg da amostra foi estabelecida e o tempo de sonicação utilizado foi de 30 min. Os percentuais de recuperação foram obtidos comparando os valores encontrados no procedimento proposto com os valores encontrados através do procedimento de decomposição total em forno micro-ondas com cavidade, alcançando recuperações em torno de 95 a 105% para todos os elementos. A precisão expressa como RSD foram todas abaixo de 15%. Os limites de detecção foram de 0,41; 2,56 e $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$ para o Cd, Cu e Zn respectivamente. A exatidão do procedimento foi avaliada mediante a análise do CRM de músculo de peixe (DORM-2) e avaliação estatística aplicando o teste-t não apresentou diferença significativa a um nível de 95% de confiança, entre os valores encontrados e os certificados.

No trabalho desenvolvido por Santos et al., [82] utilizaram métodos de otimização multivariada no desenvolvimento de um procedimento de extração multi-elementar assistida por ultrassom para o preparo de amostras de feijão e determinação dos analitos por ICP OES. Para este procedimento, as amostras de feijão em pó foram tratadas com uma mistura de ácidos e submetidas à energia ultrassônica para extração dos elementos (Ba, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Sr e Zn). Um planejamento de mistura simplex centroid foi usado para otimizar as proporções da mistura, ácida composta por (HNO_3 , CH_3COOH e HCl) e, após a otimização da mistura foi aplicado um planejamento Box-Behnken para otimizar as variáveis do processo (tamanhos de partículas, concentração final da solução extratora e tempo de sonicação). O procedimento proposto apresenta limites de quantificação ($\mu\text{g g}^{-1}$): Ba (0,90); Ca (5,2); Cu (4,0); K (0,90); Mg (1,4); Mn (0,22); Sr (0,25) e Zn (4,0). Mediante a falta de CRM de feijão, a exatidão do procedimento foi avaliada pelo procedimento de decomposição total assistida por radiação micro-ondas com cavidade e a avaliação estatística usando o teste-t pareado não mostrou diferença significativa a um nível de 99% entre o procedimento proposto e o procedimento de referência. O procedimento proposto foi aplicado para a determinação da composição elementar de amostras de feijão coletadas na cidade de Jequié, Bahia, Brasil.

Um procedimento proposto por Neves et al., [83] foi desenvolvido para determinação de Ca, Mg, Mn e Zn em amostras de ração de peixe, e posterior determinação por FAAS. Uma solução de HCl a $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ foi utilizada como fase extratora, as demais condições estabelecidas para o procedimento foram: massa da amostras de 200 mg, granulometria inferior a $60 \mu\text{m}$, e tempo de sonicação de três ciclos de 10 s e potência do ultrassom de 120 W. O procedimento foi aplicado em estudos sobre a digestibilidade destes nutrientes em amostras de ração para peixes utilizados na dieta de Tilápia do Nilo. A exatidão do procedimento foi avaliada pelo procedimento de decomposição total assistida por radiação micro-ondas e a avaliação estatística usando o teste-t pareado não mostrou diferença significativa a um nível de 99% entre o procedimento proposto e o procedimento de referência.

Barros et al., [84] utilizaram métodos de otimização multivariada no desenvolvimento de um procedimento de extração assistida por ultrassom usando mistura de ácidos diluídos. A proporção dos componentes extratores (HNO_3 , HCl e CH_3COOH) foram otimizadas utilizando um planejamento de mistura simplex centróid, e as proporções recomendadas para cada componente foram respectivamente 20%, 37% e 43%, para um volume final de 50,0 mL. As variáveis (massa da amostra, tempo de sonicação e concentração final da solução extratora) foram otimizadas utilizando planejamento Doehler. As condições ótimas encontradas para cada variável foram respectivamente: 0,24 g, 18 min e $3,6 \text{ mol L}^{-1}$. O desenvolvimento do procedimento permitiu a determinação de Cu, Mn, Ni e Zn e determinação por FAAS em amostras de ração de frango coletadas na cidade de Jequié, Bahia, Brasil. A exatidão do procedimento foi avaliada pelo método de decomposição total assistida por radiação micro-ondas e a avaliação estatística usando o teste-t pareado não mostrou diferença significativa entre o procedimento proposto e o procedimento de referência.

Santos et al., [85] utilizaram planejamento fatorial e planejamento Doehler na otimização de um procedimento de extração multi-elementar assistida por ultrassom usando ácidos diluídos na determinação de micronutrientes em amostras de leite de coco por ICP OES. As condições otimizadas das variáveis experimentais foram: 1,0 g da amostra, 10 min tempo de sonicação, 20,0 mL de HNO_3 ($1,0 \text{ mol L}^{-1}$) e 5 min de tempo de centrifugação a 2000 rpm. O percentual de extração foi calculado utilizando a concentração dos elementos obtidos por um procedimento de digestão

total em forno micro-ondas com cavidade como referência. A exatidão do procedimento foi avaliada mediante análise de CRM de leite em pó (NIST 1549) e a avaliação estatística aplicando o teste-t não apresentou diferença significativa a um nível de 95% de confiança, entre os valores encontrados e os certificados.

Métodos de otimização multivariada usando planejamento fatorial e planejamento Box-Behnken foi aplicado por Trindade et al., [86] na otimização de um procedimento de extração com ácidos diluídos assistida por ultrassom, no preparo de amostras de óleo vegetais para determinação de Cu, Fe, Mn e Zn por Espectrometria de absorção atômica com chama de fonte contínua e alta resolução (HR-CS AAS). As variáveis concentração do HCl, amplitude, ciclo e tempo de sonicação foram estudados. Os valores selecionados foram 0,5 mol L⁻¹ de HCl, amplitude de sonicação de 66%, ciclo de sonicação de 74 % e tempo de sonicação de 79 s. O procedimento proposto apresentou limites de quantificação ($\mu\text{g g}^{-1}$): 0,14; 0,20; 0,21 e 0,04 para Cu, Fe, Ni e Zn respectivamente. O procedimento proposto foi aplicado na determinação de Cu, Fe, Ni e Zn em amostras de óleo de soja, canola e girassol.

Outros trabalhos usando extração assistida por ultrassom com ácidos diluídos podem ser observados na Tabela 4.

Tabela 4. Aplicação do procedimento de extração assistida por ultrassom com ácidos diluídos.

Amostra	Analito	Técnica	Tempo de sonicação (min)	Tipo e concentração do ácido	Ref.
Cítrus	Ca, K e Mg	FAAS	15	HNO ₃ a 0,014 mol L ⁻¹	[87]
Vegetais	Cd e Pb	GF AAS	10	HNO ₃ a 2,8 mol L ⁻¹	[88]
Peixe e marisco	As, Se, V e Ni	ET AAS	3	HNO ₃ a 3,0 % v/v	[89]
Cabelo	Al, As, Ba, Be, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Pb, Tl, U, V e Zn	ICP-MS	2	HNO ₃ a 3,0 % v/v	[90]
Mariscos	Ca, Cd, Cu, K, Mg, Mn, Na, Sr, e Zn	ICP OES	15	HNO ₃ /HCl/CH ₃ COOH a 1,0 mol L ⁻¹	[91]
Vegetais	Cu, Mn e Se	GF AAS	10	HCl a 0,10 mol L ⁻¹	[92]
Tecido de mexilhão	Cd e Cu	ICP-MS	3	HNO ₃ a 0,10 mol L ⁻¹	[93]
Ração	Na e K	FAAS	15	HCl a 0,10 mol L ⁻¹	[94]
Sedimento	As, Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb, Sn, V e Zn	ICP-MS	15	HF a a 3,5 mol L ⁻¹ e HNO ₃ a 3,5 mol L ⁻¹	[95]
Tabaco	Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Ni e Pb	ICP-MS	30	HNO ₃ a 2,8 mol L ⁻¹	[96]
Folha de chá	Ba, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, P, Pb, Sr, Zn	ICP OES	20	HNO ₃ a 1,0 mol L ⁻¹	[97]
Chocolate	Ca, Na, K, P, Mg, Cu, Mn e Zn	ICP-MS	6	HNO ₃ a 1,4 mol L ⁻¹	[98]
Fertilizantes	Hg	CV AAS e MIP OES*	6	HCl a 1,0 mol L ⁻¹	[99]

*MIP OES = Espectrômetro de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas.

1.5 Preparo de amostras usando amostragem de suspensão

A amostragem de suspensão vem sendo aplicada em uma variedade de matrizes e, diferentes técnicas analíticas de detecção têm sido empregadas para a quantificação de metais [100]. O procedimento de amostragem de suspensão foi originalmente empregado por Brady et al., [101] na determinação de Zn e Pb em folhas e sedimentos marinhos por ET AAS, simplificando extremamente o procedimento de preparação da amostra e evitando algumas desvantagens dos procedimentos clássicos.

A amostragem de suspensão possui vários atrativos diante de procedimentos clássicos de preparação de amostras sólidas, apresentando as seguintes vantagens: (i) simplificação da etapa de pré-tratamento da amostra, diminuindo o tempo de análise e o trabalho operacional; (ii) minimização do risco de contaminação da amostra; (iii) eliminação ou redução de perdas de analitos por volatilização; (iv) minimização do custo de análise; (v) redução do consumo de reagentes perigosos e corrosivos; (vi) pode ser aplicada para a análise de amostras orgânicas e inorgânicas; (vii) pode ser aplicada na determinação de elementos voláteis seguida da técnica de geração de hidretos; (viii) uso de padrões aquosos para a calibração e (ix) possibilidade de sua mecanização ou automação com o intuito de facilitar a introdução da amostra, bem como a adição de reagentes e/ou modificadores químicos por meio da utilização de sistemas em fluxo. Todavia, apresenta algumas desvantagens, como problemas relacionados à homogeneidade da suspensão preparada e, conseqüentemente, à sua manutenção no momento da detecção, além do tamanho da partícula, sendo este último o fator mais crítico relacionado ao preparo das suspensões, o que pode comprometer a exatidão do procedimento analítico [102-104].

Diante das vantagens apresentadas, um conjunto de fatores químicos e físicos devem ser avaliados na escolha desse procedimento: (i) tamanho da partícula; (ii) o meio líquido utilizado para o preparo da suspensão; (iii) concentração da suspensão (razão entre a massa da amostra e o volume da suspensão); (iv) partição do analito; (v) homogeneização da suspensão e (vi) agentes estabilizantes [105].

1.5.1 Principais fatores no preparo das suspensões

1.5.1.1 Tamanho da partícula

Em amostragem de suspensão, o tamanho da partícula, além de influenciar na estabilidade e homogeneidade da suspensão, influencia, também, na eficiência de transporte da amostra e, na atomização do analito. Em vista disso, esse fator tem um efeito mais acentuado em técnicas, que usam sistemas de nebulização para introdução da amostra onde há risco de entupimento e bloqueio a exemplo da FAAS, ICP OES e ICP-MS. Esse fator já não é tão crítico quando suspensões são analisadas empregando ET AAS devido à forma de introdução da amostra. O tamanho da partícula mais adequado a ser usado depende de algumas variáveis que devem ser consideradas, tais como: (i) sistema de homogeneização; (ii) natureza da amostra; (iii) homogeneidade da amostra (com relação ao analito); (iv) densidade da amostra; (v) tempo de preparação da suspensão e (vi) técnica analítica empregada [100, 103-104].

Partículas com grandes diâmetros afetam a repetibilidade, a perda da homogeneidade e estabilidade da suspensão, sendo necessária então a moagem da amostra, que pode ser realizada através de almofariz de porcelana, moinho de bolas e moagem criogênica. No entanto, juntamente com essas etapas estão inseridas algumas desvantagens, tais como: (i) risco de contaminação, (ii) aumento do tempo de análise e (iii) problemas de eletricidade estática quando partículas muito pequenas, obtidas por moagem, são pesadas [100,103].

1.5.1.2 Meio líquido/diluyente

O diluyente consiste em um componente crucial no preparo de suspensões, pois, além de atuar como meio para isto, pode atuar como extrator do analito, melhorando, assim, a precisão e a exatidão, uma vez que há transferência dos analitos para a fase líquida [106]. A seleção do diluyente é feita com base na natureza da matriz e no analito de interesse. Diferentes tipos de diluentes têm sido reportados para a preparação das suspensões, sendo o HNO_3 diluído o mais utilizado para

diversas matrizes, tanto orgânicas como inorgânicas. Outras substâncias ácidas também podem ser utilizadas isoladas ou combinadas com o HNO_3 [107]. Também o uso de H_2O é reportado na literatura como diluente, com bons resultados [108-109]. Soluções alcalinas não são usualmente utilizadas como diluentes, mas alguns trabalhos têm reportado o uso de hidróxidos de alquil amônio como solubilizadores de matrizes biológicas [110].

1.5.1.3 Concentração da suspensão

Um importante fator no procedimento de amostragem de suspensão é a relação/razão entre a massa sólida e o volume do diluente utilizado. A escolha da massa da amostra e do volume do diluente deve ser feita de acordo com a homogeneidade e com o teor do analito na amostra. Para amostras contendo baixas concentrações de elementos, suspensões mais concentradas devem ser preparadas com o intuito de se obter parâmetros analíticos mais adequados, como menores limites de detecção e quantificação, contanto que o aumento das partículas em suspensão não afete a eficiência do transporte e não produza efeitos de matriz [100,103].

Já para amostras homogêneas e com altas concentrações do analito é adequado o uso de uma razão menor entre a massa da amostra e volume do diluente para obtenção de parâmetros analíticos mais adequados, tais como precisão e exatidão. Por outro lado deve-se considerar uma série de problemas que se pode advir do uso de suspensões mais concentradas, tais como, maior risco de efeito de matriz, comprometimento da eficiência de transporte e dificuldades de manutenção da estabilidade de suspensões para amostras de alta densidade [100,103].

1.5.1.4 Partição do analito

Representa a porcentagem de analito extraído para a fase líquida da suspensão, cuja eficiência influencia a precisão e a exatidão do procedimento. A porcentagem de extração para um dado analito depende de um conjunto de

parâmetros, como: (i) característica da matriz; (ii) força da ligação entre elemento e matriz; (iii) natureza do analito; (iv) tamanho da partícula; (v) tipo e concentração do diluente; (vi) eficiência de homogeneização e (vii) tempo de exposição do diluente à homogeneização. Além desses conjuntos de parâmetros que influenciam no processo de amostragem de suspensão, a partição do analito é um fator de fundamental importância na avaliação dos métodos de calibração quando se trabalha com a espectrometria atômica [100,103,105].

1.5.1.5 Homogeneização da suspensão

Sistemas de agitação são comumente empregados no preparo das suspensões, visando uma distribuição homogênea das partículas no meio líquido para garantir a representatividade da amostra, visto que afetam diretamente a precisão e exatidão do procedimento, devido o fato do analito estar distribuído principalmente em partículas de alta densidade as quais sofrem rápida sedimentação, portanto, os sistemas de homogeneização são responsáveis diretos por evitar a rápida sedimentação do material particulado. Os sistemas de agitação mais comumente utilizados no preparo das suspensões são: a agitação manual, a agitação magnética, misturador por efeito vortex, agitação baseada em borbulhamento de gás e agitação ultrassônica [100,103-104]. Outros sistemas de homogeneização podem ser utilizados, no entanto, são vistos como meios alternativos, e não se situam como sistemas efetivos.

1.5.1.6 Agentes estabilizantes

O uso de agentes estabilizantes é outra maneira de se obter a homogeneidade da suspensão. Atuam de acordo com as características físico-químicas das amostras sólidas e influenciam a precisão das medidas uma vez que evitam a rápida sedimentação das partículas e a formação de aglomerados, dificultando a movimentação das partículas no meio, aumentando a viscosidade do meio [100,103,105]. Para suspensões de materiais de alta densidade, o uso de

agentes estabilizantes torna-se primordial. Os compostos ou mistura de compostos mais reportados na literatura como agentes estabilizantes são viscalex, glicerol, surfactantes não iônico como triton X-100, etanol, isopropanol, glicerol-metanol e glicerol-água, sendo que a capacidade de estabilização destes agentes depende da característica da amostra, do tamanho das partículas e da concentração do agente estabilizante [111-112]. A quantidade do agente estabilizante a ser utilizado deve ser determinada de forma criteriosa, visto que o seu uso de forma inadequada aumenta a possibilidade de contaminação da amostra, de interferências químicas e de problemas na pipetagem que podem comprometer a precisão [100,103-104].

1.5.2 Método de calibração

Em amostragem de suspensão, a avaliação do método de calibração é de grande importância para a validação do procedimento analítico, visto que o comportamento do analito na amostra e no padrão aquoso pode ser diferente indicando efeito da matriz. Desta forma, o método de calibração utilizando padrões aquosos não pode ser diretamente utilizado para suspensões sem avaliações prévias [100].

Alguns métodos de calibração têm sido empregados para a determinação da concentração do analito em amostragem de suspensão. Dentre elas se destacam: a calibração usando padrões aquosos, o método de adição de analito e o método de calibração usando CRM ou matriz sintética [100,105].

O método de calibração externa utilizando padrões aquosos para a quantificação do analito, quando se trabalha com amostragem de suspensão, só pode ser aplicado quando não há diferença significativa entre a inclinação da curva de calibração usando padrões aquosos e a inclinação da curva obtida com adição de analito. A simplicidade, o baixo custo e o menor tempo de análise são características inerentes a este método de calibração, uma vez que uma única curva analítica pode ser utilizada na análise de diversas amostras de uma mesma matriz [100].

Quando diferenças significativas são encontradas entre as inclinações da curva de calibração externa e da curva de adição de analito há um pronunciado efeito da matriz que não permite o uso de padrões aquosos na calibração. Nestes

casos, o mais adequado a se fazer é usar o método de adição de analito desde que, o efeito da matriz seja semelhante para um determinado número de amostras. Desta forma, uma inclinação média é estimada a partir das inclinações de curvas obtidas utilizando amostras da mesma matriz. Caso os efeitos da matriz sejam diferentes entre as amostras de uma mesma matriz, o uso de uma inclinação média não pode ser aplicado, logo o método de adição de analito deve ser aplicado para todas as amostras individuais da matriz, o que o torna um método laborioso [100].

1.5.3 Aplicação da amostragem de suspensão usando ácidos diluídos no preparo de amostras

Muitos são os trabalhos encontrados na literatura que descrevem o desenvolvimento de procedimentos baseados na aplicação da amostragem de suspensão como etapa de preparo de amostra para a determinação de metais em uma variedade de amostras. A seguir, será apresentada uma revisão bibliográfica de trabalhos publicados usando a amostragem de suspensão no preparo de amostras para determinação de metais.

Um procedimento baseado na amostragem de suspensão foi desenvolvido por Silva et al., [113] para determinação de Mn e Zn em amostras de chocolate em pó e detecção por FAAS. As variáveis empregadas no procedimento foram otimizadas por metodologia univariada. Após otimização, os parâmetros experimentais estabelecidos foram: massa da amostra de 150 mg, concentração do HCl de $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ e volume final da suspensão de 15,0 mL. A curva analítica usando padrões aquosos foi estabelecida para a calibração do procedimento. A exatidão do procedimento foi confirmada por análise dos CRMs de farinha de arroz (NIST SRM 1568a) e farinha de arroz (NIES CRM 10-b). A comparação estatística usando test-t foi utilizada, não mostrando diferença significativa entre os valores obtidos para o procedimento proposto e os valores certificados. O procedimento proposto foi aplicado para a determinação de Mn e Zn em seis amostras de chocolate em pó cujas concentrações encontradas variaram de 42,8 a 52,7 e 88,6 a $102,4 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente.

Araújo et al., [114] desenvolveram um procedimento para a determinação de Mn em amostras de farinha de trigo por amostragem de suspensão e determinação por FAAS. Um total de sete amostras de farinha de milho foi coletado na cidade de Salvador, Bahia, Brasil. As suspensões foram preparadas usando uma massa de 500 mg de amostra e uma solução de HNO₃ a 2,0 mol L⁻¹ como meio diluente para um volume de 50,0 mL. A homogeneização das suspensões foi realizada por agitação em banho ultrassônico durante o tempo de 15 min. A curva analítica usando padrões aquosos foi estabelecida para a calibração do procedimento, com limites de detecção de 0,13 µg g⁻¹, e RSD de 3,5%. A exatidão do procedimento foi avaliada por meio do CRM de farinha de milho (NIST 1567a) e também foi avaliada após procedimento de decomposição total e determinação por FAAS. A comparação estatística pelo teste-t não exibiu diferença significativa entre esses resultados.

Silva et al., [115] desenvolveram um procedimento de amostragem de suspensão para determinação de Cu, Fe e Mn em amostras de mariscos (ostras, lambretas e mexilhões) coletados em Ubatuba e na Baía de Todos os Santos, Bahia, Brasil. A detecção dos analitos foi realizada por FAAS. As condições experimentais foram otimizadas utilizando metodologia univariada e as suspensões foram preparadas usando uma massa de 80 mg da amostra previamente passadas em moinho criogênico e uma solução composta pela mistura de HNO₃:HCl (1:1) a 1,0 mol L⁻¹ como meio diluente para um volume de 10,0 mL. A homogeneização das suspensões foi realizada por agitação em banho ultrassônico durante o tempo de 30 min. A curva analítica usando padrões aquosos foi estabelecida para a calibração do procedimento. A exatidão do procedimento foi avaliada através da análise do CRM de Oyster tissue (NIST 1566b). A comparação estatística usando teste-t foi utilizada, não apresentando diferença significativa entre os valores obtidos para o procedimento proposto e os valores certificados.

A amostragem de suspensão foi utilizada por Cernohorský et al., [116] para a determinação de Na, K, Ca, Mg, S, P, Fe, Mn, Cu e Zn em amostras de farinha de trigo e alimentos pré-forno a base de farinha por ICP OES. As suspensões foram preparadas com 0,1% m/v de farinha em 0,1% m/v de Triton X-100 e 6% (v/v) de HNO₃. Banho ultrassônico foi usado para o tratamento das suspensões por um tempo de 15 min. O método de calibração usando padrões aquosos foi adotado para a quantificação dos elementos. A exatidão foi confirmada pela análise dos CRMs de

farinha de trigo (GBW 08503) e de arroz (NIST 1568a). O procedimento proposto foi aplicado para análise de duas amostras de farinha de trigo e quatro amostras de misturas pré-forno à base de farinha. Nenhuma diferença estatística foi encontrada quando os resultados foram comparados com aqueles obtidos após digestão total por micro-ondas das amostras analisadas.

Um procedimento baseado na amostragem de suspensão foi desenvolvido por Chen e Jiang [117] para a determinação de As, Cd e Hg por ICP-MS usando geração química de vapor (VG) por injeção em fluxo como sistema de introdução de amostra. Uma suspensão contendo 6% (m/v) de farinha, 0,7% (m/v) de tiouréia, 0,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Co (II) e 2,5% (v/v) de HCl foi injetada no sistema VG-ICP-MS para a determinação de As, Cd e Hg sem dissolução ou mineralização. Método de adição padrão e diluição isotópica foram usados para a quantificação dos analitos. O procedimento apresentou limites de detecção de 0,10; 0,16 e 0,07 ng g^{-1} para As, Cd e Hg. A exatidão foi avaliada pela análise de dois CRMs de farinha de trigo (NIST SRM 1567a) farinha de arroz (NIST SRM 1568a). Os resultados da análise dos materiais de referência concordaram com os valores certificados a um nível de 95% de confiança.

Brandão et al., [118] propuseram um procedimento de amostragem de suspensão para determinação de Zn em amostras de iogurte coletada na cidade de Salvador, Bahia, Brasil. A determinação do Zn foi realizada por HR-CS FAAS. As suspensões foram preparadas em um meio de HCl 2,0 mol L^{-1} . Uma massa de 1,0 g foi estabelecida e as suspensões foram submetidas a um tempo de 20 min de sonicação. O método de calibração usando padrões aquosos foi adotado para a quantificação dos elementos. Nestas condições, os limites de detecção e quantificação obtidos foram de 0,10 e 0,32 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente. A precisão expressa como RSD foi de 0,82 e 2,08% para amostras contendo concentrações de Zn de 4,85 e 2,49 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente. A exatidão do procedimento foi confirmada pela análise do CRM de leite em pó desnatado (NIST SRM 1549). O procedimento proposto foi aplicado para determinação de Zn em sete amostras de iogurte. O teor de Zn variou de 2,19 a 4,85 $\mu\text{g g}^{-1}$.

Silva et al., [119] desenvolveram um procedimento bem sensível para determinação de Hg em amostras de arroz usando amostragem de suspensão e determinação por CV AAS. As condições experimentais para geração CV AAS foram

otimizadas utilizando planejamento fatorial completo de dois níveis e planejamento Box-Behnken, considerando os fatores: concentração de HCl, concentração de tetraidroborato de sódio e volume de tetraidroborato de sódio, os quais apresentaram condições ótimas equivalentes a 1,5 mol L⁻¹, 1% (m/v) e 4,0 mL, respectivamente. Para a determinação de Hg em arroz, as suspensões foram preparadas por meio da sonicação da amostra pré-cozida em água, e utilizando HCl 6,0 mol L⁻¹ e tiouréia. Para a quantificação, álcool isoamílico foi adicionado no sentido de evitar a formação de espuma. Nestas condições, os limites de detecção e quantificação obtidos foram de 0,95 e 3,2 ng g⁻¹, respectivamente. A curva analítica usando padrões aquosos foi estabelecida para a calibração do procedimento. A exatidão foi confirmada mediante análise do CRM de farinha de arroz (NIST SRM 1568a) e o procedimento proposto foi aplicado na determinação de Hg em amostras de arroz adquiridas em supermercados de Salvador, Bahia, Brasil. Algumas amostras também foram analisadas após digestão total em forno micro-ondas e a avaliação estatística aplicando o teste-t pareado não apresentou nenhuma diferença significativa entre os dois procedimentos.

Um procedimento de amostragem de suspensão para determinação total de As por espectrometria de fluorescência atômica com geração de hidretos (HG AFS) em amostra de arroz (branco, parbolizado e integral) foi proposto por Santos et al., [120]. As suspensões foram preparadas usando uma massa de 200 mg da amostra e HNO₃ a 2,0 mol L⁻¹ e submetidas a banho ultrassônico por 30 min. Em seguida uma alíquota de 5,0 mL da suspensão foi tomada e 3,0 mL de HCl a 1,5 mol L⁻¹ e 1,5 mL de solução de iodeto de potássio a 10% foram adicionados. A curva analítica usando padrões aquosos foi estabelecida para a calibração do procedimento. A exatidão foi confirmada por análise do CRM de farinha de arroz (NIES SRM 10b), a precisão foi avaliada através do RSD que foi abaixo de 5,9%. O procedimento apresentou limites de detecção e quantificação de 1,1 e 3,3 ng g⁻¹, respectivamente. Este procedimento foi utilizado para determinar o teor de As em 24 amostras de arroz que foram adquiridas em supermercados da cidade de Salvador, Bahia, Brasil.

Outros trabalhos com amostragem de suspensão usando ácidos diluídos podem ser observados na Tabela 5.

Tabela 5 Aplicação do procedimento de amostragem de suspensão usando ácidos diluídos.

Amostra	Analito	Técnica	Tipo e concentração do ácido	Ref.
Folha de mandioca	Mn	FAAS	HNO ₃ a 2,0 mol L ⁻¹	[121]
Lamas de depuração	Cd e Fe	HR-CS ET AAS*	HNO ₃ e HF a 0,2 e 0,7 mol L ⁻¹	[122]
Antidepressivos	Mn	GF AAS	HNO ₃ a 1,2 % v/v	[123]
Sedimentos	Cd e Pb	GF AAS	HNO ₃ a 0,1 % v/v	[124]
Musgo	As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb	ET AAS	HNO ₃ a 0,2 mol L ⁻¹	[125]
Cosméticos	Ge, As, Cd, Sb, Hg e Bi	VG-ICP-MS	HCl a 1,2 % v/v	[126]

*HR-CS ET AAS – Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica de fonte contínua e alta resolução.

CAPÍTULO 2

PROPOSTA DE TRABALHO

2.1 Justificativa

Os procedimentos de preparo de amostras reportados na literatura que visam a determinação de elementos nutrientes nos produtos da mandioca são laboriosos e requerem a utilização de ácidos oxidantes concentrados, altas temperaturas e elevada pressão. Desse modo, estudos analíticos mais aprofundados devem ser realizados visando à implementação de novos procedimentos, que priorizem aspectos relacionados à diminuição do uso de ácidos concentrados, consumo de reagentes, geração de resíduos e de custos, além de priorizar a segurança do analista. Nesse sentido o uso dos ácidos diluídos no preparo de amostras de produtos da mandioca apresenta-se como uma alternativa viável, a fim de contornar as características indesejáveis dos procedimentos clássicos.

Apesar da importância econômica e alimentícia dos produtos da mandioca, ainda são escassas, na literatura, informações relacionadas ao seu conteúdo de elementos nutrientes. Considerando o exposto, entendemos a necessidade de conhecer a concentração de nutrientes em amostras de produtos da mandioca produzidos na região Sul da Bahia, a fim de apresentar à comunidade informações nutricionais.

2.2 Objetivo geral

Desenvolver estratégias analíticas para o preparo de amostras de produtos e coprodutos da mandioca usando ácidos diluídos, visando determinação de elementos nutrientes por espectrometria atômica.

2.2.1 Objetivos específicos

- Desenvolver um procedimento de preparo de amostras de casca de mandioca baseado na extração com ácidos diluídos visando determinação de elementos nutrientes por FAAS;
- Desenvolver um procedimento analítico baseado na amostragem de suspensão para o preparo de amostras de goma de mandioca visando determinação de elementos nutrientes por FAAS;
- Otimizar as variáveis envolvidas nos procedimentos analíticos propostos utilizando metodologias univariada e multivariada;
- Utilizar ferramentas quimiométricas para avaliação dos teores de metais e não metais em amostras de farinha de mandioca produzidas e comercializadas no Sul do Estado da Bahia;
- Dissertação do mestrado;
- Publicação de artigo científico em periódico de qualidade reconhecida pela CAPES.

2.3 Instrumentação e acessórios

Os experimentos foram realizados utilizando o auxílio dos equipamentos relacionados a seguir:

- Espectrômetro de absorção atômica com chama (FAAS) SpectrAA 240 FS Varian (Mulgrave, Victória, Austrália), tendo a lâmpada de deutério para correção de sinal de fundo e lâmpadas de cátodo oco como fontes de radiação. Os elementos foram determinados de acordo com as condições operacionais recomendadas pelo fabricante, sendo: Corrente da lâmpada em 10 mA; altura do queimador em 13,5 mm; vazão de acetileno em 1,5 L min⁻¹; vazão de ar em 13,5 L min⁻¹; taxa de aspiração em 6,0 mL min⁻¹; e comprimentos de onda em 424,7 nm (Ca), 285,2 nm (Mg), 324,8 nm (Cu), 279,5 nm (Mn), 243,3 nm (Fe) e 213,9 nm (Zn), operando no modo multielementar sequencial.

- Estufa de secagem com circulação de ar (Odontobrás, Brasil) foi utilizada para retirada da umidade das amostras de casca de mandioca.
- Moinho de facas tipo (Wiley ACB LABOR) foi utilizado para triturar as amostras de casca de mandioca e moinho de bolas (FL SHIMIDT model 8000) foi utilizado para reduzir o tamanho das partículas.
- Balança analítica (GEHAKA) foi utilizada para estabelecer a massa da amostra.
- Banho ultrassônico Unique, Modelo USC -1800 (Cortland, Nova York, EUA) foi utilizado para auxiliar no procedimento de extração com ácidos diluídos e para o preparo das suspensões. Os tubos e os balões foram colocados no banho na região de maior intensidade de cavitação, previamente mapeados de acordo recomendações da literatura [127,128].
- Microscópio eletrônico de varredura (MEV) Shimadzu (Kioto, Japão) – Modelo Supercan SS-550 foi utilizado para realizar as medidas dos diâmetros das partículas.
- Forno micro-ondas doméstico (Philco) foi utilizado para auxiliar no procedimento de extração com ácidos diluídos.
- Centrífuga Eppendorf modelo 5804 (Alemanha) equipada com 16 tubos de 50 mL foi utilizada para auxiliar no procedimento de extração e para centrifugar as suspensões.
- Forno micro-ondas com cavidade Modelo MDS 40 (Master Sineo), equipado com 40 tubos, foi utilizado na digestão total das amostras.

2.4 Reagentes e soluções

Os reagentes utilizados no procedimento experimental foram: peróxido de hidrogênio (H_2O_2), 30 % (v/v) (Merck, Alemanha), ácido nítrico concentrado (HNO_3), 65% (m/v) (Merck, Alemanha), ácido acético concentrado (CH_3COOH) (Merck, Alemanha), ácido clorídrico concentrado (HCl) 37% (m/v) (Merck, Alemanha), água ultra-pura, com resistividade específica de $18,2 M\Omega cm^{-1}$, obtida de um sistema de purificação Milli-Q® (Millipore, Bedford, MA, USA). As soluções para a calibração

convencional usando padrões aquosos foram preparadas a partir de soluções estoque com concentração de 1000 mg L^{-1} (Quimis) de Ca, Mg, Fe, Cu, Mn e Zn.

Todos os materiais utilizados na coleta, armazenamento e preparo das amostras foram previamente lavados com detergente e descontaminados com HNO_3 (10% v/v) por um período mínimo de 12 horas. Antes do uso, a vidraria foi enxaguada com água deionizada e seca em um ambiente livre de poeira.

2.5 Resíduos gerados

Todas as soluções aquosas contendo metais que deixaram de ser usadas durante o desenvolvimento do trabalho foram acondicionadas em um recipiente plástico para posterior tratamento devido.

CAPÍTULO 3

PROCEDIMENTO DE PREPARO DE AMOSTRAS DE CASCA DE MANDIOCA USANDO EXTRAÇÃO COM ÁCIDOS DILUÍDOS PARA A DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS NUTRIENTES POR FAAS

3.1 Amostragem e tratamento preliminar das amostras

Um total de nove amostras foram adquiridas e analisadas. Desse total, seis amostras foram coletadas diretamente em propriedades rurais que fazem uso da casca da mandioca na dieta de gado de leite. Cada amostra foi coletada em propriedades rurais localizadas em diferentes cidades da região Sul da Bahia, sendo elas: Teixeira de Freitas, Alcobaça, Itamaraju, Eunápolis, Mucuri e Nova Viçosa.

As amostras foram submetidas a um processo de pré-tratamento sendo efetuada a lavagem com água corrente e água deionizada, secagem em estufa com circulação de ar a uma temperatura de 60 °C durante 24 horas para retirada da umidade. Posteriormente as amostras foram trituradas em moinho de facas e submetidas a moinho de bolas para redução do tamanho das partículas e peneirado em malhas de nylon com poros de 300 µm. Em seguida, foram acondicionadas em frascos de polietileno previamente descontaminados e armazenadas em dessecador.

Foram fornecidas pelo Laboratório de Reaproveitamento de Resíduos Agroindustriais da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, campus de Itapetinga, amostras na forma *in natura* e, bioprocessadas com fungos filamentosos *Aspergillus niger* e o *Aspergillus oryzae*, obtidos de acordo com a metodologia descrita por Cruz et al.,[129].

Como não se encontram disponíveis no mercado CRM para a matriz estudada, foi utilizado o CRM de folha de maçã NIST-1515 (*Apple leaves*) para avaliar a exatidão do procedimento.

3.2 Preparo das amostras

3.2.1 Procedimento de extração

Uma massa de 200 mg da amostra foi pesada diretamente em tubos de centrífuga. Posteriormente, adicionou-se 10,0 mL da mistura extratora composta de 6,2 mL de HNO₃, 2,1 mL de HCl e 1,7 mL de CH₃COOH a uma concentração final de 2,5 mol L⁻¹. A mistura foi submetida a banho ultrassônico por 30 min, em temperatura ambiente e, em seguida submetida a um tempo de radiação micro-ondas doméstico por 6 s. Por fim, foi centrifugada por 5 min a uma rotação de 2000 rpm e o sobrenadante foi separado e analisado por FAAS.

3.2.2 Decomposição das amostras em forno micro-ondas

O procedimento de decomposição total das amostra foi realizado utilizando uma massa de 200 mg da amostra e empregando uma mistura de 3,0 mL de HNO₃ 65% (m/v) e 2,0 mL de H₂O₂ 30 % (v/v). O forno micro-ondas foi utilizado de acordo com o programa de aquecimento recomendado pelo fabricante, como descrito a seguir: etapa 1: tempo de 8 min, potência de 500 watts e temperatura de 120 °C; etapa 2: tempo de 26 min, potência de 750 watts e temperatura de 180 °C. O digerido foi diluído com água ultrapura até um volume final de 25,0 mL. Este procedimento foi realizado em triplicata para cada amostra que foi analisada.

3.3 Estratégias de otimização do procedimento

O procedimento proposto foi otimizado utilizando metodologias univariada e multivariada. Na metodologia univariada as variáveis experimentais e os seus respectivos níveis estudados estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Variáveis e níveis estudados no planejamento univariado.

Variáveis	Níveis estudados
Tipo de extrator	HNO ₃ , HCl e CH ₃ COOH
Concentração do extrator, (mol L ⁻¹)	0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5
Tempo de sonicação, (min)	0; 10; 20; 30 e 40
Tempo de micro-ondas, (s)	0; 2; 4 e 6
Tempo de centrifugação, (min)	0; 5; 10 e 15

Com objetivo de melhorar o desempenho do procedimento, aplicou-se também um planejamento de misturas com restrições mínimas na otimização dos volumes das soluções HNO₃, HCl e CH₃COOH. Estabeleceu-se a restrição mínima de 5,0 mL para o HNO₃, 1,0 mL para HCl, e 1,0 mL para CH₃COOH. A Figura 2 mostra a região experimental delimitada pelos níveis estabelecidos para cada variável. O software Statistica 8.0 foi utilizado para o tratamento dos dados experimentais.

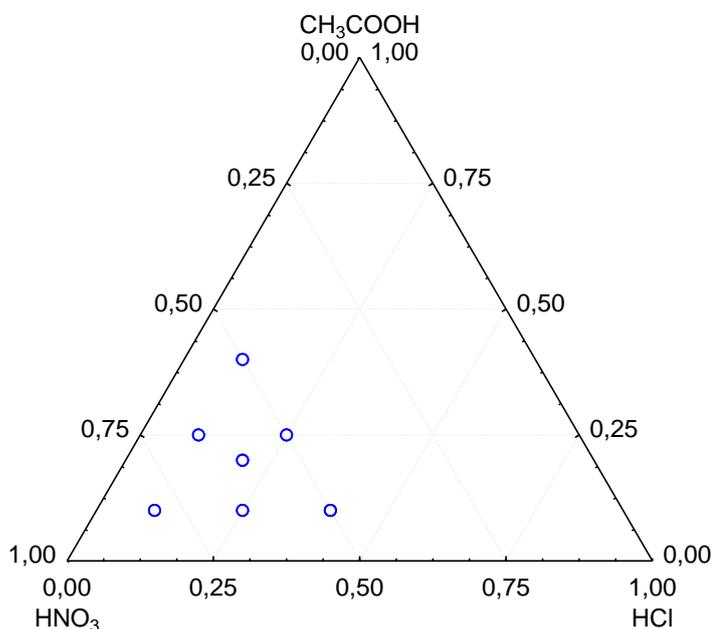


Figura 2. Região experimental do planejamento de misturas com restrições mínimas para cada componente.

3.4 Resultados e discussão

3.4.1 Otimização do tipo e concentração do extrator

Soluções individuais de HNO₃, HCl e CH₃COOH nas concentrações de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 mol L⁻¹ foram estudadas como meio extrator. Este estudo foi realizado fixando uma massa de 200 mg, tempo de sonicação de 20 min, tempo de radiação micro-ondas de 2 s e tempo de centrifugação de 10 min. Foi observado que com o aumento da concentração, todos os extratores mostraram-se significativos,

sendo que o HNO_3 , na concentração de $2,5 \text{ mol L}^{-1}$ mostrou efeito mais pronunciado sobre a resposta analítica (absorvância). Dessa forma o HNO_3 a $2,5 \text{ mol L}^{-1}$ foi utilizado nas etapas posteriores.

3.4.2 Otimização do tempo de sonicação

O estudo da influência do tempo de sonicação foi realizado considerando o domínio experimental de 0 a 40 min, com intervalos de 10 min observando-se o sinal analítico (absorvância). Este estudo foi realizado fixando uma massa de 200 mg, solução de HNO_3 a $2,5 \text{ mol L}^{-1}$, tempo de radiação micro-ondas de 2 s e tempo de centrifugação de 10 min. Um aumento significativo do sinal analítico foi obtido após 10 min de sonicação sendo que o máximo de resposta se deu aos 30 min. Dessa forma, 30 min de sonicação foi utilizado nas etapas posteriores.

Quando um tempo superior a 30 min foi estudado, observou-se uma diminuição no sinal analítico (Figura 3) para os elementos investigados exceto o Cu. Essa diminuição do sinal analítico pode ocorrer porque espécies diferentes podem ser formadas quando submetidas a um período mais longo de sonicação provocando a recombinação de diferentes estruturas, formando novas espécies que não contribuam efetivamente para o aumento do sinal analítico. Além disso, ainda pode ocorrer a formação de espécies que atuem como agentes quelantes e, desta forma, reduzam os íons presentes na fase líquida [130].

Resultados semelhantes foram encontrados por Nascentes et al., [80] quando diferentes amostras vegetais em meio de HNO_3 a $0,14 \text{ mol L}^{-1}$ foram expostas a um tempo superior de 20 min de sonicação, foi observado que os elementos Ca, Fe, Zn e Mn sofreram diminuição no percentual de extração. No trabalho de Saleh et al., [94] também foi observado comportamento semelhante para o Na e K quando amostras de ração animal em meio de HCl a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ foram expostas a um tempo superior a 10 min de sonicação. Li et al., [131] realizaram uma extração assistida por ultrassom para determinação de Mn em amostras de escórias, e observou que após 30 min de sonicação também ocorreu diminuição do percentual de extração.

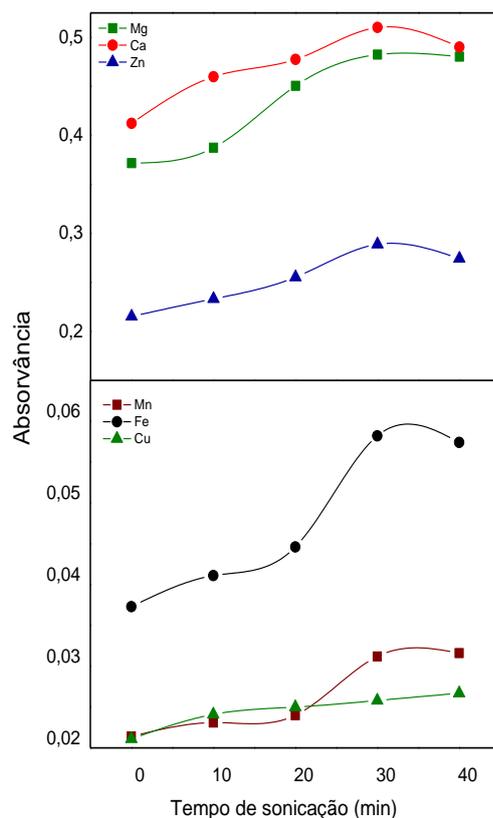


Figura 3. Influência do tempo de sonicação sobre o sinal analítico.

3.4.3 Otimização do tempo de radiação micro-ondas

Também foi estudado a influência do uso do micro-ondas doméstico no aumento da resposta analítica (absorvância). Este estudo foi realizado fixando uma massa de 200 mg, solução de HNO_3 a $2,5 \text{ mol L}^{-1}$ e tempo de centrifugação de 10 min. As amostras foram submetidas à radiação micro-ondas numa faixa de 0 a 6 s, com intervalos de 2 s. O máximo de resposta para todos os elementos foi obtido num tempo de 6 s (Figura 4), o que é esperado porque com o aumento de tempo de radiação ocorre um aumento gradual da temperatura e pressão no frasco reacional, o que em muitos casos, potencializa a extração do analito.

Além disso, o uso do ácido diluído também contribui de forma expressiva para a extração do analito, e isso se deve a capacidade dielétrica da água, que absorve expressivamente a radiação micro-ondas e a transforma em calor [32]. Tempos maiores de exposição da amostra a radiação micro-ondas não foram estudados

devido ao impedimento do frasco reacional utilizado, que quando exposto a tempos maiores de 8 s de radiação acabavam sofrendo explosão.

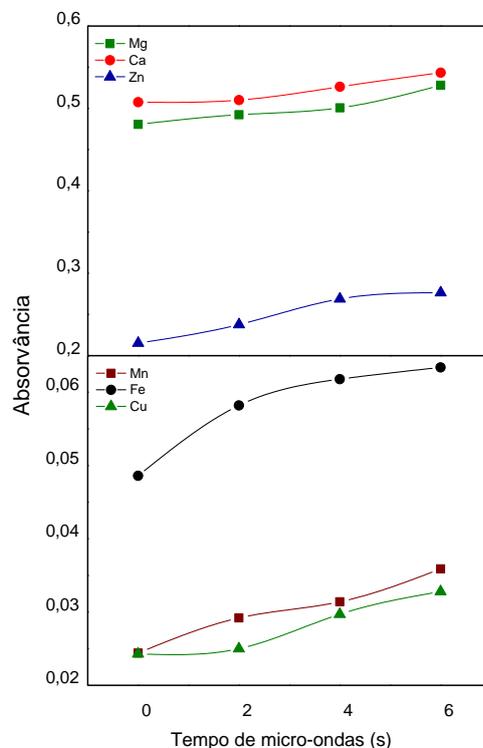


Figura 4. Influência do tempo de radiação micro-ondas sobre o sinal analítico.

3.4.4 Otimização do tempo de centrifugação

O efeito do tempo de centrifugação no procedimento de extração foi estudado considerando o domínio experimental de 0 a 15 min, com intervalos de 5 min. Este estudo foi realizado fixando uma massa de aproximadamente 200 mg, solução de HNO_3 a $2,5 \text{ mol L}^{-1}$, tempo de radiação micro-ondas de 6 s. Quando um tempo de 5 min foi investigado, observou-se que o máximo de resposta foi obtido, permanecendo praticamente constante até o tempo estabelecido de 15 min.

3.4.5 Planejamento de mistura com restrições mínimas

Após a otimização univariada das variáveis experimentais não foi possível confirmar a exatidão (através do CRM de folha de maçã) do procedimento usando as condições estabelecidas para cada variável. Durante os estudos preliminares do

tipo de solução extratora notou-se que todas elas foram significativas na extração, sendo que umas mais e outras menos.

Levando em consideração essas observações e, também, alguns trabalhos na literatura que utilizaram misturas de soluções ácidas diluídas em procedimentos de extração [82,84], optamos em realizar um planejamento de misturas a fim de investigar a influência da interação dos ácidos na resposta analítica, uma vez que no estudo univariado isso não é possível. Dessa forma, utilizamos todas as condições otimizadas no estudo anterior modificando apenas o tipo de solução extratora.

Com base nos estudos preliminares realizados durante a otimização da solução extratora, optamos pelo planejamento de misturas com restrições mínimas que permite restringir os componentes com valores mínimos. A restrição mínima imposta para cada componente da mistura foi estabelecida de acordo com as respostas obtidas durante o estudo univariado. No planejamento de misturas, o passo crucial para o sucesso do procedimento é a otimização das proporções adequadas das soluções extradoras.

Neste planejamento serão apresentados os resultados usando a desejabilidade global (DG), que é um método de otimização simultânea que consiste em encontrar os valores dos fatores que otimizem mais de uma respostas, ou no mínimo as mantenham em faixas desejáveis, utilizando métodos de programação não-linear. Inicialmente, essa função converte cada resposta y_i em uma função individual de desejabilidade d_i que varia de $0 \leq d_i \leq 1$. Se a resposta for o valor mais desejável, $d_i = 1$, caso contrário, $d_i = 0$ e a resposta está fora da região aceitável [132-133]. Assim, as variáveis independentes são escolhidas de modo a maximizar a DG, que normalmente é dada pela média geométrica das m desejabilidades individuais, como apresentado na Equação 5:

$$DG = \sqrt[m]{d_1 d_2 \dots d_m} \quad \text{Equação. 5}$$

A matriz experimental utilizada e, os valores de recuperação para os elementos estudados, são apresentados na Tabela 7. Todos os valores de recuperações e DG foram obtidos em triplicata para cada ensaio, a fim de estimar o erro experimental. Os valores de recuperação foram calculados a partir dos valores de referência obtidos pela decomposição total assistida por radiação micro-ondas.

Tabela 7. Matriz do planejamento de misturas (% de recuperação dos elementos), para otimização dos volumes das soluções ácidas.

Experimento	Variáveis (mL)			% recuperação						DG
	HNO ₃	HCl	CH ₃ COOH	Ca	Mg	Cu	Fe	Mn	Zn	
1	5,0	1,0	4,0	59	82	50	48	72	56	0,544
2	8,0	1,0	1,0	64	85	84	61	79	52	0,650
3	5,0	4,0	1,0	69	87	82	75	90	70	0,750
4	5,0	2,5	2,5	89	91	83	89	98	88	0,879
5	6,5	1,0	2,5	93	92	84	85	98	90	0,889
6	6,5	2,5	1,0	98	96	94	89	95	95	0,937
7	6,0	2,0	2,0	101	99	102	101	98	97	1,000

DG – desejabilidade global

3.4.6 Validação do modelo estatístico e experimental

Para a obtenção de resultados confiáveis é necessário avaliar a qualidade do modelo matemático, isto é, se ele se mostra capaz de descrever satisfatoriamente o comportamento dos valores experimentais. A qualidade de um modelo matemático pode ser testada por meio da análise de variância (ANOVA).

Os modelos matemáticos, linear e quadrático foram avaliados a fim de obter a melhor descrição dos dados experimentais. Para avaliar a qualidade do modelo, deve-se verificar o valor F da falta de ajuste. Se o modelo matemático é bem ajustado aos dados experimentais, a média quadrática da falta de ajuste (MQ_{faj}) deve refletir apenas os erros aleatórios inerentes ao sistema. Além disso, a média quadrática do erro puro (MQ_{ep}) também deve ser uma boa estimativa desses erros e presume-se que estes dois valores não são estatisticamente diferentes. Se a razão entre a MQ_{faj}/MQ_{ep} for inferior ao valor de $F_{tabelado}$, o ajuste do modelo é considerado satisfatório [134-135].

De acordo a ANOVA, apresentado na Tabela 8, observamos que a falta de ajuste para o modelo linear é significativa, pois o valor da razão da MQ_{faj}/MQ_{ep} é (459,15) superior ao valor de $F_{tabelado}$ (3,11) para 4 e 14 graus de liberdade respectivamente. Já para o modelo quadrático, a falta de ajuste não é significativa,

pois o valor da razão da MQ_{raj}/MQ_{ep} é (1,49) inferior ao valor de F_{tabela} (4,60) para 1 e 14 graus de liberdade, respectivamente. Assim, o modelo quadrático está bem ajustado aos dados obtidos, apresentando menores resíduos e, tendo, portanto uma boa capacidade de previsão.

Tabela 8. ANOVA usando a DG para os modelos linear e quadrático, com um nível de confiança de 95 %.

Modelo Linear					
Fonte de Variação	SS	Df	MS	$F_{Calculado}$	F_{tabela}
Modelo	0,0584	2	0,0292	1,34	3,55
Erro total	0,3909	18	0,0217		
Falta de ajuste	0,3880	4	0,0980	459,15	3,11
Erro puro	0,0029	14	0,0002		
Total	0,4494	20	0,0224		
Modelo Quadrático					
Fonte de Variação	SS	Df	MS	$F_{Calculado}$	F_{tabela}
Modelo	0,4461	5	0,0892	408,98	2,96
Erro total	0,0032	15	0,0002		
Falta de ajuste	0,0003	1	0,0003	1,49	4,60
Erro puro	0,0029	14	0,0002		
Total	0,4494	20	0,0224		

SS - Soma quadrática; df - grau de Liberdade; MS - media quadrática.

A qualidade do modelo matemático obtido na descrição do campo experimental estudado também foi realizada pela análise do gráfico das respostas experimentais em função dos valores preditos, apresentado na Figura 5. É possível observar a boa concordância entre os valores experimentais e os valores preditos pelo modelo, confirmando mais uma vez que o modelo quadrático está bem ajustado aos dados experimentais obtidos no planejamento. Essa observação confirma o bom ajuste do modelo que foi constatado na Tabela 8.

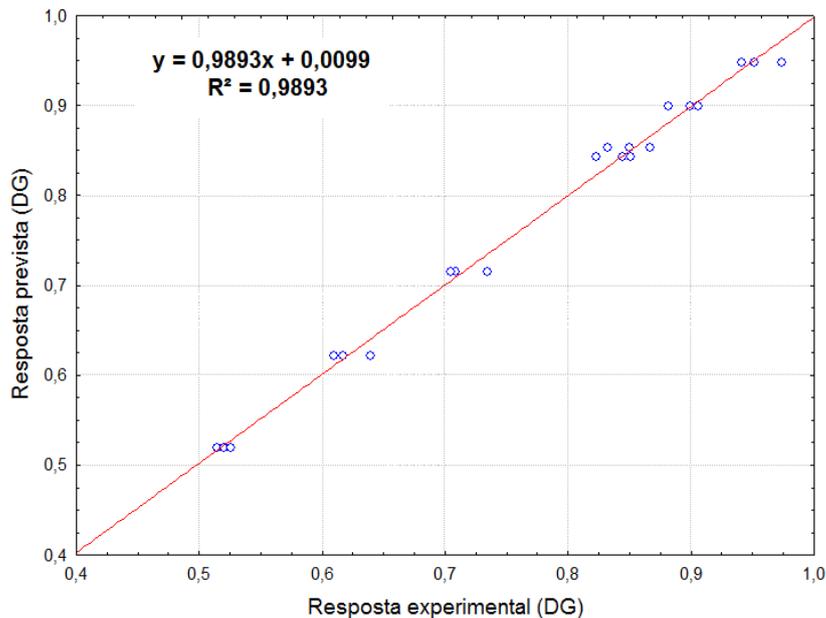


Figura 5. Resposta experimental em função da resposta prevista usando a DG para o modelo proposto.

Outro parâmetro a ser observado é o comportamento dos resíduos, ou seja, a diferença entre as respostas experimentais e as previstas. Tão importante quanto avaliar a falta de ajuste é examinar cuidadosamente os resíduos deixado pelo modelo. Num modelo bem ajustado, esses resíduos devem dar a impressão de terem sido produzidos por uma distribuição aleatoria, ou melhor, não devem apresentar nenhum indício de normalidade. Se um modelo deixar resíduos muito grandes ou tendenciosos ele é inadequado para fazer inferências precisas sobre o comportamento destes dados no campo experimental em questão [134-136].

A Figura 6 apresenta o gráfico das respostas previstas em função dos resíduos e, pode-se observar que existe uma tendência para a distribuição normal, em que os valores dos resíduos se distribuem aleatoriamente, e não há nada que indique que sua variância não é constante. Além disso, existem 11 e 10 resíduos positivos e negativos, respectivamente, e a magnitude é inferior a 0,03 DG.

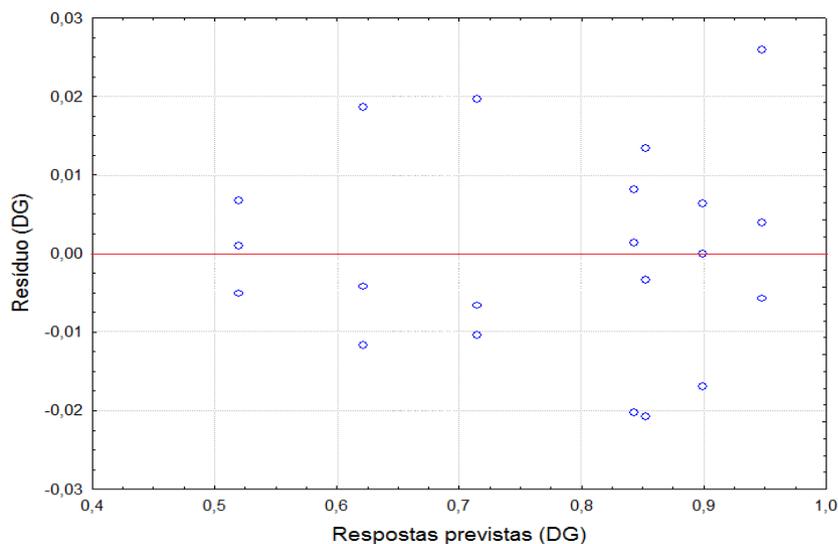


Figura 6. Resposta prevista em função do resíduo usando a DG para o modelo proposto.

3.4.7 Avaliação das condições experimentais no planejamento de misturas após a validação do modelo estatístico e experimental

Com o modelo proposto podemos então, investigar quais fatores (variáveis) influenciam no planejamento de misturas. Logo, é possível analisar tais respostas no gráfico de Pareto (Figura 7) calculado em função da DG. No qual, a magnitude dos efeitos é representada pelas colunas, enquanto que, a linha transversal às colunas representa a magnitude dos efeitos com significado estatístico para $p=0,05$, ou seja, os fatores que são estatisticamente significativos ao nível de 95% de confiança.

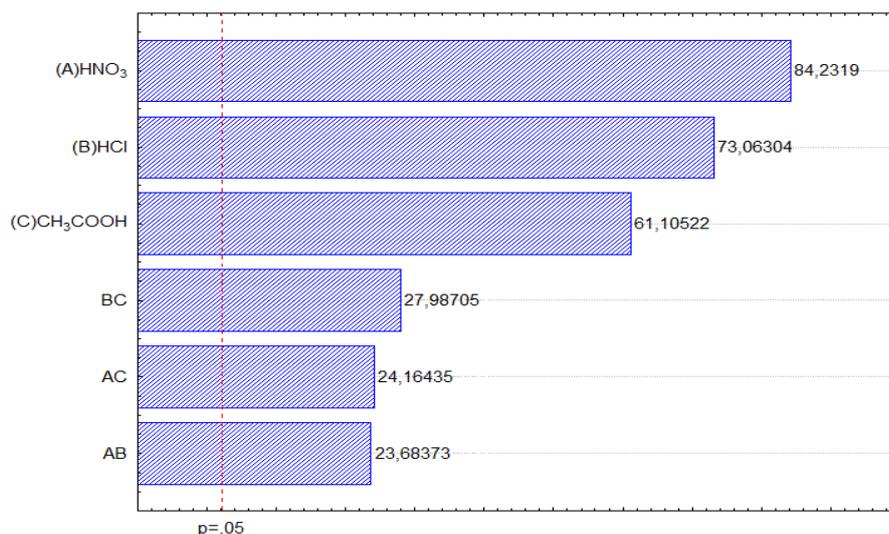


Figura 7. Gráfico de Pareto para o planejamento de mistura usando o modelo proposto.

O gráfico de pareto sugere que todas as variáveis estudadas assim como as interações entre as variáveis foram significativas (efeito positivo) dentro do domínio experimental estudado. Sendo que, a variável, com efeito, mais pronunciado foi o HNO₃ o que está de acordo à inspeção visual da superfície de resposta e com o gráfico de contorno apresentados na Figura 8. Através da inspeção visual da superfície de resposta e do gráfico de contorno é possível observar que há uma região ótima para cada extrator na mistura.

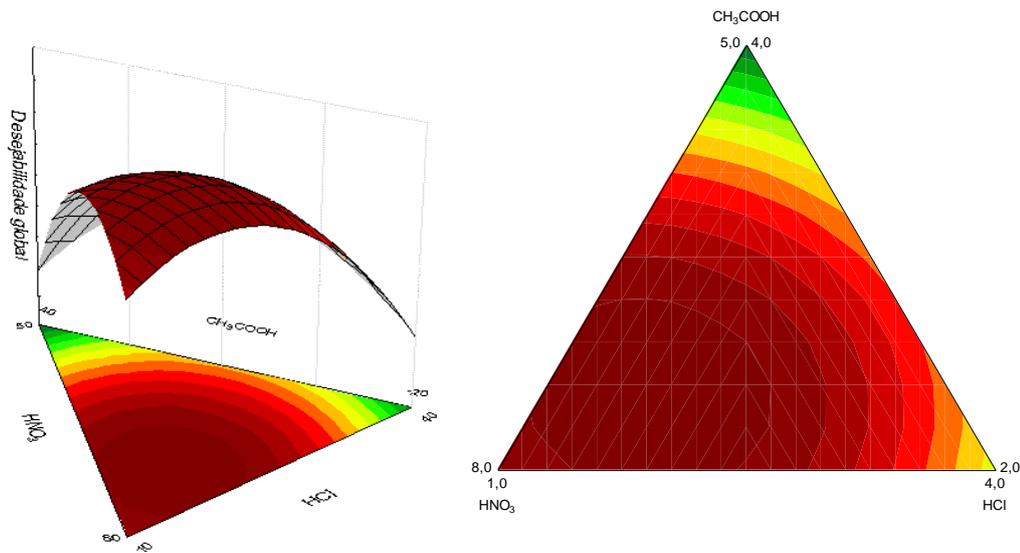


Figura 8. Superfície de resposta (a) e gráfico de contorno (b), para o planejamento de mistura usando a DG para o modelo proposto.

O modelo matemático que relaciona os fatores envolvidos na otimização do volume de cada extrator na mistura ácida, usando a DG, está representado abaixo pela equação 6, no qual os termos significativos estão destacados em vermelho e corroboram com as informações contidas no gráfico de pareto.

Equação. 6

$$DG = 0,715 V_{HNO_3} + 0,620 V_{HCl} + 0,519 V_{CH_3COOH} + 0,924 V_{HNO_3} V_{HCl} + 0,943 V_{HNO_3} V_{CH_3COOH} + 1,092 V_{HCl} V_{CH_3COOH}$$

Para obter os valores otimizados para cada extrator na mistura foi aplicado à função deseabilidade. De acordo os perfis de DG (última linha de gráficos da Figura 9), verificamos os valores recomendados para cada extrator. As coordenadas dos pontos são os volumes otimizados dos componentes que geram resposta mais

elevada para o sistema estudado. Assim, os valores ótimos estabelecidos para cada componente foram aproximadamente: 6,2 mL de HNO_3 , 2,1mL de HCl e 1,7mL de CH_3COOH .

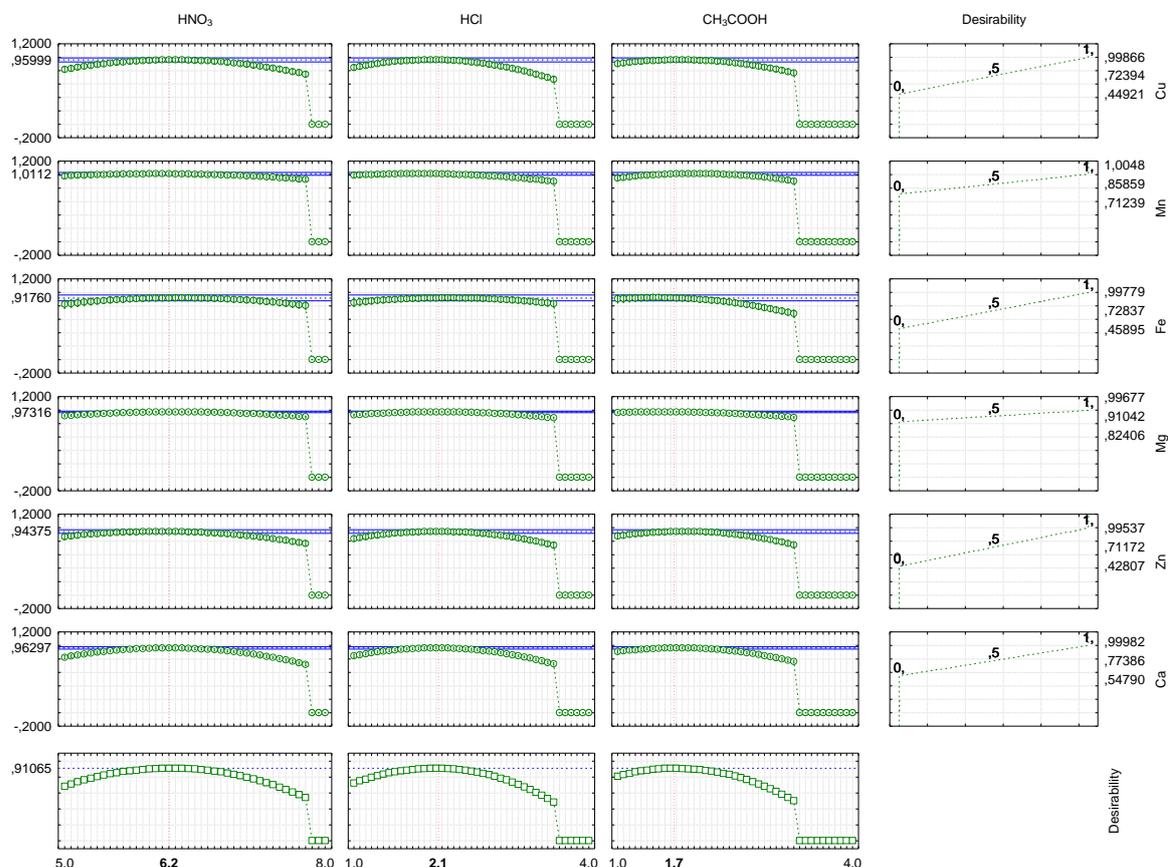


Figura 9. Perfis para valores preditos e deseabilidade individual e global na otimização das proporções de cada componente na mistura.

Após a otimização dos componentes da solução extratora, o procedimento foi aplicado novamente mantendo-se as condições otimizadas na abordagem univariada (concentração do extrator, tempo de sonicação, tempo de radiação micro-ondas e tempo de centrifugação). Dessa vez foi possível confirmar a exatidão do procedimento com um nível de confiança de 95%, mostrando que a mistura de ácidos juntamente com as demais variáveis potencializou o percentual de extração do procedimento proposto. Dessa forma, podemos confirmar que em alguns casos quando se utiliza mistura de soluções ácidas em procedimentos de extração, é verificado que normalmente há um ganho no percentual de extração.

Em trabalho realizado por Santos et al., [82] um procedimento de extração assistida por ultrassom foi aplicado em amostras de feijão, e foi observado que

quando uma mistura ácida composta por HNO_3 , HCl e CH_3COOH a $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ foi utilizada, melhores percentuais de extração foram obtidos. Barros et al., [84] propuseram um procedimento de extração assistida por ultrassom em amostras de ração de frango usando mistura de ácidos diluídos, e observou-se que a solução extratora composta por HNO_3 , HCl e CH_3COOH a $3,6 \text{ mol L}^{-1}$ também melhorou o rendimento de extração. Resultados semelhantes foram encontrados por Santos et al., [91] quando uma mistura de ácidos composta por HNO_3 , HCl e CH_3COOH a $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ foi aplicada na extração de metais assistida por ultrassom em amostras de mariscos.

3.5 Validação do procedimento

3.5.1 Avaliação do efeito da matriz e método de calibração

O teste de efeito da matriz pode ser realizado aplicando a método de adição de analito, também chamada de adição padrão, para uma solução teste derivada do material típico investigado ou da própria amostra [137]. A avaliação é feita por meio da comparação dos coeficientes angulares das curvas analíticas externas e dos coeficientes das curvas de adição de analito, empregando testes estatísticos [138].

Para avaliar o efeito de matriz e escolher o método de calibração para o procedimento, foram preparadas curvas de calibração externa com diluição dos padrões metálicos no meio extrator obtido durante a etapa de otimização. Também foram preparadas curvas de calibração com adição de analito em uma amostra de casca de mandioca, com diluição dos padrões metálicos antes da extração.

As equações das curvas analíticas são apresentadas na Tabela 9. Uma avaliação estatística aplicando o teste-t foi realizada para comparar as inclinações obtidas com as curvas analíticas externas e as curvas que usam a adição de analito e, os dois valores não apresentaram nenhuma diferença significativa, a um nível de 95% de confiança. Demonstrando, assim, que a matriz não interfere significativamente na determinação dos elementos e a calibração pode ser realizada por um ou outro método de calibração. Para simplificação do procedimento proposto, é recomendada a determinação dos elementos utilizando a calibração externa [100].

Tabela 9. Curvas analíticas obtidas com diferentes métodos de calibração.

Analito	Método de calibração	Equação	R²
Ca	Externa	$y = (0,0167 \pm 0,0025^a) C_{Ca} + (0,0031 \pm 0,0011^a)$	0,9997
	Adição de analito	$y = (0,0178 \pm 0,0029) C_{Ca} + (0,0322 \pm 0,0009)$	0,9999
Mg	Externa	$y = (0,0392 \pm 0,0089) C_{Mg} + (0,0187 \pm 0,0041)$	0,9999
	Adição de analito	$y = (0,0398 \pm 0,0076) C_{Mg} + (0,0265 \pm 0,0048)$	0,9991
Cu	Externa	$y = (0,1168 \pm 0,0152) C_{Cu} + (0,0003 \pm 0,0012)$	0,9987
	Adição de analito	$y = (0,1176 \pm 0,0137) C_{Cu} + (0,0084 \pm 0,0019)$	0,9999
Mn	Externa	$y = (0,1961 \pm 0,0179) C_{Mn} + (0,0009 \pm 0,0017)$	0,9999
	Adição de analito	$y = (0,1972 \pm 0,0165) C_{Mn} + (0,0116 \pm 0,0015)$	0,9999
Fe	Externa	$y = (0,0880 \pm 0,0112) C_{Fe} + (0,0026 \pm 0,0005)$	0,9996
	Adição de analito	$y = (0,0884 \pm 0,0102) C_{Fe} + (0,0216 \pm 0,0007)$	0,9998
Zn	Externa	$y = (0,2262 \pm 0,0201) C_{Zn} + (0,0107 \pm 0,0052)$	0,9998
	Adição de analito	$y = (0,2258 \pm 0,0214) C_{Zn} + (0,0315 \pm 0,0059)$	0,9997

3.5.2 Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção (LOD) pode ser definido como a menor massa de analito que pode ser detectada, com determinada certeza estatística. De acordo com as recomendações da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) [137] o LOD é determinado pela razão entre o desvio padrão do sinal analítico do branco (obtido por no mínimo 10 medidas) multiplicado por um fator de três e dividido pela inclinação da curva analítica, como apresentado na equação 7.

$$LD = 3 \times \frac{\sigma}{b} \quad \text{Equação. 7}$$

O limite de quantificação (LOQ) pode ser definido como a menor concentração de analito que pode ser determinada quantitativamente, com certeza estatística. De acordo com as recomendações da IUPAC [137] o LOQ é matematicamente expresso pela razão entre o desvio padrão do sinal analítico do branco pela inclinação da curva analítica (obtido por no mínimo 10 medidas)

multiplicado por um fator de dez, dividido pela inclinação da curva analítica, como expresso na equação 8.

$$LQ = 10 \times \frac{\sigma}{b} \quad \text{Equação. 8}$$

Os LOD e LOQ obtidos para o procedimento proposto são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. LOD e LOQ para o procedimento proposto.

Elemento	LOD (mg kg ⁻¹)	LOQ (mg kg ⁻¹)
Ca	10,4	34,7
Mg	3,7	12,3
Cu	0,5	1,7
Mn	0,4	1,3
Fe	1,6	5,3
Zn	1,7	5,6

3.5.3 Precisão

A precisão mede o grau de incerteza de um procedimento analítico, originada da dispersão das respostas instrumentais e da execução dos procedimentos. A precisão é um termo geral para avaliar a proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma amostra. Os três modos de expressá-la são por meio da repetitividade (precisão intra-corrída), precisão intermediária (precisão inter-corrídas) e da reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial) [137]. A precisão é expressa, matematicamente, em termos de desvio padrão relativo (ou coeficiente de variação), o qual é calculado pela razão entre o desvio padrão de várias medidas em uma determinada concentração (S_c) e a média das medidas dessa concentração (X_c), resultado expresso geralmente em percentagem, e pode ser calculado seguindo a equação 8.

$$RSD\% = \left(\frac{S_c}{X_c} \right) \cdot 100 \quad \text{Equação. 9}$$

A precisão neste trabalho foi expressa como RSD (%) para sete extrações distintas de uma mesma amostra. Os valores de RSD (%) foram sempre inferiores a 5,4 % e são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. RSD (%) para o procedimento proposto.

Elementos	RSD (%)
Ca	2,9
Mg	3,4
Cu	5,4
Fe	3,2
Mn	3,8
Zn	1,9

3.5.4 Exatidão

A exatidão de um procedimento analítico pode ser confirmada pela proximidade dos resultados individuais encontrados em um determinado método, em relação a um valor de referência, ou a um valor aceito como o mais provável. A checagem da exatidão pode ser feita utilizando-se, preferencialmente, os seguintes procedimentos: avaliação de CRM, aplicação de procedimento com reconhecida exatidão, aplicação de um método independente e medida do analito por método de adição e recuperação [137].

Neste trabalho a exatidão do procedimento foi avaliada por meio do CRM de folha de maçã NIST 1515. Os resultados obtidos considerando o uso do procedimento proposto são apresentados na Tabela 12. Uma comparação estatística usando o teste-t mostrou que não há diferença significativa entre o valor obtido pelo uso do procedimento proposto e o valor certificado a um nível de 95% de confiança.

Tabela 12. Concentrações encontradas no CRM de folha de maçã NIST 1515 pelo procedimento proposto (média ± desvio padrão; n=3).

Elemento	Concentração (mg kg ⁻¹)	
	Valor certificado	Valor encontrado*
Ca	15260 ± 150	15263 ± 229
Mg	2710 ± 80	2718 ± 68
Cu	5,64 ± 0,24	5,66 ± 0,26
Fe	83,0 ± 5,0	84,0 ± 2,0
Mn	54,0 ± 3,0	53,0 ± 1,7
Zn	12,5 ± 0,3	12,1 ± 0,2

*N=3

A exatidão também foi avaliada mediante o emprego de metodologia estabelecida usando decomposição total assistida por radiação micro-ondas e o procedimento proposto, os resultados obtidos são apresentados na Tabela 13. A avaliação estatística aplicando o teste-t pareado mostrou que os dois procedimentos não apresentam valores significativamente diferentes a um nível de 95 % de confiança.

Tabela 13. Concentrações em uma amostra real determinada pelo procedimento proposto e pela decomposição total assistida por radiação micro-ondas (média ± desvio padrão; n=3).

Elemento	Concentração (mg kg ⁻¹)*	
	Procedimento proposto	Decomposição em MW**
Ca	1805 ± 38	1823 ± 29
Mg	633 ± 19	635 ± 15
Cu	10,4 ± 0,5	10,8 ± 0,4
Fe	24,5 ± 0,6	23,7 ± 0,5
Mn	8,85 ± 0,27	9,05 ± 0,23
Zn	49,3 ± 0,5	48,3 ± 0,5

*N=3

** Forno micro-ondas com cavidade.

3.6 Aplicação do procedimento proposto

O procedimento desenvolvido foi aplicado na determinação de Ca, Mg, Cu, Fe, Mn e Zn em amostras de casca de mandioca *in natura* e bioprocessadas utilizadas como complemento na alimentação de vacas de leite. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 14. Com base nos resultados apresentados, para as diferentes amostras de casca de mandioca pôde-se verificar que as concentrações de alguns elementos variam de acordo com a localidade. Das amostras analisadas, observou-se que, a de Eunápolis foi a que apresentou maior concentração de Mg, Fe, Zn e Mn. A amostra de Itamaraju apresentou maior concentração de Ca, mas não diferenciando muito das demais, exceto das amostras de Itapetinga na forma *in natura* e bioprocessada que apresentou valores inferiores quando comparada às demais. Por outro lado as amostras de Itapetinga apresentaram concentrações de Cu bem mais elevadas em relação às outras.

Tabela 14. Concentrações encontradas em amostras reais utilizando o procedimento proposto (média \pm desvio padrão; n=3).

Amostra	Concentração (mg kg ⁻¹)					
	Ca	Mg	Cu	Fe	Mn	Zn
1	2066 \pm 45	819 \pm 15	7,07 \pm 0,31	120 \pm 3	13,2 \pm 0,38	52,9 \pm 0,7
2	2538 \pm 38	928 \pm 23	6,17 \pm 0,19	69,7 \pm 1,7	8,28 \pm 0,16	47,1 \pm 0,5
3	1979 \pm 41	730 \pm 19	5,90 \pm 0,26	36,8 \pm 0,9	5,10 \pm 0,10	46,8 \pm 0,6
4	1907 \pm 34	687 \pm 17	6,24 \pm 0,28	35,4 \pm 1,1	6,94 \pm 0,25	52,4 \pm 0,9
5	2512 \pm 39	910 \pm 26	7,91 \pm 0,24	55,3 \pm 1,4	18,5 \pm 0,5	77,6 \pm 1,1
6	2507 \pm 42	965 \pm 25	9,36 \pm 0,25	139 \pm 3	36,8 \pm 1,2	128 \pm 2
7	1801 \pm 40	929 \pm 23	11,2 \pm 0,45	24,7 \pm 0,7	14,9 \pm 0,3	49,6 \pm 0,7
8	1805 \pm 38	633 \pm 14	10,4 \pm 0,52	24,0 \pm 0,6	8,77 \pm 0,28	49,1 \pm 0,6
9	1772 \pm 35	639 \pm 11	10,5 \pm 0,38	23,7 \pm 0,7	7,78 \pm 0,16	48,4 \pm 0,4

1 – Teixeira de Freitas; 2 – Alcobaça; 3 – Nova Viçosa; 4 – Mucuri; 5 – Itamaraju; 6 – Eunápolis; 7 – Itapetinga; 8 – Itapetinga bioprocessada com *Aspergillus Niger*; 9 – Itapetinga bioprocessada com *Aspergillus Arizal*.

As amostras de casca de mandioca apresentaram concentrações semelhantes para o Fe, Cu, Mn e Zn e maiores concentrações de Ca e Mg quando comparados a outras fontes de alimento alternativo mais comumente utilizados na

alimentação de vacas em lactação, como: casca de arroz e sorgo [139] e, bagaço de cana [140]. Cabe ressaltar a importância de se oferecer a animais em lactação alimentos ricos em Ca e Mg uma vez que o leite produzido por eles possui quantidades consideráveis desses elementos [141].

Em trabalho realizado por Burns et al., [142], no qual foram analisadas as concentrações de Fe e Zn nas folhas e raízes da mandioca que também podem ser utilizadas na alimentação animal, foram encontrados resultados inferiores nas raízes quando comparados com os valores da casca encontrados nesse trabalho, já nas folhas maiores, concentrações desses elementos foram encontrados. Ceni et al., [143] avaliaram a concentração de Ca, Mg, Fe, Zn, Cu e Mn nas raízes de cinco cultivares de mandioca e, apenas o Fe apresentou uma maior concentração em relação a casca da mandioca.

3.7 Conclusões

Neste trabalho foi proposto um procedimento de extração de elementos nutrientes com ácidos diluídos, assistida por ultrassom e micro-ondas, para a determinação de elementos nutrientes em amostras de casca de mandioca utilizadas como complemento em alimentação animal. A otimização multivariada usando o planejamento de misturas com restrições mínimas e a metodologia univariada possibilitou encontrar as melhores condições para a extração dos elementos.

O procedimento proposto apresentou uma boa exatidão evidenciada pela análise do CRM NIST 1515 e pela decomposição total em forno micro-ondas, e a avaliação estatística aplicando o teste-t não apresentou diferença significativa a um nível de 95% de confiança. Precisão expressa como RSD (%) sempre inferior a 10 %. Somado a isso, foram alcançados baixos LOD e LOQ. Além disso, o efeito da matriz não interfere significativamente na determinação dos elementos e a calibração pode ser realizada de forma convencional ou com adição de analito. Estes resultados indicam a viabilidade de aplicação deste procedimento na determinação de Ca, Mg, Cu, Fe, Zn e Mn, em amostras de casca de mandioca.

O procedimento mostrou-se simples rápido, eficiente, de baixo custo, além de ser menos agressivo ao analista, aos equipamentos e ao meio ambiente quando comparado com os procedimentos convencionais. Os resultados obtidos no presente trabalho possui caráter relevante, pois, contribui para informação de pesquisadores da área de nutrição animal, bem como para os grandes e pequenos produtores, visto que são escassas as informações sobre a concentração de elementos nutrientes na casca de mandioca.

CAPÍTULO 4

DESENVOLVIMENTO DE PROCEDIMENTO DE AMOSTRAGEM DE SUSPENSÃO PARA DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS NUTRIENTES EM GOMA DE MANDIOCA POR FAAS

4.1 Amostragem

Um plano amostral baseado na coleta de oito amostras de goma de mandioca foi realizada diretamente em pontos de produção do produto nas cidades de Eunápolis, Teixeira de Freitas, Itabela, Mucuri, Nova Viçosa, Itamaraju, Medeiros Neto e Guaratinga, localizadas na região Sul da Bahia, Brasil. As amostras foram colocadas em recipientes descontaminados e transportadas para o laboratório, onde foram armazenadas em dessecador.

4.2 Determinação do diâmetro das partículas nas amostras de goma de mandioca por MEV

As medidas em MEV são realizadas em amostras tipicamente metálicas ou metalizadas. Para isso, uma fina camada da amostra foi disposta sobre uma fita de carbono aderida à superfície de um suporte para colocar a amostra antes da varredura no MEV, denominado de “*stub*”. Depois, foi feita a metalização, aplicando uma película fina de ouro sobre sua superfície do *stub* contendo a amostra. O material foi mantido em dessecador, e posteriormente foi efetuada uma varredura em MEV. Para a determinação dos diâmetros das partículas todas as amostras foram analisadas, antes do preparo da suspensão.

4.3 Preparo das amostras

4.3.1 Preparo das suspensões

Uma massa de 200 mg da amostra foi pesada diretamente em balão volumétrico de 25,0 mL e aferido com uma mistura de HNO₃:HCl (1:1) a uma concentração final de 1,7 mol L⁻¹. As suspensões foram então homogeneizadas por

26 min em banho ultrassônico e a solução foi aspirada diretamente pelo sistema de nebulização do FAAS para a determinação do Fe e Mg.

4.3.2 Decomposição total em forno de micro-ondas

O procedimento de decomposição foi realizado utilizando uma massa de 200 mg da amostra e empregando uma mistura de 3,0 mL de HNO₃ 65% (m/v) e 2,0 mL de H₂O₂ 30 % (v/v). O forno de micro-ondas foi utilizado de acordo com o programa de aquecimento recomendado pelo fabricante, como descrito a seguir: etapa 1: tempo de 8 min, potência de 500 watts e temperatura de 120 °C; etapa 2: tempo de 26 min, potência de 750 watts e temperatura de 180 °C. O digerido final foi diluído com água ultrapura até o volume de 25,0 mL. Este procedimento foi realizado em triplicata para cada amostra que foi analisada.

4.4 Otimização do procedimento

As variáveis que influenciam o preparo das suspensões foram otimizadas utilizando metodologia univariada para a massa da amostra, num intervalo de 100 a 600 mg e metodologia multivariada, usando o planejamento Box-Behnken, para otimizar as seguintes variáveis: tipo de extrator, concentração final da solução extratora e tempo de sonicação. Neste caso, todas as variáveis foram estudadas em três níveis e são apresentadas na Tabela 15, e como resposta do planejamento foi usada a percentagem de recuperação, comparado aos valores obtidos na decomposição total.

Tabela 15. Variáveis e níveis estudados no planejamento Box-Behnken.

Variáveis	Níveis		
	Mínimo (-1)	Ponto central(0)	Maximo (+1)
Tipo de extrator (TE)	HNO ₃	HNO ₃ :HCl	HCl
Concentração da solução extratora (CE), mol L ⁻¹	0,5	1,5	2,5
Tempo de sonicação (TS), min	10	20	30

4.5 Resultados e discussão

4.5.1 Determinação do diâmetro das partículas por MEV

As micrografias obtidas no MEV mostraram que as partículas apresentam dimensões heterogêneas, como observado na Figura (10a). Todas as partículas possuem formato esférico e diâmetro que varia entre 1,3 e 17 μm , de acordo com a Figura (10b). Esses resultados estão de acordo com relatos encontrados na literatura, na qual a recomendação geral é que se deve trabalhar com amostras cujo diâmetro das partículas sejam menores que 50 μm [144].

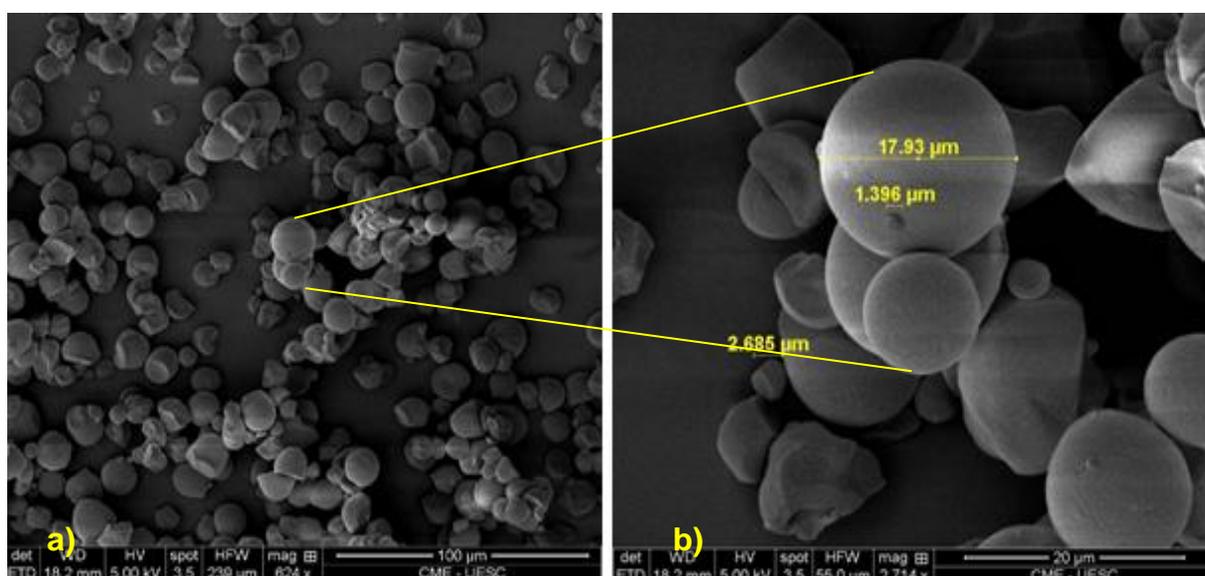


Figura 10. Micrografias de uma amostra de goma de mandioca: (a) visão geral das partículas e dos aglomerados; (b) dimensão e formato das partículas.

Recomenda-se ainda, que partículas com diâmetros entre 10 e 20 μm sejam utilizadas, pois, melhoram a precisão dos resultados além de incrementarem a extração do analito durante o preparo das suspensões em meio ácido [145-146]. É importante observar que as partículas possuem uma tendência a formar aglomerados justificando a necessidade de, serem submetidas ao processo de sonicação antes da introdução no sistema de nebulização do FAAS.

Além do fator diâmetro da partícula, a sua forma geométrica também pode influenciar no transporte até o sistema de nebulização. Assim, espera-se que as suspensões preparadas com amostras cujas partículas são mais uniformes

apresentem menos resistência no transporte e, conseqüentemente, menor predisposição a entupimento do sistema de nebulização. Devido ao tamanho reduzido das partículas, não houve, portanto, necessidade de operações de moagem ou peneiramento adicionais antes do preparo da suspensão, para posterior introdução no sistema de nebulização do equipamento.

4.5.2 Otimização do procedimento

4.5.2.1 Estudo da massa da amostra

A otimização da quantidade de amostra para o preparo da suspensão foi realizada utilizando-se 25,0 mL de HNO_3 a $2,5 \text{ mol L}^{-1}$ e um tempo de sonicação de 20 min. O domínio experimental da quantidade de massa foi definido a partir de estudos prévios, envolvendo problemas relativos ao entupimento do sistema de nebulização da amostra e quantidade de massa necessária para garantir uma faixa adequada de detecção dos analitos.

Mesmo no limite máximo do domínio experimental de 600 mg, não foi notado nenhum problema de entupimento do sistema de introdução da amostra no FAAS. Contudo, visando garantir a massa necessária para obtenção de sinais analíticos em uma faixa suficiente para a sua quantificação e introdução da menor quantidade possível de sólidos em suspensão, foi escolhida a massa de 200 mg. Na Figura 11 é apresentada a variação da intensidade do sinal analítico em função da variação de massa no intervalo entre 100 e 600 mg de amostra. Os valores da intensidade foram normalizados em função da massa utilizada.

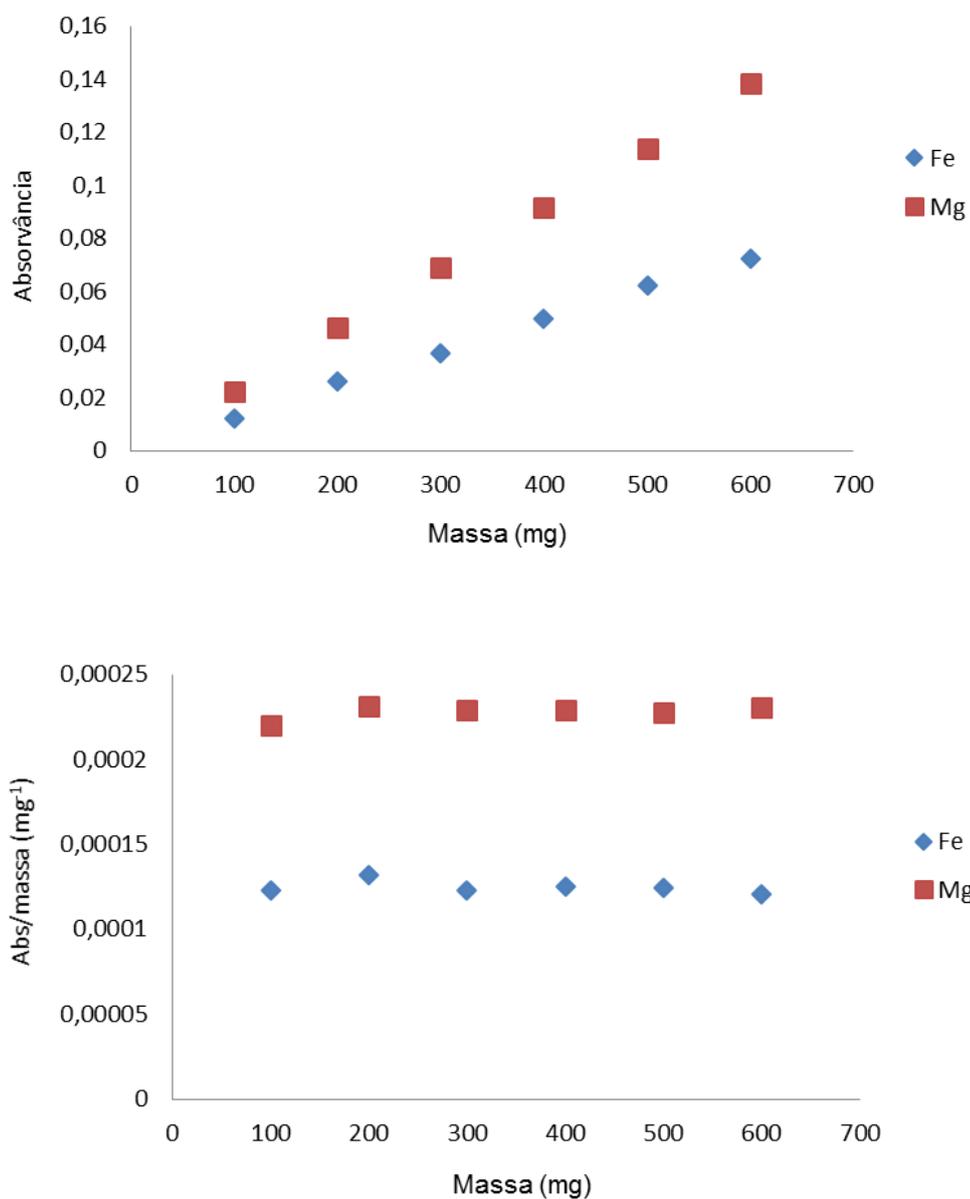


Figura 11. Influência da quantidade de massa no sinal analítico para o Fe e Mg.

4.5.2.2 Estudo do tipo de extrator, concentração do extrator e tempo de sonicação usando planejamento Box-Behnken.

Um planejamento Box-Behnken foi usado para otimização de três variáveis experimentais (TE, CE e TS), cuja matriz é estabelecida com 15 experimentos. A matriz experimental utilizada e os valores de recuperação para os elementos estudados são apresentados na Tabela 16. O método de otimização simultânea usando a DG, foi utilizada no tratamento dos dados. A triplicata no ponto central foi

utilizada, a fim de estimar o erro experimental. Os Valores de recuperação foram calculados a partir dos valores de referência obtidos pelo procedimento de decomposição total em forno micro-ondas.

Tabela 16. Matriz do planejamento Box-Behnken para otimização das variáveis envolvidas no procedimento de amostragem de suspensão e as respostas obtidas.

Experimento	Variáveis			% recuperação		DG
	TE	CE	TS	Fe	Mg	
1	HNO ₃ (-1)	0,5 (-1)	20 (0)	51	81	0,651
2	HCl (1)	0,5 (-1)	20 (0)	45	85	0,629
3	HNO ₃ (-1)	2,5 (1)	20 (0)	58	85	0,712
4	HCl(1)	2,5 (1)	20 (0)	60	86	0,728
5	HNO ₃ (-1)	1,5 (0)	10 (-1)	63	84	0,739
6	HCl (1)	1,5 (0)	10 (-1)	68	88	0,785
7	HNO ₃ (-1)	1,5 (0)	30 (1)	72	90	0,815
8	HCl (1)	1,5 (0)	30 (1)	73	89	0,736
9	HNO ₃ :HCl (0)	0,5 (-1)	10 (-1)	61	86	0,816
10	HNO ₃ :HCl (0)	2,5 (1)	10 (-1)	76	97	0,829
11	HNO ₃ :HCl (0)	0,5 (-1)	30 (1)	80	90	0,862
12	HNO ₃ :HCl (0)	1,5 (1)	30 (0)	83	96	0,907
13 (PC)	HNO ₃ :HCl (0)	1,5 (0)	20 (0)	97	99	0,999
14 (PC)	HNO ₃ :HCl (0)	1,5 (0)	20 (0)	93	99	0,972
15 (PC)	HNO ₃ :HCl (0)	1,5 (0)	20 (0)	98	98	0,996

TE - tipo de extrator; CE - concentração do extrator; TS - tempo de sonicação; DG - desejabilidade global; PC - ponto central.

4.5.2.3 Validação do modelo estatístico e experimental

Para a obtenção de resultados confiáveis é necessário avaliar a qualidade do modelo matemático, isto é, se ele se mostra capaz de descrever satisfatoriamente o comportamento dos valores experimentais. A avaliação do modelo matemático ajustado aos dados experimentais foi realizada por meio do teste da falta de ajuste

usando o valor de F e p . O valor calculado para MQ_{faj}/MQ_{ep} é igual (2,41) que é um valor menor que o $F_{tabelado}$ (19,16) e o valor de $p > 0,05$ evidenciando que o modelo quadrático descreve satisfatoriamente os dados experimentais obtidos, como pode ser observado na Tabela 17.

Tabela 17. ANOVA usando a DG para o modelo quadrático, com um nível de confiança de 95 %.

Modelo quadrático						
Fonte de variação		SS	Df	MS	$F_{calculado}$	$p\text{-valor}$
(1) TE	L+Q	0,115624	2	0,057812	258,06	0,00386
(2) CE	L+Q	0,075677	2	0,037838	168,90	0,00588
(3) TS	L+Q	0,014085	2	0,007043	31,43	0,03082
1*2		0,000352	1	0,000352	1,57	0,33650
1*3		0,000495	1	0,000495	2,20	0,27563
2*3		0,000581	1	0,000581	2,59	0,24849
Falta de ajuste		0,001625	3	0,000542	2,41	0,30672
Erro puro		0,000448	2	0,000224		
Total SS		0,194588	14			

L - linear; Q - quadrático; TE - tipo de extrator; CE - concentração do extrator; TS - tempo de sonicação; SS - Soma quadrática; Df - grau de Liberdade; MS - media quadrática.

A qualidade do modelo matemático obtido na descrição do campo experimental estudado também foi realizada pela análise do gráfico das respostas experimentais em função dos valores preditos, apresentado na (Figura 12). É possível observar a boa concordância entre os valores experimentais e os valores preditos pelo modelo, confirmando mais uma vez que o modelo quadrático está bem ajustado aos dados experimentais obtidos no planejamento. Essa observação confirma o bom ajuste do modelo que foi constatado na Tabela 18.

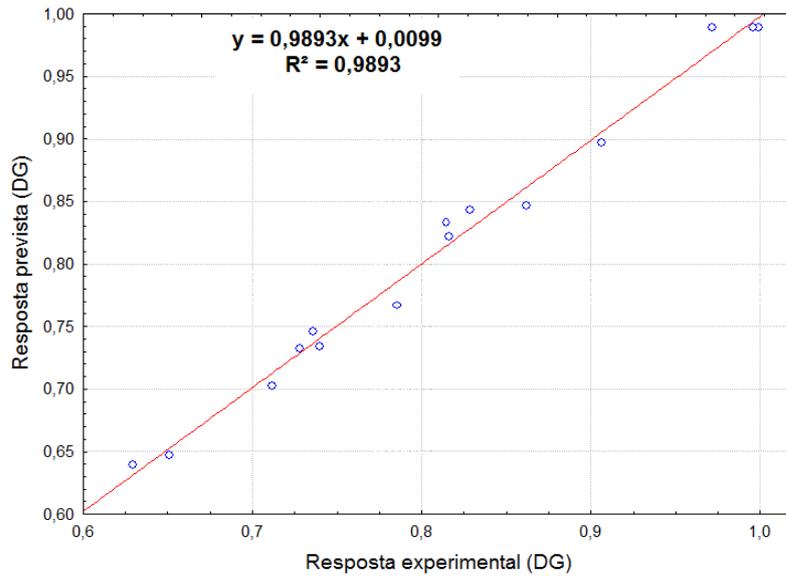


Figura 12. Resposta experimental em função da resposta prevista usando a DG para o modelo proposto.

Outro parâmetro a ser observado é o comportamento dos resíduos, ou seja, a diferença entre as respostas experimentais e as previstas. A Figura 13 apresenta o gráfico das respostas previstas em função dos resíduos e, pode-se observar que existe uma tendência para a distribuição normal, em que os valores dos resíduos se distribuem aleatoriamente, e não há nada que indique que sua variância não é constante. Além disso, existem 8 e 7 resíduos positivos e negativos, respectivamente, e a magnitude é inferior a 0,03 DG.

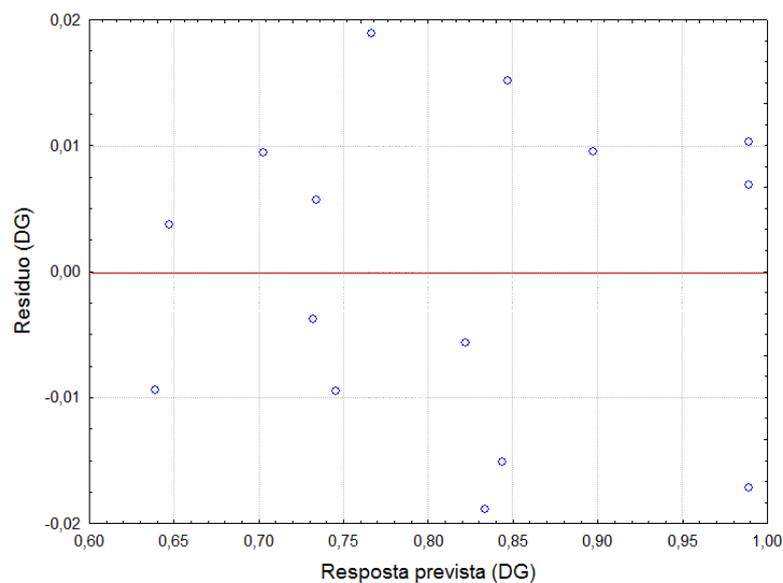


Figura 13. Resposta prevista em função do resíduo usando a DG para o modelo proposto.

4.5.2.4 Avaliação das condições experimentais após a validação do modelo estatístico e experimental.

Após a validação do modelo matemático mais adequado, foi possível investigar quais fatores (variáveis) influenciavam no procedimento proposto. Através da inspeção visual das superfícies de resposta e gráficos de contorno apresentados nas Figuras 14, 15 e 16 é possível verificar que existe uma região ótima para cada variável estudada. Essa região encontra-se na região entre os eixos onde o vermelho é mais intenso.

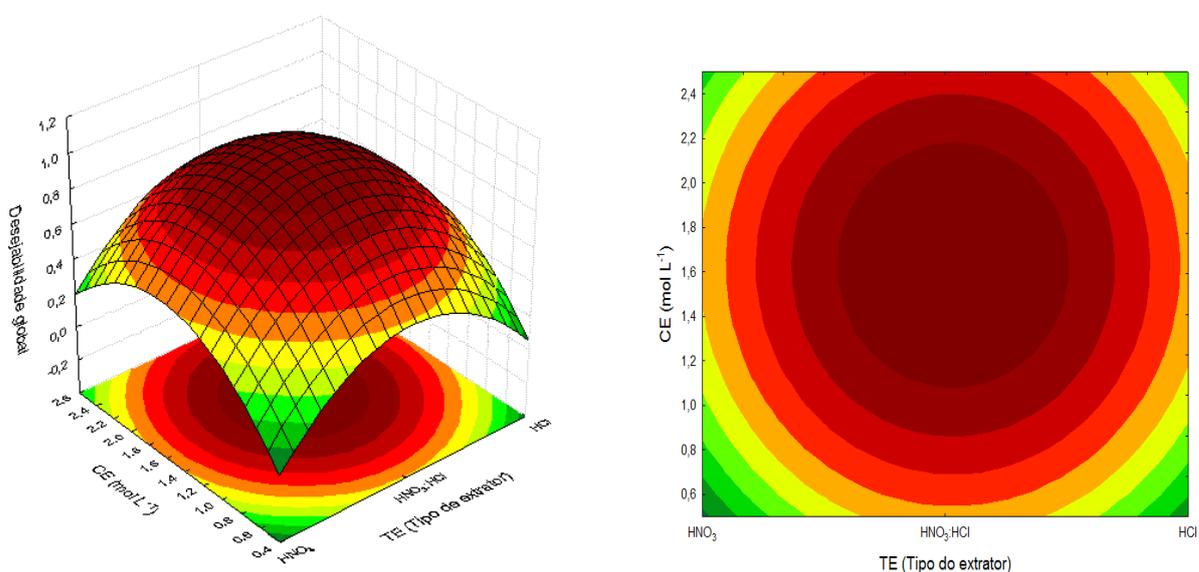


Figura 14. Superfície de resposta (a) e gráfico de contorno (b), para tipo de extrator e concentração do extrator usando a DG para o modelo proposto.

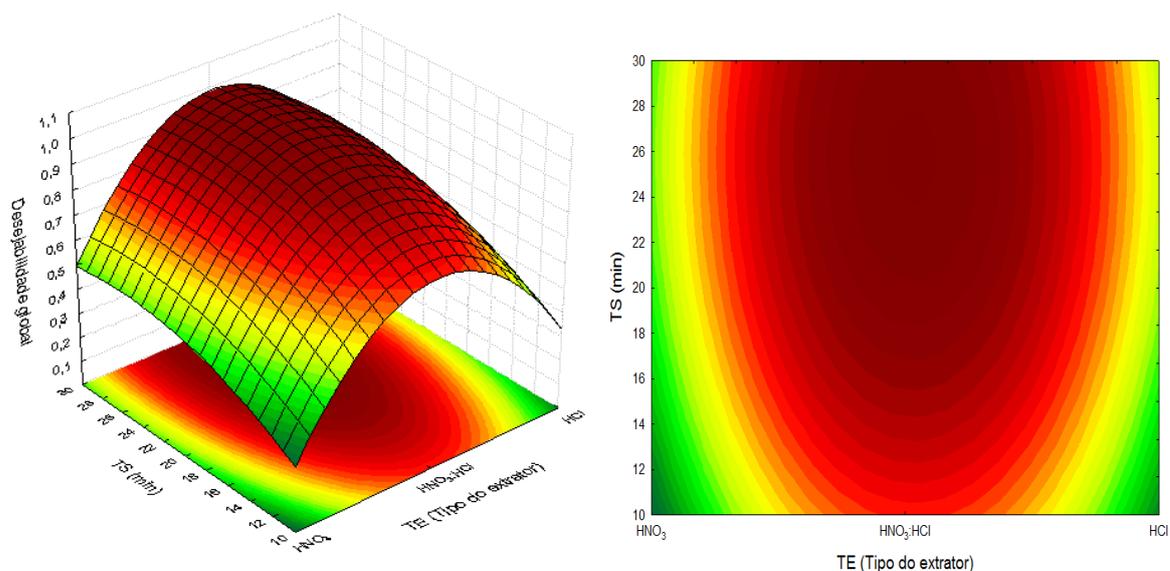


Figura 15. Superfície de resposta (a) e gráfico de contorno (b), para tipo de extrator e tempo de sonicação usando a DG para o modelo proposto.

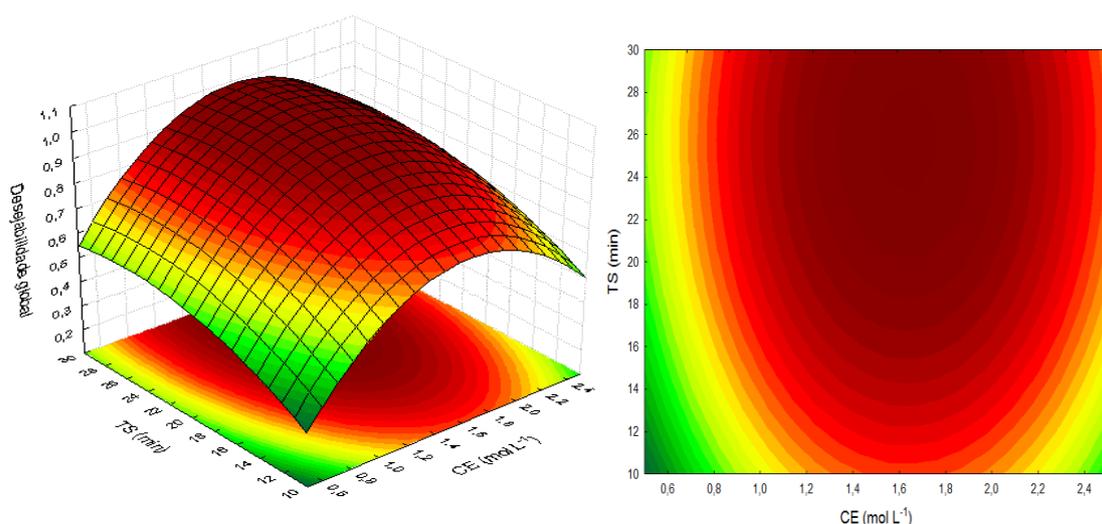


Figura 16. Superfície de resposta (a) e gráfico de contorno (b), para concentração do extrator e tempo de sonicação usando a DG para o modelo proposto.

Também foi gerado um modelo matemático que relaciona os fatores envolvidos na otimização (TE, CE e TS) com, a DG, que está representado abaixo pela equação 10, sendo que todos os termos significativos estão destacados em vermelho.

Equação. 10

$$DG = 0,7674 + 0,0053 (TE) + 0,1767 (TE)^2 + 0,0371 (CE) + 0,1323 (CE)^2 + 0,0388 (TS) + 0,0233 (TS)^2 + 0,0093 (TE)(CE) - 0,0111 (TE)(TS) - 0,0120 (CE)(TS)$$

Para obter os valores otimizados para cada variável foi aplicado à função desejabilidade. De acordo os perfis de DG (última linha de gráficos da Figura 17) como resposta, verificamos os valores recomendados para cada variável. As coordenadas dos pontos são as condições otimizadas que geram resposta mais elevada para o sistema estudado. Assim, os valores ótimos estabelecidos, foram: tipo de extrator HNO₃:HCl (1:1), concentração da solução extratora 1,7 mol L⁻¹ e tempo de sonicação de 26 min.

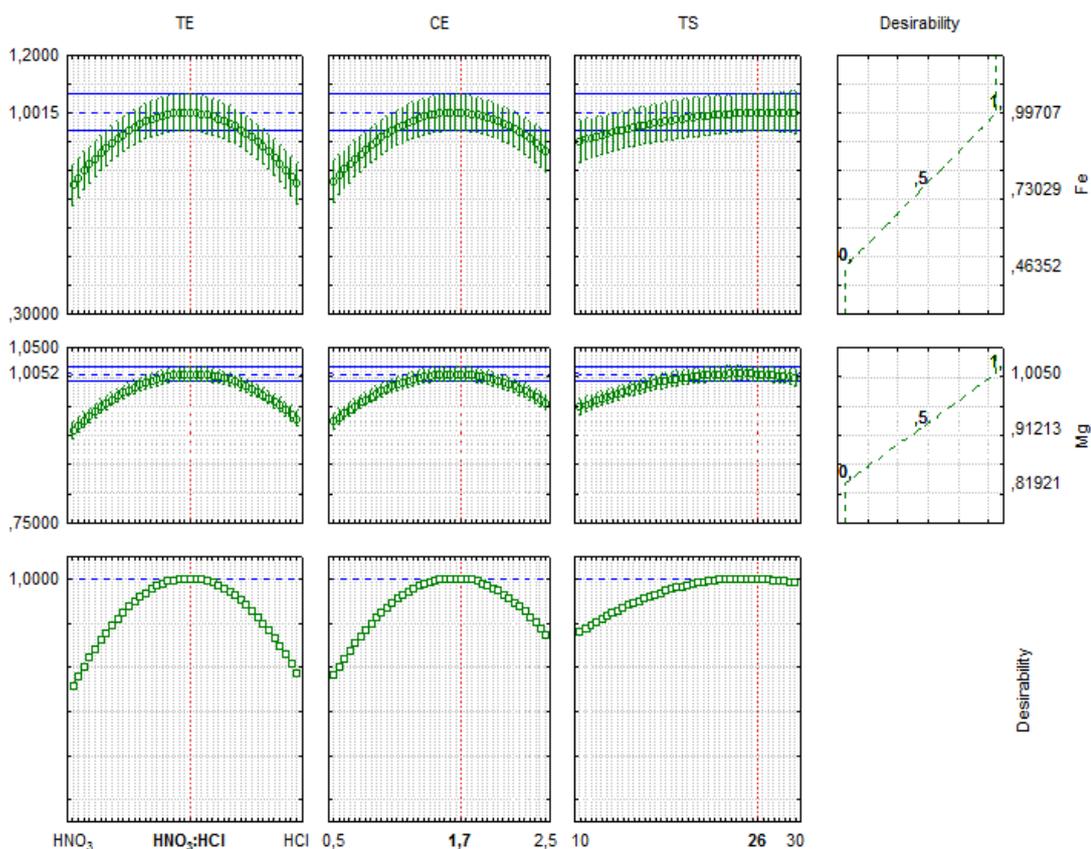


Figura 17. Perfis para valores preditos e desejabilidade individual e global na otimização das variáveis estudadas.

A mistura ácida composta de HNO₃:HCl (1:1) mostrou-se como a variável mais significativa no procedimento de suspensão, o que já tinha sido observado na análise visual da superfície de resposta. Em trabalho anterior Bezerra et al., [107] relata que quando utiliza mistura de soluções ácidas em procedimentos de amostragem de suspensão, há um ganho na resposta analítica, potencializando a extração do analito.

Para o estudo do tempo de sonicação, observa-se que um período relativamente alto foi obtido como condição favorável e isso deve estar associado às características das partículas de goma que formam grandes aglomerados, necessitando, então, de um maior tempo de sonicação para que ocorra a desagregação das partículas, favorecendo, também, a homogeneidade da suspensão por um maior período de tempo.

4.6 Validação do procedimento

4.6.1 Avaliação do efeito da matriz e escolha do método de calibração

Para avaliar o efeito de matriz e escolher o método de calibração para o procedimento, foram preparadas curvas de calibração externa com diluição dos padrões metálicos no meio extrator obtido durante a etapa de otimização. Também foram preparadas curvas de calibração com adição de analito em uma amostra de goma de mandioca, com diluição dos padrões metálicos antes da suspensão. O efeito da matriz pode ser avaliado observando-se os coeficientes angulares das curvas analíticas feitas em diferentes meios. As equações das curvas analíticas são apresentadas na Tabela 18.

Tabela 18. Curvas analíticas obtidas com diferentes métodos de calibração.

Analito	Método de calibração	Equação	R ²
Fe	Externa	$y = (0,1117 \pm 0,0102^*)C_{Fe} + (0,0017 \pm 0,0071)$	0,9997
	Adição de analito	$y = (0,1109 \pm 0,0098)C_{Fe} + (0,0284 \pm 0,0086)$	0,9999
Mg	Externa	$y = (0,0636 \pm 0,0045)C_{Mg} + (0,0020 \pm 0,0033)$	0,9999
	Adição de analito	$y = (0,0673 \pm 0,0052)C_{Mg} + (0,0546 \pm 0,0049)$	0,9996

Uma avaliação estatística aplicando o teste-t foi realizada para comparar as inclinações obtidas com as curvas analíticas externas e as curvas que usam a adição de analito e, os dois valores não apresentaram diferença significativa, a um nível de 95% de confiança, demonstrando, assim, que a matriz não interfere significativamente na determinação dos elementos e, qualquer um dos métodos de calibração pode ser utilizado na determinação dos analitos. Para simplificação no

procedimento proposto, é recomendada a determinação dos analitos utilizando a calibração externa [100].

4.6.2 Eficiência de extração

O processo de extração de Fe e Mg durante o procedimento de amostragem de suspensão e a quantificação do mesmo foi investigado em detalhes. A eficiência de extração (E_f) foi calculada como a razão entre as concentrações para o Fe e Mg obtidas para as suspensões (C_s) e as concentrações obtidas para o Fe e Mg no sobrenadante das suspensões, após centrifugação (C_c), sendo expressa em porcentagem (Equação 11).

$$E_f = \left(\frac{C_s}{C_c} \right) \times 100 \quad \text{Equação. 11}$$

Para tanto, uma amostra de goma de mandioca em triplicata foi submetida a procedimento geral proposto. Após o preparo da suspensão foi tomada uma alíquota de cada uma das triplicatas e a concentração média encontrada foi de 7,85 e 25,5 (mg kg^{-1}) para o Fe e Mg, respectivamente. O restante da suspensão foi centrifugada e então foi tomada uma alíquota do sobrenadante, e a concentração média encontrada foi de 7,61 e 26,2 (mg kg^{-1}) para o Fe e Mg, respectivamente. A eficiência de extração foi de 97% para o Fe e 103% para o Mg evidenciando que durante o preparo da suspensão o Fe e Mg presente nas amostras de goma de mandioca é quantitativamente extraído para a fase líquida da suspensão e que não há necessidade de centrifugação das amostras antes da leitura, visto que as concentrações sem e com centrifugação não apresentam valores com diferença significativa.

4.6.3 Limite de detecção e quantificação

O LOD e LOQ foram calculados de acordo as recomendações da IUPAC [137]. O procedimento proposto permitiu a determinação de Fe e Mg com LOD de 1,01 e 3,36 (mg kg^{-1}) e LOQ de 2,36 e 7,85 (mg kg^{-1}), respectivamente.

4.6.4 Precisão

A precisão do procedimento foi expressa em termos de RSD (%), apresentando valores de 5,8 e 4,1 %, calculado a partir de sete suspensões distintas de uma mesma amostra contendo 17,80 e 64,55 (mg kg⁻¹) de Fe e Mg, respectivamente.

4.6.5 Exatidão

A exatidão do procedimento foi avaliada mediante a análise do CRM de farinha de trigo (NIST 1567a) o qual possui valor certificado de 14,1 ± 0,5 (mg kg⁻¹) e 40 ± 2,0 (mg kg⁻¹) para o Fe e Mg, respectivamente. Aplicando o procedimento proposto foi encontrada uma concentração de 13,7 ± 0,3 (mg kg⁻¹) e 40,8 ± 1,5 (mg kg⁻¹) para o Fe e Mg, respectivamente. A avaliação estatística aplicando o teste-t mostrou não haver diferença significativa ao nível de 95% de confiança, entre o valor encontrado no procedimento e o valor certificado.

A exatidão também foi avaliada mediante o emprego de metodologia estabelecida usando decomposição total assistida por radiação micro-ondas e o procedimento proposto, os resultados obtidos são apresentados na Tabela 19. A avaliação estatística aplicando o teste-t pareado ao nível de confiança de 95% mostrou não haver diferença significativa entre os valores obtidos pelo procedimento de suspensão e aqueles obtidos após a decomposição total em forno micro-ondas.

Tabela 19. Concentrações em amostras reais determinadas pelo procedimento proposto e pela decomposição total em forno micro-ondas (média ± intervalo de confiança; n=3).

Amostra	Fe (mg kg ⁻¹)		Mg (mg kg ⁻¹)	
	Procedimento proposto	Decomposição em MW	Procedimento proposto	Decomposição em MW
1	17,8 ± 0,6	18,1 ± 0,3	64,5 ± 2,2	64,9 ± 2,1
2	13,9 ± 0,7	13,7 ± 0,5	46,9 ± 1,8	45,8 ± 1,2
3	20,1 ± 0,3	21,3 ± 0,4	51,3 ± 2,1	51,8 ± 1,5
4	7,85 ± 0,34	7,43 ± 0,26	25,5 ± 0,9	25,8 ± 1,0
5	8,64 ± 0,42	9,32 ± 0,37	23,7 ± 0,8	24,2 ± 0,5

4.7 Aplicação do procedimento proposto

O procedimento proposto foi aplicado para determinação de Fe e Mg em oito amostras de goma de mandioca adquiridas em diferentes cidades da região Sul da Bahia, Brasil. As amostras analisadas apresentaram concentrações de Fe e Mg que variaram entre 7,85 e 17,8 (mg kg^{-1}) e 23,7 e 64,5 (mg kg^{-1}), respectivamente. Os resultados para as amostras analisadas estão expressos na Tabela 20.

Tabela 20. Concentrações nas amostras reais determinadas pelo procedimento proposto (média \pm desvio padrão n=3).

Amostra	Concentração (mg kg^{-1})	
	Fe	Mg
Eunápolis	17,8 \pm 0,6	64,5 \pm 2,2
Teixeira de Freitas	13,9 \pm 0,7	46,9 \pm 1,8
Itabela	18,1 \pm 0,3	51,3 \pm 2,1
Mucuri	7,85 \pm 0,35	25,5 \pm 0,9
Nova Viçosa	8,64 \pm 0,42	23,7 \pm 0,8
Itamaraju	13,6 \pm 0,4	51,2 \pm 2,0
Medeiros Neto	11,9 \pm 0,2	36,4 \pm 1,1
Guaratinga	18,4 \pm 0,9	57,8 \pm 2,1

Na Tabela 21 é apresentado um comparativo entre os resultados obtidos neste trabalho com os dados da TACO [18]. Nela é possível observar que há uma concordância entre os resultados de ambos os estudos para o Mg, sendo um indicativo da coerência dos dados apresentados. Já para o Fe os valores encontrados nesse trabalho são muito superiores aos encontrados na TACO.

Também foi realizado um comparativo em relação à contribuição de Fe e Mg nas amostras analisadas baseando-se no índice de Ingestão Diária Recomendada (IDR), estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) [147]. De com IDR o consumo diário de Fe e Mg para crianças de 1-3 anos de idade são de (6 e 60 mg/dia), para crianças de 4-6 anos de idade são de (6 e 73 mg/dia), para crianças de 7-10 anos de idade são de (9 e 100 mg/dia) e para uma pessoa adulta acima de 70 kg são de (14 e 240 mg/dia). Considerando uma porção de 100 g de

cada amostra analisada nesse trabalho o % IDR para cada amostra foi calculado e os resultados estão expressos na Tabela 22.

Tabela 21. Comparação das concentrações de Fe e Mg (expressos em mg/100g) nas amostras reais e com os valores da TACO.

Amostra	Concentração (mg/100g)	
	Fe	Mg
Eunápolis	1,78	6,45
Teixeira de Freitas	1,39	4,69
Itabela	1,81	5,13
Mucuri	0,78	2,55
Nova Viçosa	0,86	2,37
Itamaraju	1,36	5,12
Medeiros Neto	1,19	3,64
Guaratinga	1,84	5,78
Média encontrada	1,38	4,47
Valor da TACO	0,10	3,00

Tabela 22. Contribuição das amostras de goma com o IDR estabelecido pela ANVISA para crianças e pessoas adultas.

Amostras	Fe % IDR				Mg % IDR			
	^a C 1-3	^b C 4-6	^c C 7-10	^d PA	C 1-3	C 4-6	C 7-10	PA
Media	23	23	20	10	7	6	4	2

a) Crianças de 1-3 anos; b) criança de 4-6 anos; c) criança de 7-10 anos; d) pessoa adulta.

4.8 Conclusões

A aplicação da amostragem de suspensão como procedimento alternativo para a preparação de amostras levou ao desenvolvimento de procedimento analítico simples, rápido e confiável para a análise de goma de mandioca. A utilização do

planejamento Box-Behnken, mostrou-se eficiente na otimização das variáveis que influenciam o procedimento de amostragem de suspensão.

A utilização de uma solução composta pela mistura ácida relativamente diluída para o preparo das suspensões tornou o procedimento menos dispendioso, reduzindo o consumo de reagentes e oferecendo menor risco ao operador. O emprego de banho ultrassônico permitiu que o preparo das suspensões fosse realizado com a amostra dentro do próprio balão volumétrico, minimizando riscos de contaminação e perdas de analito.

O procedimento proposto apresentou uma boa exatidão evidenciada pela decomposição total em forno micro-ondas, e a avaliação estatística aplicando o teste-t pareado não apresentou diferença significativa a um nível de 95% de confiança. Precisão expressa como RSD (%) sempre inferior a 10 %. Somado a isso, foram alcançados baixos LOD e LOQ, e efeito de matriz não significativo demonstrando, assim, que a mesma não interfere na determinação dos elementos e a calibração pode ser realizada de forma convencional ou com adição de analito. Estes resultados indicam a viabilidade de aplicação deste procedimento na determinação de Fe e Mg, em amostras de goma de mandioca.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Desenvolver um procedimento de digestão em bloco usando dedo frio ou micro-ondas em sistemas fechado com ácidos diluídos para o preparo de amostras de farinha de mandioca e tapioca seguida por determinação de elementos nutrientes por ICP OES ou MIP OES
- Utilizar metodologias de análise multivariada para avaliar a composição mineral de farinha de mandioca produzidas e comercializadas no Estado da Bahia.
- Elaboração de um boletim informativo sobre o teor de elementos nutrientes em farinha de mandioca para divulgação e melhor esclarecimento das comunidades que trabalham com este produto bem como a população em geral.

REFERÊNCIAS

-
- [1] Rogers, D.; Appan, C. Manihot, Manihotoides, Euphorbiaceae. Flora Neotropica. Hafner Press, New York, NY. 1973.
- [2] MANDIOCA. Agriannual 2008: Anuário da Agricultura Brasileira, São Paulo: Instituto FNP, 2008, p. 371-375.
- [3] Nassar, N.M.A. Wild Manihot species of central Brazil for cassava breeding, Canadian Journal of Plant Science, 58 (1978) 257-261.
- [4] Nassar, N. M. A. Conservation of the genetic resources of cassava (*Manihot esculenta*). Determination of wild species localities with emphasis on probable origin, Economic Botany, 32 (1978) 311-320.
- [5] Nassar, N.M.A.; Sousa, M.V. Amino acids profile in cassava and its interspecific hybrid progeny, Genetic Molecular Research, 6 (2007) 292-297.
- [6] Borges, M.F.; Fukuda, W.M.G.; Rossetti, A.G. Avaliação de cultivares de mandioca para consumo humano, Pesquisa Agropecuária Brasileira, 37 (2002) 1559-1565.
- [7] Mendonça, H.A.; Moura, G.M.; Cunha, E.T. Avaliação de genótipos de mandioca em diferentes épocas de colheita no Estado do Acre, Pesquisa Agropecuária Brasileira, 38 (2003) 761-769.
- [8] Hendershott, C.H. A Literature Review and Research Recommendations on Cassava (*Manihot esculenta*, Crantz), Athens (1973) University George.
- [9] Embrapa, mandioca e fruticultura. Cruz das Almas: Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura, 2012. Disponível em: <http://www.cnpmf.embrapa.br/index.php?p=pesquisaculturas_pesquisadasma ndioca. phpmenu=2>. Acesso em: 27 jun. 2015.
- [10] Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (2013). Disponível em<http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/camaras_setoriais/Mandioca/30RO/app_conjuntura_mandioca.pdf> Acesso em: 05 de jun. 2014.
- [11] Oliveira, A.M.G.; de Oliveira, J.L.; Cardoso, C.E.L.; Diniz, M.S.; Sena, G.C.; Jesus, G.S.; Pereira, N.L.; Christo, K.; Couto Filho, J.G. Inserção e competitividade do agricultor familiar do extremo Sul da Bahia no agronegócio da mandioca: projetos em ação. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA

-
- MANDIOCA, 12., 2007, Paranaíba, PR. Mandioca: bioenergia, alimento e renda. Botucatu: CERAT- UNESP, 2007.
- [12] Ferreira, G.D.G.; Oliveira, R.L.; Cardoso, E.C.; Magalhães, A.L.R.; Brito, E.L. Valor Nutritivo de Co-produtos da Mandioca, *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, 8 (2007) 364-374.
- [13] Dada, O.A.; Oworu, O.O. Mineral and nutrient leaf composition of two cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cultivars defoliated at varying phenological phases, *Natural Sciences - Biology*, 4 (2010) 44-48.
- [14] Nkwocha, E.E.; Pat-Mbano, E.C.; Tony-Njoku, N.F. Assessment of heavy metal concentration in food crops grown around etelebou oil flow station in Bayelsa State, Nigeria. *International Journal of Science & Nature*, 2 (2011) 665-670.
- [15] Emurotu, J.E.; Salehdeen, U.M.; Ayeni, O.M. Assessment of heavy metals level in cassava flour sold in Anyigba Market Kogi State, Nigeria, *Advances in Applied Science Research*, 3 (2012) 2544-2548.
- [16] Burns, A.E.; Gleadow, R.M.; Zacarias, A.M.; Cuambe, C.E.; Miller, R.E.; Cavagnaro, T.R. Variations in the chemical composition of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) leaves and roots as affected by genotypic and environmental variation, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60 (2012) 4946-4956.
- [17] Mbong, E.O.; Ogbemudia, F.O.; Umoren, U.B. Evaluation of concentration of heavy metals in leaf tissues of three improved varieties of *Manihot esculenta* Crantz, *Journal of Environmental Research and Management*, 4 (2013) 214-128.
- [18] Tabela brasileira de composição de alimentos / NEPA – UNICAMP. 4. ed. rev. e ampl.- Campinas: NEPA-UNICAMP, p. 161, 2011.
- [19] Mezette, T.F.; Carvalho, C.R.L.; Morgano, M.A.; Silva, M.G.; Parra, E.S.B.; Galera, J.M.S.V.; Valle, T.L. Seleção de clones-elite de mandioca de mesa visando a características agronômicas, tecnológicas e químicas, *Bragantia*, 68 (2009) 601-609.
- [20] Ceni, G.C.; Colet, R.; Peruzzolo, M.; Witschinski, F.; Tomicki, L.; Barriquello, A.L.; Valduga, E. Avaliação de componentes nutricionais de Cultivares de

-
- mandioca (*Manihot Esculenta* Crantz), Alimentos e Nutrição Araraquara, 20 (2009) 107-111.
- [21] Valduga, E.; Tomicki, L.; Witschinski, F.; Colet, R.; Peruzzolo, M.; Ceni, G.C. Avaliação da aceitabilidade e dos componentes minerais de diferentes cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) após a cocção, Alimentos e Nutrição, 22 (2009) 205-210.
- [22] Costa, E.M. Estratégias para caracterização da farinha de mandioca produzida no estado da Bahia. Tese de doutorado, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, 2012.
- [23] Correia, F.O. Otimização de métodos analíticos para determinação de elementos essenciais e não essenciais em farinha de mandioca, trigo e milho consumida na cidade de Aracaju/SE. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, 2014.
- [24] Welz, B.; Sperling, M. Atomic Absorption Spectrometry, third ed., Wiley- VCH, Weinheim, New York, 1999.
- [25] Skoog, D.A.; Holler, F.J.; Nieman, T.A. Principles of Instrumental Analysis, Sanders College Publishing, Philadelphia, 1998.
- [26] Bezerra, M.A.; Lemos, V.A.; Garcia, J.S.; Silva, D.G.; Araújo, A.S.; Arruda, M.A.Z. Thermospray generation directly into a flame furnace - An alternative to improve the detection power in atomic absorption spectrometry, Talanta, 82 (2010) 437-443.
- [27] Welz, B.; Vale, M.G.R.; Pereira, E.R.; Castilho, I.N.B.; Dessuy, M.B. Continuum Source Atomic Absorption Spectrometry: Past, Present and Future Aspects - A Critical Review, Journal of the Brazilian Chemical Society, 25 (2015) 799-821.
- [28] Resano, M.; Aramendia, M.; Belarra, M.A. High-resolution continuum source grafite furnace atomic absorption spectrometry for direct analysis of solid samples and complex materials: a tutorial review, Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 29 (2014) 2229-2250.
- [29] Bings, N.H.; Niessen, J.O.O.V.; Schaper, J.N. Liquid sample introduction in inductively coupled plasma atomic emission and mass spectrometry - Critical review, Spectrochimica Acta Part B ,100 (2014) 14-37.

-
- [30] Kratochvil, B. Sampling and sample preservation for trace element analysis, *in*: Z. Mester, R. Sturgeon (Eds.) *Sample Preparation for Trace Element Analysis*, Elsevier, Amsterdam, 2003, pp. 1-21.
- [31] Oliveira, E. Sample Preparation for Atomic Spectroscopy: Evolution and Future Trends. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 14 (2003) 174-182.
- [32] Krug, F.J. Métodos de preparo de amostras: fundamentos sobre o preparo de amostras orgânicas e inorgânicas: VI Workshop sobre preparo de amostras, 6^a edição, Santa Maria, 2008, 282 p.
- [33] Korn, M.G.A.; Morte, E.S.B.; Santos, D.C.M.B.; Castro, J.T.; Barbosa, J.T.P.; Teixeira, A.P.; Fernandes, A.P.; Welz, B.; Santos, W.P.C.; Santos, E.B.G. N.; Korn, M., Sample preparation for the determination of metals in food samples using spectroanalytical methods - A review. *Applied Spectroscopy Reviews*, 43 (2008) 67-92.
- [34] Ferreira, S.L.C.; Silva, L.O.B.; Santana, F.A.; Junior, M.M.S.; Matos, G.D.; Santos, W.N.L. A review of reflux systems using cold finger for sample preparation in the determination of volatile elements, *Microchemical Journal*, 106 (2013) 307-310.
- [35] Florian, D.; Knapp, G. High-temperature, microwave-assisted UV digestion: A promising sample preparation technique for trace element analysis, *Analytical Chemistry*, 73 (2001) 1515-1520.
- [36] Capote, F.P.; Luque, C.M.D. Ultrasound in analytical chemistry, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387 (2007) 249-257.
- [37] Strenger, S.; Hirner, A.V. Digestion of organic components in waste materials by high pressure ashing with infrared heating, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 371 (2001) 831-837.
- [38] Maichin, B.; Zischka, M.; Knapp, G. Pressurized wet digestion in open vessels, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 376 (2003) 715-720.
- [39] Mermet, J.M. Focused-microwave-assisted reactions: atmospheric-pressure acid digestion, on-line pretreatment and acid digestion, volatile species production, and extraction, *in*: H. M. Kingston, S. J. Haswell (Eds). *Microwave-enhanced chemistry: fundamentals, sample preparation, and applications*, American Chemical Society, Washington, DC, 1997, pp. 371-400.

-
- [40] Flores, E.M.M.; Krug, F.J.; Barin, J.S.; Arruda, M.A.Z. Decomposição de materiais orgânicos por via úmida, *in*: F.J. Krug (Ed.) Métodos de preparo de amostras: fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar, Seção Técnica de Biblioteca-CENA/USP, Piracicaba, 2010, pp. 252-275.
- [41] Matusiewicz, H. Wet digestion methods, *in*: Z. Mester, R. Sturgeon (Eds.) Sample Preparation for Trace Element Analysis, Elsevier, Amsterdam, 2003, pp. 193-233.
- [42] Jackwerth, E.; Würfels, M. Pressure digestion: apparatus, problems and applications, *in*: M. Stoepler (Ed.) Sampling and sample preparation: a practical guide for analytical chemists, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, 1997, pp. 142-154.
- [43] Neas, E.D.; Collins, M.J. Microwave heating: theoretical concepts and equipment design, *in*: H.M. Kingston.; L.B. Jassie (Eds.) Introduction to microwave sample preparation: theory and practice, American Chemical Society, Washington, 1988, pp.7-32.
- [44] Zlotorzynski, A. The Application of Microwave Radiation to Analytical and Environmental Chemistry, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 25 (1995) 43-76.
- [45] Richter, R.C.; Link, D.; Kingston, H.M.S. Peer Reviewed: Microwave-Enhanced Chemistry, *Analytical Chemistry*, 73 (2001) 30-37.
- [46] Smith, F.E.; Arsenault, E.A. Microwave-assisted sample preparation in analytical chemistry, *Talanta*, 43 (1996) 1207-1268.
- [47] Knapp, G.; Panholzer, F.; Schalk, A.; Kettisch, P. Pressure-controlled microwave assisted wet digestion systems, *in*: H. M. Kingston, S. J. Haswell (Eds.) Microwave enhanced chemistry: fundamentals, sample preparation, and applications, American Chemical Society, Washington, 1997, pp. 423-451.
- [48] Trevizan, L.C.; Donati, G.L.; Nogueira, A.R.A.; Nóbrega, J.A. Microwave-assisted procedures for sample preparation: recent developments, *in*: M.A.Z. Arruda (Ed.) Trends in sample preparation, Nova Science Publishers, New York, 2007, pp. 29-52.

-
- [49] Bendicho, C.; Pena-Pereira, F.; Romero, V. Green chemistry in analytical atomic spectrometry: a review, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 27 (2012) 1831-1857.
- [50] Koel, M.; Kaljurand, M.; Application of the principles of green chemistry in analytical chemistry, *Pure and Applied Chemistry*, 78 (2006) 1993-2002.
- [51] Rocha, D.L.; Batista, A.D.; Rocha, F.R.P.; Donati, G.L.; Nóbrega, J.A. Greening sample preparation in inorganic analysis, *Trends in Analytical Chemistry*, 45 (2013) 79-92.
- [52] Bizzi, C.A.; Flores, E.M.M.; Barin, J.S.; Garcia, E.E.; Nóbrega, J.A. Understanding the process of microwave-assisted digestion combining diluted nitric acid and oxygen as auxiliary reagent, *Microchemical Journal*, 99 (2011) 193-196.
- [53] Cotton, F.A.; Wilkinson, G.; Murillo, C.A.; Bochmann, M. *Advanced Inorganic Chemistry*, 6 ed., John Wiley & Sons, 1999, 1356 p.
- [54] Araujo, G.C.L.; Gonzalez, M.H.; Ferreira, A.G.; Nogueira, A.R.A.; Nobrega, J.A. Effect of acid concentration on closed-vessel microwave-assisted digestion of plant materials, *Spectrochimica Acta Part B*, 57 (2002) 2121-2132.
- [55] Castro, J.T.; Santos, E.C.; Santos, W.P.C.; Costa, L.M.; Korn, M.; Nobrega, J. A.; Korn, M.G.A. A critical evaluation of digestion procedures for coffee samples using diluted nitric acid in closed vessels for inductively coupled plasma optical emission spectrometry, *Talanta*, 78 (2009) 1378-1382.
- [56] Gonzalez, M.H.; Souza, G.B.; Oliveira, R.V.; Forato, L.A.; Nobrega, J.A.; Nogueira, A.R.A. Microwave-assisted digestion procedures for biological samples with diluted nitric acid: Identification of reaction products, *Talanta*, 79 (2009) 396-401.
- [57] Eça, G.F.; Brito, G.B.; Barbosa, I.S.; Korn, M.G.A.; Hatje, V. Microwave-assisted acid Digestion Procedure for Trace Elements Determination in Polychaete *Chaetopterus variopedatus*, *Revista Virtual de Quimica*, 6 (2014) 1047-1061.
- [58] Mesko, M.F.; Picoloto, R.S.; Ferreira, L.R.; Costa, V.C.; Pereira, C.M.P.; Colepicolo, C.; Muller, E.I.; Flores, E.M.M. Ultraviolet radiation combined with microwave assisted wet digestion of Antarctic seaweeds for further

-
- determination of toxic elements by ICP-MS, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 30 (2015) 260-266.
- [59] Calvo, F.B.; Junior, D.S.; Rodrigues, C.J.; Krug, F.J.; Marumo, J.T.; Schor, N.; Bellini, M.H. Variation in the Distribution of Trace Elements in Renal Cell Carcinoma, *Biological Trace Element Research*, 130 (2009) 107-113.
- [60] Menezes, E.A.; Carapelli, A.; Bianchi, R.S.; Souza, S.N.P.; Matos, W.O.; Filho, E.R.P. Evaluation of the mineral profile of textile materials using inductively coupled plasma optical emission spectrometry and chemometrics, *Journal of Hazardous Materials*, 182 (2010) 325-330.
- [61] Bizzi, C.A.; Flores, E.M.M.; Picoloto, R.S.; Barin, J.S.; Nóbrega, J.A. Microwave-assisted digestion in closed vessels: effect of pressurization with oxygen on digestion process with diluted nitric acid, *Analytical Methods*, 2 (2010) 734-738.
- [62] Bizzi, C.A.; Barin, J.S.; Muller, E.I.; Schmidt, I.; Nóbrega, J.A.; Flores, E.M.M. Evaluation of oxygen pressurized microwave-assisted digestion of botanical materials using diluted nitric acid, *Talanta*, 83 (2011) 1324-1328.
- [63] Bizzi, C.A.; Barin, J.S.; Garcia, E.E.; Nóbrega, J.A.; Dressler, V.L.; Flores, E.M.M. Improvement of microwave-assisted digestion of milk powder with diluted nitric acid using oxygen as auxiliary reagent, *Spectrochimica Acta Part B*, 66 (2011) 394-398.
- [64] Souza, S.N.P.; Nascentes, C.C.; Costa, L.M. Validation of a microwave-assisted digestion procedure of p \hat{a} te samples using diluted HNO₃ for Fe and Zn determination by FS FAAS, *Analytical Methods*, 5 (2013) 6411-6415.
- [65] Costa, S.S.L.; Pereira, A.C.L.; Passos, E.A.; Alves, J.P.H.; Garcia, C.A.B.; Araujo, R.G.O. Multivariate optimization of an analytical method for the analysis of dog and cat foods by ICP OES, *Talanta*, 108 (2013) 157-164.
- [66] Santos, W.C.P.; Santos, D.C.M.B.; Fernandes, A.P.; Castro, J.T.; Korn, M.G.A. Geographical characterization of beans based on trace elements after microwave-assisted digestion using diluted nitric acid, *Food Analytical Methods*, 6 (2013) 1133-1143.
- [67] Bressy, F.C.; Brito, G.B.; Barbosa, I.S.; Teixeira, L.S.G.; Korn, M.G.A. Determination of trace element concentrations in tomato samples at different

-
- stages of maturation by ICP OES and ICP-MS following microwave-assisted digestion, *Microchemical Journal*, 109 (2013) 145-149.
- [68] Bizzi, C.A.; Nóbrega, J.A.; Barin, J.S.; Oliveira, J.S.S.; Shimidt, 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 O₂ pressure, *Analytica Chimica Acta*, 837 (2014) 16-22.
- [69] Bizzi, C.A.; Flores, E.L.M.; Nóbrega, J.A.; Oliveira, J.S.S.; Shimidt, L.; Mortari, S.R. Evaluation of a digestion procedure based on the use of diluted nitric acid solutions and H₂O₂ for the multielement determination of whole milk powder and bovine liver by ICP-based techniques, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 29 (2014) 332-338.
- [70] Batista, E.F.; Augusto, A.S.; Filho, E.R.P. Determination of Cd, Co, Cr, Cu, Ni and Pb in cosmetic samples using a simple method for sample preparation, *Analytical Methods*, 7 (2014) 329-335.
- [71] Leme, A.B.P.; Bianchi, S.R.; Carneiro, R.L.; Nogueira, A.R.A. Optimization of Sample Preparation in the Determination of Minerals and Trace Elements in Honey by ICP-MS, *Food Analytical Methods*, 7 (2014) 1009-1015.
- [72] Mesko, M.F.; Picoloto, R.S.; Ferreira, L.R.; Costa, V.C.; Pereira, C.M.P.; Colepicolo, P.; Muller, E.I.; Flores, E.M.M. Ultraviolet radiation combined with microwave assisted wet digestion of Antarctic seaweeds for further determination of toxic elements by ICP-MS, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 30 (2014) 260-266.
- [73] 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*, 175 (2015) 212-217.
- [74] Mason, T.J.; Lorimer, J.P. *Applied sonochemistry: Uses of Power Ultrasound in Chemistry and Processing*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2002, 303 pp.
- [75] Junior, D.S.; Krug, F.J.; de Godoi, M. Currents on ultrasound-assisted extraction for sample preparation and spectroscopic analytes determination, *Applied Spectroscopy Reviews*, 41 (2006) 305-321.
- [76] Pingret, D.; Tixier, A.S.F.; Chemat, F. Degradation during application of ultrasound in food processing: A review, *Food Control*, 31 (2013) 593-606.

-
- [77] Rooze, J.; Rebrov, E.V.; Schouten, J.C.; Keurentjes, J.T.F. Dissolved gas and ultrasonic cavitation - A review, *Ultrasonics Sonochemistry*, 20 (2013) 1-11.
- [78] Korn, M.; Andrade, M.V.A.; Borges, S.S; Sousa, C.S.; Oliveira, F.S. Reagent generation assisted by ultrasonic irradiation, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 14 (2008) 254-258.
- [79] Picó, Y. Ultrasound-assisted extraction for food and environmental samples, *Trends in Analytical Chemistry*, 43 (2013) 84-99.
- [80] Nascentes, C.C.; Korn, M.; Arruda, M.A.Z. A fast ultrasound-assisted extraction of Ca, Mg, Mn and Zn from vegetables, *Microchemical Journal*, 69 (2001) 37-43.
- [81] Manutsewee, N.; Aeungmaitrepirom, W.; Varanusupakul, P.; Imyim, A. Determination of Cd, Cu, and Zn in fish and mussel by AAS after ultrasound-assisted acid leaching extraction, *Food Chemistry*, 101 (2007) 817-824.
- [82] Santos, W.P.C.; Castro, J.T.; Bezerra, M.A.; Fernandes, A.P.; Ferreira, S.L.C.; Korn, M.G.A. Application of multivariate optimization in the development of an ultrasound-assisted extraction procedure for multielemental determination in bean seeds samples using ICP OES, *Microchemical Journal*, 91 (2009) 153-158.
- [83] Neves, R.C.F.; Moraes, P.M.; Saleh, M.A.D.; Vanessa, R.L.; Fábio, A.S.; Margarida, M.B.; Padilha, C.C.F.; Sônia, M.A.J.; Padilha, P.M. FAAS determination of metal nutrients in fish feed after ultrasound extraction, *Food Chemistry*, 113 (2009) 679-683.
- [84] Barros, J.M.; Bezerra, M.A.; Valasques, G.S.; Júnior, B.B.N.J.; Souza, A.S.; Aragão, N.M. Multivariate optimization of an ultrasound-assisted extraction procedure for Cu, Mn, Ni and Zn determination in ration to chickens, *Anais da Acadêmica Brasileira de Ciências*, 85 (2013) 891-902.
- [85] Santos, L.C.M.B.; Carvalho, L.S.B.; Lima, D.C.; Leão, D.J.; Teixeira, L.S.G.; Korn M.G.A. Determination of micronutrient minerals in coconut milk by ICP OES after ultrasound-assisted extraction procedure, *Journal of Food Composition and Analysis*, 34 (2014) 75-80.
- [86] Trindade, A.S.N.; Dantas, A.F.; Lima, D.C.; Ferreira, S.L.C.; Teixeira, L.S.G. Multivariate optimization of ultrasound-assisted extraction for determination of

-
- Cu, Fe, Ni and Zn in vegetable oils by high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry, *Food Chemistry*, 185 (2015) 145-150.
- [87] Arruda, S.C.C.; Rodriguez, A.P.M.; Arruda, M.A.Z. Ultrasound-assisted Extraction of Ca, K and Mg from In Vitro Citrus Culture, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 3 (2003) 470-474.
- [88] Aleixo, P.C.; Júnior, D.S.; Tomazelli, A.C.; Rufini, I.A.; Berndt, H.; Krug, J.F. Cadmium and lead determination in foods by beam injection flame furnace atomic absorption spectrometry after ultrasound-assisted sample preparation, *Analytica Chimica Acta*, 512 (2004) 329-337.
- [89] Lavilla, S.; Vilas, Pilar.; Bendicho, C. Fast determination of arsenic, selenium, nickel and vanadium in fish and shellfish by electrothermal atomic absorption spectrometry following ultrasound-assisted extraction, *Food Chemistry*, 106 (2008) 403-409.
- [90] Batista, B.L.; Rodrigues, J.L.; Souza, V.C.O.; Junior, F.B. A fast ultrasound-assisted extraction procedure for trace elements determination in hair samples by ICP-MS for forensic analysis, *Forensic Science International*, 192 (2009) 88-93.
- [91] Santos, W.P.C.; Hatje, V.; Santil, D.S.; Fernandes, A.P.; Korn, M.G.A.; Souza, M.M. Optimization of a centrifugation and ultrasound-assisted procedure for the determination of trace and major elements in marine invertebrates by ICP OES, *Microchemical Journal*, 95 (2010) 169-173.
- [92] Padilha, C.C.F.; Moraes, P.M.; Garcia, L.A.; Pozzi, C.M.C.; Lima, G.P.P.; Valente, J.P.S.; Jorge, S.M.A.; Padilha, P.M. Evaluation of Cu, Mn, and Se in Vegetables Using Ultrasonic Extraction and GFAAS Quantification, *Food Analytical Methods*, 4 (2011) 319-325.
- [93] Lavilla, I.; Costas, M.; Gil, S.; Corderi, S.; Sanchez, G.; Bendicho, C. Simplified and miniaturized procedure based on ultrasound-assisted cytosol preparation for the determination of Cd and Cu bound to metallothioneins in mussel tissue by ICP-MS, *Talanta*, 93 (2012) 111-116.
- [94] Saleh, M.A.D.; Berto, D.A.; Padilha, P.M. Ultrasound-assisted extraction of Na and K from swine feed and its application in a digestibility assay: A green analytical procedure, *Ultrasonics Sonochemistry*, 20 (2013) 1353-1358.

-
- [95] Frena, M.; Quadros, D.P.C.; Castilho, I.N.B.; Gois, J.S.; Borges, D.L.G.; Welz, B.; Madureira, L.A.S. A novel extraction-based procedure for the determination of trace elements in estuarine sediment samples by ICP-MS, *Microchemical Journal*, 117 (2014) 1-6.
- [96] Almeida, T.S.; Andrade, R.M.; Gois, J.S.; Borges, D.L.G. Development of a simple and fast ultrasound-assisted extraction method for trace element determination in tobacco samples using ICP-MS, *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 98 (2014) 756-764.
- [97] Madeja, A.S.; Welna, M.; Pohl, P. Simple and Fast Sample Preparation Procedure Prior to Multi-element Analysis of Slim Teas by ICP OES, *Food Analytical Methods*, 7 (2014) 2051-2063.
- [98] Villa, J.E.L.; Pereira, C.D.; Cadore, S. A novel, rapid and simple acid extraction for multielemental determination in chocolate bars, *Microchemical Journal*, 121 (2015) 199-204.
- [99] Lima, A.F.; Costa, M.D.; Ferreira, D.C.; Richter, E.M.; Munoz, R.A.A. Fast ultrasound-assisted treatment of inorganic fertilizers for Mercury determination by atomic absorption spectrometry and microwave-induced plasma spectrometry with the aid of the cold-vapor technique, *Microchemical Journal*, 118 (2015) 40-44.
- [100] Ferreira, S.L.C.; Miro, M.; Silva, E.G.P.; Matos, G.D.; Reis, P.S.; Brandão, G.C.; Santos, W.N.L.; Duarte, A.T.; Vale, M.G.R.; Araujo, R.G.O. Slurry Sampling - An Analytical Strategy for the Determination of Metals and Metalloids by Spectroanalytical Techniques, *Applied Spectroscopy Reviews*, 45 (2010) 1-19.
- [101] Brady, D.V.; Montalvo, J.G.; Jung, J.; Curran, R.A. Direct determination of lead in plant leaves via graphite furnace atomic absorption, *Atomic Absorption Newsletter*, 13 (1974) 118-119.
- [102] Costa, A.C.S.; Krug, F.J.; Oliveira, E.; Nobrega, J.A.; Matias, T.B. Métodos de dissolução em ácidos e de fusão, *in*: F. J. Krug (Ed.) Métodos de preparo de amostras: fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar, Seção Técnica de Biblioteca-CENA/USP, Piracicaba, 2010, pp.141-168.

-
- [103] Magalhães, C.E.; Arruda, M.A.Z. Amostragem de suspensão: emprego da técnica na análise direta de amostras, *Química Nova*, 21 (1998) 459-466.
- [104] Vale, M.G.R.; Oleszczuk, N.; Santos, W.N.L. Current status of direct solid sampling for electrothermal atomic absorption spectrometry - A critical review of the development between 1995 and 2005, *Applied Spectroscopy Reviews*, 41 (2006) 377- 400.
- [105] Cal-Prieto, M.J.; Felipe-Sotelo, M.; Carlosena, A.; Andrade, J. M.; Lopez-Mahia, P.; Muniategui, S.; Prada, D. Slurry sampling for direct analysis of solid materials by electrothermal atomic absorption spectrometry (ETAAS). A literature review from 1990 to 2000, *Talanta*, 56 (2002) 1-51.
- [106] Torres, D.P.; Vieira, M.A.; Ribeiro, A.S.; Curtius, A.J. Slurry sampling for Arsenic determination in sediments by hydride generation atomic absorption spectrometry, *Journal of Brazilian Chemical Society*, 18 (2007) 728-732.
- [107] Bezerra, M.A.; Castro, J.T.; Macedo, R.S.; Silva, D.G. Use of constrained mixture design for optimization of method for determination of zinc and manganese in tea leaves employing slurry sampling, *Analytica Chimica Acta*, 670 (2010) 33-38.
- [108] Schneider, G.; Krivan, V. Slurry and liquid sampling using electrothermal atomic absorption spectrometry for the analysis of zirconium dioxide based materials, *Spectrochimica Acta Part B*, 50 (1995) 1557-1571.
- [109] Friese, K.; Krivan, V. Analysis of silicon nitride powders for Al, Cr Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, and Zn by slurry sampling electrothermal atomic absorption spectrometry, *Analytical Chemistry*, 67 (1995) 354-359.
- [110] Tan, Y.X.; Marshall, W.D. Enzymic digestion-high-pressure homogenization prior to slurry introduction electrothermal atomic absorption spectrometry for the determination of selenium in plant and animal tissues, *Analyst*, 122 (1997) 13-18.
- [111] López-García, I.; Sánchez-Merlos, M.; Hernández-Córdoba, M. Determination of mercury in soils and sediments by graphite furnace atomic absorption spectrometry with slurry sampling, *Spectrochimica Acta Part B*, 52 (1997) 2085-2092.
- [112] Mierzwa, J.; Sun, Y.C.; Yang, M.H. Determination of chromium, manganese and vanadium in sediments and soils by modifier-free slurry sampling

-
- electrothermal atomic absorption spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B*, 53 (1998) 63-69.
- [113] Silva, E.G.P.; Santos, A.C.N.; Costa, A.C.S.; Fortunato, D.M.N.; José, N.M.; Korn, M.G.A.; Santos, W.N.L.; Ferreira, S.L.C. Determination of manganese and zinc in powdered chocolate samples by slurry sampling using sequential multi-element flame atomic absorption spectrometry, *Microchemical Journal*, 82 (2006) 159-162.
- [114] Araujo, R.G.O.; Dias, F.S.; Macedo, S.M.; Santos, W.N.L.; Ferreira, S.L.C. Method development for the determination of manganese in wheat flour by slurry sampling flame atomic absorption spectrometry, *Food Chemistry*, 101 (2007) 397-400.
- [115] Silva, E.G.P.; Hatje, V.; Santos, W.N.L.; Costa, L.M.; Nogueira, A.R.N.; Ferreira, S.L.C. Fast method for the determination of copper, manganese and iron in seafood samples, *Journal of Food Composition and Analysis*, 21 (2008) 259-263.
- [116] Cernohorský, T.; Krejc, V.A.; Pouzar, M.; Vavrus, V.A.L. Elemental analysis of flour-based ready-oven foods by slurry sampling inductively coupled plasma optical emission spectrometry, *Food Chemistry*, 106 (2008) 1246-1252.
- [117] Chen, F.Y.; Jiang, S.J. Slurry Sampling Flow Injection Chemical Vapor Generation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry for the Determination of As, Cd, and Hg in Cereals, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (2009) 6564-6569.
- [118] Brandão, G.C.; Jesus, R.M.; Silva, E.G.P.; Ferreira, S.L.C. Use of slurry sampling for the direct determination of zinc in yogurt by high resolution-continuum source flame atomic absorption spectrometry, *Talanta*, 81 (2010) 1357-1359.
- [119] Silva, L.O.B.; Silva, D.G.; Leão, D.J.; Matos, G.D.; Ferreira, S.L.C. Slurry Sampling for the Determination of Mercury in Rice Using Cold Vapor Atomic Absorption Spectrometry, *Food Analytical Methods*, 5 (2012) 1289-1295.
- [120] Santos, W.N.L.; Cavalcante, D.D.; Macedo, S.M.; Nogueira, J.S.; Silva, E.G.P. Slurry Sampling and HG AFS for the Determination of Total Arsenic in Rice Samples, *Food Analytical Methods*, 6 (2013) 1128-1132.

-
- [121] Dias, F.S.; Alves, L.S.; Santos, W.N.L.; David, J.M.; Ferreira, S.L.C. Determination of Manganese in Cassava Leaves by Slurry Sampling Flame Atomic Absorption Spectrometry, *Analytical Letters*, 42 (2009) 2206-2213.
- [122] Vignola, F.; Borges, L.G.; Curtius, A.J.; Welz, B. Becker-Ross, Simultaneous determination of Cd and Fe in sewage sludge by high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry with slurry sampling, *Microchemical Journal*, 95 (2010) 333-336.
- [123] Silveira, J.N.; Lara, P.C.P.; Dias, M.B.; Nascentes, C.C.; Demicheli, C.; Silva, J.B.B. A Simple and Fast Method for Manganese Determination in Antihypertensive Drugs by Slurry Sampling Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry, *Analytical Letters*, 40 (2011) 1736-1749.
- [124] Souza, A.L.; Silva, F.F.; Kelmer, G.A.R.; Oliveira, P.V. A green method for the simultaneous determination of Cd and Pb in soil and sediment by slurry sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry, *Analytical Methods*, 5 (2013) 2059-2063.
- [125] Alonso, M.C.B.; Pardal, M.N.; Pedrouso, M.L.; Aboal, J.R.; Fernandez, J.A.; Bermejo-Barrera, P. An Environmentally Friendly Method for As, Cd, Cr, Cu, Ni, and Pb Determination in Terrestrial Moss Samples Using Ultrasonic Slurry Sampling Combined with Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry, *Atomic Spectroscopy*, 36 (2015) 42-48.
- [126] Chem, W.N.; Jiang, S.J.; Sahayam, A.C. Slurry sampling flow injection chemical vapor generation inductively coupled plasma mass spectrometry for the determination of trace Ge, As, Cd, Sb, Hg and Bi in cosmetic lotions, *Analytica Chimica Acta*, 860 (2015) 8-14.
- [127] Nascentes, C.C.; Korn, M.; Sousa, C.S.; Arruda, M.A.Z. Use of ultrasonic baths for analytical applications: a new approach for optimisation conditions, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 12 (2001) 57-63.
- [128] Filgueiras, A.V.; Capelo, J.P.; Bendicho, C. Comparison of ultrasound-assisted extraction and microwave-assisted digestion for determination of magnesium, manganese and zinc in plant samples by flame atomic absorption spectrometry, *Talanta*, 53 (2000) 433-441.
- [129] Cruz, E.A.; Melo, M.C.; Santana, N.B.; Franco, M.; de Santana, R.S.M.; Santos, L.S.; Gonçalves, Z.S. Alpha-Amylase Production by *Aspergillus Niger*

-
- in Cassava Peels Waste, UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde, 13 (2011) 245-249.
- [130] Carvalho, L.R.F.; Souza, S.R.; Martinis, B.S.; Korn, M. Monitoring of the ultrasonic irradiation effect on the extraction of airborne particulate matter by ion chromatography, *Analytica Chimica Acta*, 317 (1995) 171-179.
- [131] Li, H.; Zhang, Z.; Tang, S.; Li, Y.; Zhang, Y. Ultrasonically assisted acid extraction of manganese from slag, *Ultrasonics Sonochemistry*, 15 (2008) 339-343.
- [132] Derringer, G.; Suich, R.J. Simultaneous optimization of several response variables, *Journal of Quality Technology*, 12 (1980) 214-219.
- [133] Candiotti, L.V.; de Zan, M.M.; Cámara, M.S.; Goicoechea, H.C. Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development, *Talanta*, 12 (2014) 123-138.
- [134] Pimentel, M.F.; Neto, B.B. Calibração: uma revisão para químicos analíticos. *Química Nova*, 19 (1996) 268-277.
- [135] Neto, B.B.; Scarminio, I.S.; Bruns, R.E. Como fazer experimentos: aplicações na ciência e na indústria, 4ª ed. Editora Bookman. 2010. 414 p.
- [136] Passari, L.M.G.Z.; Soares, P.K.; Bruns, R.E. Estatística aplicada à química: dez dúvidas comuns, *Química Nova*, 34 (2011) 888-892.
- [137] Thompson, M.; Ellison, S.L.R.; Wood, R. Harmonized Guidelines for Single Laboratory Validation of Methods of Analysis, *Pure and Applied Chemistry*, 74 (2002) 835-855.
- [138] Vogel, A.I. *Análise química quantitativa*. 6ª ed. LTC. Rio de Janeiro. 2002, 462 p.
- [139] Andrigueto J.M.; Perli, L.; Minardi, I.; Souza, A.; Filho, A.B. *Nutrição animal: as Bases e os fundamentos da nutrição animal – os alimentos*. 4ª ed. São Paulo: Nobel, 1981, 395 p.
- [140] Machado, F.S.; Gonçalves, L.C.; Ribas, M.N. Fibra na alimentação de gado de leite. In: Gonçalves, L.C.; Borges, I.; Ferreira, P.D.S. (Ed.). *Alimentos para gado de leite*. 1ª ed. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2009, p.152-172.
- [141] National Research Council (NRC). *Nutrient requirements of domesticated ruminant*. 7ªed. Washington, 2001, 266 p.

-
- [142] Burns, A.E.; Gleadow, R.M.; Zacarias, A.M.; Cuambe, C.E.; Miller, R.E.; Cavagnaro, T.R. Variations in the chemical composition of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) leaves and roots as affected by genotypic and environmental variation, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60 (2012), 4946-4956.
- [143] Ceni, G.C.; Colet, R.; Peruzzolo, M.; Witschinski, F.; Tomicki, L.; Barriuelo, A.L.; Valduca, E. Avaliação de componentes nutricionais de Cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), *Alimentos e Nutrição*, 20 (2009) 107-111.
- [144] Miller-Ihli, N.J. Advances in ultrasonic slurry graphite furnace atomic absorption spectrometry, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 7 (1993) 482-489.
- [145] Bendicho, C.; Loos-Vollebregt, M.T.C. The influence of pyrolysis and matrix modifiers for analysis of glass materials by GFAAS using slurry sample introduction, *Spectrochimica Acta Part B*, 45 (1990) 679-693.
- [146] Suzdal'tsev, E.I.; Anashkina, A.A. Methods of Determining Suspension Fractional Composition, Translated from *Novye Ogneupory*, 50 (2009) 124-131.
- [147] ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005. Aprova o Regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteínas, vitaminas e minerais. Publicado no Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2005.